

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Contribution à l'évaluation de la toxicité aigüe et subaigüe de
l'extrait méthanolique de la racine de *Centaurea africana*
chez le rat *Wistar***

Présenté par : - OTMANI Mohamed Amine
- KADA Sonia

Soutenu le : 04/06/2016

Devant le jury composé de:

- Président : Mme. DJELLOUT BAYA	M.A.A	ENSV
- Promoteur : Mr. ZAOUANI MOHAMED	M.A.A	ENSV
- Examineur 1 : Mme. ZENAD WAHIBA	M.A.A	ENSV
- Examineur 2 : Mme. BENMOHAND CHABHA	M.A.A	ENSV

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous remercions en premier lieu Dieu tout puissant de nous avoir donné la force pour réaliser ce modeste travail.

Nous exprimons toute notre gratitude et toute notre reconnaissance à Mr ZAOUANI pour avoir accepté de nous encadrer. Nous le remercions pour sa confiance, son soutien et sa disponibilité.

Nous remercions également Mme DJELLOUT BAYA de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Nos remerciements vont aussi à nos examinateurs : Mme ZENAD WAHIBA M.A.A, ENSV, Mme BENMOHAND CHABHA M.A. A, ENSV pour avoir accepté de prendre en charge l'examen de ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi au Dr. BENALI chef de Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques Vétérinaires et Chef de Département Microbiologie et Pathologie Vétérinaire de l'Institut Pasteur d'Algérie pour nous avoir assistés pendant notre travail, ainsi que Mlle BOUDA Kahina.

Nous remercions aussi Mme BENMOKHTAR M.A en Botanique Médicale, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, qui a contribué à l'identification de la plante étudiée.

Nous voudrions par ailleurs exprimer notre profonde reconnaissance à Mme ZENIA qui a contribué à la réalisation de la partie statistique de ce projet.

Nous n'oublierons pas de remercier le Pr. YARGUI et le Pr. OTMANI pour leurs aides précieuses.

Pour finir, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude à tous ceux et celles, qui de loin ou de près, ont rendu possible l'élaboration de ce projet.

Dédicaces

Nous dédions ce mémoire à :

Nos chères mères, qui n'ont de cesse veillé et œuvré pour notre réussite, à travers l'éducation qu'elles nous ont donnée. Pour leurs amours, leurs présences, leurs patiences et pour tous les sacrifices consentis à notre égard. Qu'elles trouvent, à travers ce modeste travail, l'expression de notre sincère reconnaissance.

Nos pères, qu'ils reçoivent, par le biais de ce projet, le signe de notre gratitude pour tout le dévouement consenti et pour toutes les valeurs morales inculquées toute au long de ces années.

Nos frères et sœurs, qui ont été pour nous des modèles de réussite, à travers leur soutien permanent et leurs conseils prodigués.

A nos familles, qui nous ont permis de grandir et de nous épanouir dans un environnement sain, rempli de joie, d'amour et de tolérance.

A tout le corps enseignant et administratif de l'ENSV qui a veillé, tout au long de ces cinq merveilleuses années, à nous prodiguer la meilleure des formations.

A nos amis, qui ont contribué à faire de nous ce que nous sommes aujourd'hui, voyez en ce modeste travail, le signe de notre profonde sympathie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. Première Partie : Etude bibliographique

CHAPITRE I : LA PHYTOTHERAPIE

1. Généralités sur la phytothérapie.....	1
1.1. Définition de la phytothérapie.....	1
1.2. Historique.....	2
1.3. Phytothérapie et botanique.....	3
1.4. Méthodes d'utilisation des plantes.....	3
1.5. Méthodes d'extraction.....	3
2. Les principes actifs des plantes.....	10
2.1. Les hétérosides.....	10
2.2. Les alcaloïdes.....	12
2.3. Les terpènes.....	13
2.4. Les huiles essentielles.....	15
2.5. Les mucilages.....	17
2.6. Les gommes.....	18
2.7. Les résines	19

CHAPITRE II : PRESENTATION ET DESCRIPTION DE LA PLANTE *Centaurea africana*

1. Systématique et identification.....	20
1.1. Systématique.....	20
1.2. Identification.....	20
2. Répartition géographique et écologie de la plante.....	22

3. Description de l'espèce <i>Centaurea africana</i>	22
--	----

CHAPITRE IV : PHYTOTHEERAPIE ET TOXICOLOGIE

1. La famille des astéracées et leurs utilisations	23
2. Données phytochimiques.....	24
3. Données pharmacologiques.....	24
4. Données toxicologiques.....	25

CHAPITRE V : ETUDE TOXICOLOGIQUE

1. Introduction à la toxicologie.....	26
2. La toxicité aigüe.....	27
3. La détermination de la dose létale (DL ₅₀).....	27
4. Différentes méthodes de détermination de la DL ₅₀	28
5. La toxicité subaigüe.....	28
6. La toxicité à long terme.....	28
7. Manifestation de la toxicité.....	28
7.1 L'absorption.....	29
7.2 La distribution.....	29
7.3 La biotransformation.....	30
7.4 L'excrétion.....	30

II. Deuxième partie : partie expérimentale

I-MATERIEL ET METHODE

1. Matériels d'étude.....	voir annexe II
1.1. Matériel biologique :	
• Animaux	
• Plante	
1.2. Matériel non biologique :	
• Matériel d'élevage	
• Matériel d'administration et de prélèvement	
• Matériel d'autopsie et de préparation des lames	
• Matériel analytique et réactifs	
2. Méthodes d'étude.....	32
2. 1. Méthodes d'extraction.....	32
2.2. Préparation des lots de rats	33
✓ Evaluation de la toxicité aigüe.....	33
✓ Evaluation de la toxicité subaigüe	33
2.3. Méthode d'administration des extraits aqueux de la plante.....	34
2.4. Méthode de prélèvements sanguins.....	35
2.5. Méthode d'autopsie et de préparation des lames histologiques	36
2.6. Toxicité aigüe et détermination de la DL50.....	38
2.7. Etude de la toxicité subaiguë.....	39
A. Etude de l'évolution pondérale des rats durant l'expérimentation	40
B.Prélèvements sanguins	40
C. Examens biochimiques.....	41
D. Examens hématologiques	48

E/ Nécropsie	49
F/ Etude anatomo et histopathologique.....	49

II-RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Résultats et discussions de l'étude de la toxicité générale aigüe (DL50).....	57
2. Résultats et discussions de l'étude de la toxicité subaiguë	57
2.1.Action de l'extrait sur l'évolution pondérale	57
2.2. Action de l'extrait sur les paramètres biochimiques	60
2.3. Action de l'extrait sur les paramètres hématologiques	63
2.4. Résultats de l'étude anatomohisto-pathologique.....	66

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ANNEXES

I. Rappels anatomo-histologique et physiologique

I.1. Rappels anatomiques

I.2. Rappels histologiques

I.3. Rappels physiologiques

II. Matériels d'étude

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des figures :

<u>Figure 1</u> : Infusion de feuilles de thé dans de l'eau chaude.....	4
<u>Figure 2</u> : Décoction de gousse de vanille dans de l'eau chaude.....	5
<u>Figure3</u> : A droite macérat de rose et de lavande. A gauche macérat de romarin, d'eucalyptus et menthe poivrée dans du vinaigre.....	6
<u>Figure 4</u> : Schéma de l'hydro distillation de fleurs de lavande.....	7
<u>Figure 5</u> : Schéma de la décantation d'huile essentielle de lavande.....	8
<u>Figure 6</u> : Schéma du principe d'extraction par CO2 supercritique.....	9
<u>Figure 7</u> : Photo de la plante dans son espace naturel (photo personnelle)	20
<u>Figure8</u> : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce <i>Centaurea africana</i> (photo personnelle).....	21
<u>Figure 9</u> : Capitule vu à l'œil nu, capitule en coupe (photo personnelle).....	21
<u>Figure 10</u> : Fruit : akène à aigrette double (photo personnelle)	22
<u>Figure 11</u> : Rat dans les cages (photo personnelle).....	voir annexe
<u>Figure 12</u> : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce <i>Centaurea africana</i>	voir annexe
<u>Figure 13</u> : Gavage des rats (photo personnelle).....	35
<u>Figure 14</u> : Rasage des rats.....	35
<u>Figure15</u> : Administration cutanée.....	35
<u>Figure 16</u> : Prélèvement retro orbitaire (photo personnelle).....	36
<u>Figure 17</u> : Dépouillement de l'animal (photo personnelle)	37
<u>Figure 18</u> : Eviscération (photo personnelle).....	38
<u>Figure 19</u> : Rats dans leur cage (photo personnelle).....	39
<u>Figure 20</u> : Anesthésie du rat à l'éther	40
<u>Figure 21</u> : Marquage du rat.....	40

<u>Figure 22:</u> Technique de prélèvement sanguin (photo personnelle).....	41
<u>Figure 23 :</u> Automate d’analyses biochimiques (photo personnelle).....	42
<u>Figure 24 :</u> Disposition des Eppendorfs dans l’automate (photo personnelle)	42
<u>Figure 25:</u> Manipulation au sein du laboratoire (photo personnelle).....	43
<u>Figure 26 :</u> Centrifugeuse utilisée « Hettichrotofix 32 ».....	43
<u>Figure27 :</u> Manipulation (photo personnelle)	49
<u>Figure 28:</u> Emplacement dans des cassettes (photo personnelle).....	51
<u>Figure 29:</u> Inclusion (photo personnelle).....	52
<u>Figure 30 :</u> Inclusion (photo personnelle)	52
<u>Figure 31:</u> Bain d’eau chaude (photo personnelle).....	53
<u>Figure 32 :</u> Microtome utilisé (photo personnelle).....	53
<u>Figure 33:</u> Microtomie (photo personnelle).....	54
<u>Figure 34:</u> Coloration Hématéine-Eosine (photo personnelle).....	55
<u>Figure 35:</u> Nettoyage au xylène et montage (photo personnelle).....	56
<u>Figure 36:</u> Lames prêtes à la lecture (photo personnelle).....	56
<u>Figure 37:</u> Formes graphiques comparant l’évolution pondérale des rats témoins et des rats expérimentales pour la voie orale.....	59
<u>Figure 38:</u> Formes graphiques comparant l’évolution pondérale des rats témoins et des rats expérimentales pour la voie cutanée.....	59
<u>Figure 39:</u> Illustration des résultats de l’analyse des paramètres biochimiques pour les rats de la voie orale (lot témoin et lot essai).....	61
<u>Figure40 :</u> Illustration des résultats de l’analyse des paramètres biochimiques pour les rats de la voie cutanée (lot témoin et lot essai).....	63

<u>Figure41</u> : illustration des résultats de l'analyse des paramètres hématologiques pour les rats de la voie orale (lot témoin et lot essai).....	64
<u>Figure42</u> : illustration des résultats de l'analyse des paramètres hématologiques pour les rats de la voie cutanée (lot témoin et lot essai).....	65
<u>Figure43</u> : rectum voie orale HE GX10.....	67
<u>Figure44</u> : rectum témoin HE GX10	68
<u>Figure45</u> : foie témoin HE GX10	68
<u>Figure46</u> : foie voie orale HE GX10	69
<u>Figure47</u> : pancréas témoin HE GX10	70
<u>Figure48</u> : pancréas voie orale HE GX10	71
<u>Figure49</u> : rein témoin HE GX10.....	71
<u>Figure50</u> : rein voie orale HE GX10	72

Liste des tableaux :

<u>Tableau.1:</u> Classification botanique de l'espèce étudiée.....	20
<u>Tableau 2 :</u> Caractéristiques des animaux utilisés	voir annexe
<u>Tableau 3 :</u> Composition d'un régime alimentaire des rats	voir annexe
<u>Tableau 4 :</u> Appareillages et équipements.....	voir annexe
<u>Tableau 5 :</u> Produits chimiques et réactifs	voir annexe
<u>Tableau 6 :</u> Consommable	voir annexe
<u>Tableau 7 :</u> Résultats de l'observation de l'évolution pondérale.....	58
<u>Tableau 8:</u> Résultats du dosage des différents paramètres biochimiques pour la voie orale.....	61
<u>Tableau 9:</u> Résultats du dosage des différents paramètres biochimiques pour la voie cutané.....	62
<u>Tableau 10:</u> Résultats du dosage des différents paramètres hématologiques pour la voie orale.....	64
<u>Tableau 11:</u> Résultats du dosage des différents paramètres hématologiques pour la voie cutanée	65

Liste des abréviations :

GOT : Transaminase Glutamo Oxaloacétique

MDH : Malate-Déshydrogénase

GPT : Transaminase Glutamo Pyruvique

LDH: High Density Lipoproteins

PAL: Phosphatase Alcaline

OMS: Organisation Mondiale de Santé

DL50 : Dose Létale Médiane

DME : Dose Maximale sans Effet

GR : Globule Rouge

GB : Globule Blanc

VGM : Volume Globulaire Moyen

HE : Hématéine-Eosine

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ALAT : Alanine Amino Transférase.

HT : Hématocrite

S : Séreuse

M : Muqueuse

MS : Musculeuse Muqueuse

G : Glande

INF : Inflammation

ES : Epithélium de surface

H : hépatocyte

S : Sinusoïde

VCL : Veine Centrolobulaire

TH : Travée Hépatocytaire

SH : Sinusoïde Hépatique

AE : Acini Exocrine

CE : Canal Excréteur

IE : Ilots Endocrines

GR : Glomérule Rénal

TCP : Tube Contourné Proximal

TC : Tube Collecteur

TCD : Tube Contourné Distal

GR : Glomérule Rénal

TCP : Tube Contourné Proximal

TCD : Tube Contourné Distal

C : Cortex Rénal

INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE :

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés préventives et ou curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. (Bruneton J, 2002)

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes, Est-il nécessaire de rappeler que des « remèdes » aussi efficaces que la quinine, chef de file des anti-malariques, la morphine, analgésique majeur, l'ergot de seigle aux vertus antimigraineuses ou le curare aux propriétés myorelaxantes sont d'origine végétale ! Personne n'ignore aujourd'hui la richesse et la diversité des plantes médicinales utilisées par 80 % des habitants de notre planète par défaut d'accès à la médecine moderne. (Kühnau, J. et al, 1976)

Que ce soit pour atténuer une symptomatologie ou pour se maintenir en bonne santé, la phytothérapie répond aux préoccupations du citoyen du XXI^e siècle. Traditionnellement, elle est perçue comme respectueuse des savoirs ancestraux. Naturelle, elle est pensée comme non dangereuse. Disponible sans contrainte, elle permet l'automédication. (Kühnau, J. et al, 1976)

Selon les estimations de l'OMS, (2002), (Organisation mondiale de la santé) plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. La toxicité des produits chimiques, le coût élevé des médicaments chimiques, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural limitent la prise en charge des problèmes de santé publique. L'Algérie ne fait pas exception et l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire. Les cas de toxicité à cause de l'utilisation de ces plantes reconnues médicinales ne cessent d'augmenter, et si les plantes sont faciles à utiliser, certaines d'entre elles sont d'un emploi souvent délicat et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes pouvant dans certains cas entraîner la mort, Cependant lorsqu'un traitement à base de plantes est suivi correctement, les risques d'effets secondaires sont fort limités. (OMS 2002)

Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille des astéracées (composées) l'une des plus grandes familles des angiospermes, avec environ 1100 genres et 25000 espèces sont présentes dans pratiquement toutes les régions du globe.

Le genre ***Centaurea*** fait partie de la famille des astéracées, Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulante, tonique (Ibn-el bitar et all, 1980) , antidiabétique (Kaij-A-Kamb et all,1992), diurétique (Gonzalez et all, 1977), et antirhumatismale (Teresa, J.P et all, 1986), faisant objet de nombreuses études pendant ces dernières décennies, le nombre des flavonoïdes connus a varié de 800 en 1976 (Fleurentin J. et all,1990) à 4000 au début des années 90 (Trease et all,1983), pour atteindre 6500 ces dernières années (Quezel, P. et all,1963).

Dans ce contexte et vu l'importance de l'utilisation des espèces du genre ***Centaurea*** en médecine traditionnelle et les résultats significatifs des tests biologiques obtenus, nous avons sélectionné l'espèce : ***Centaurea africana***.

Cette dernière est endémique pour l'Algérie et la Tunisie (Quezel, P. et *al*, 1963) et est utilisée traditionnellement dans le traitement des brûlures ainsi que pour la cicatrisation, cependant ses propriétés pharmacologiques et surtout toxicologiques sont encore peu étudiées.

Objectif principal de notre étude

L'objectif essentiel de notre étude consiste en l'évaluation des propriétés toxicologiques de cette espèce.

Des extraits méthanoliques ont été préparés à partir des racines de la plante afin de réaliser les objectifs suivants:

- L'évaluation de la toxicité aiguë apparente de l'extrait aqueux sur des rats ***Albinos wistar***;
- La détermination de la DL50, dose létale qui tue 50% d'une population après traitement par voie orale;
- L'étude de la toxicité subaiguë qui nécessite l'exploration de l'évolution pondérale pendant l'expérimentation, et les éventuelles modifications des paramètres : biochimiques et hématologiques, ainsi que l'évaluation des modifications anatomo et histopathologiques sur le foie, les reins et le pancréas, des animaux traités après une administration réitérée des extraits par voie orale et application cutanée pendant 28 jours.

Le présent travail a été réalisé en trois parties :

- Première partie : Etude bibliographique : Revue de la littérature ;
- Deuxième partie : Matériels et Méthodes ;
- Troisième partie : Résultats et Discussions.

CHAPITRE I : LA PHYTOTHERAPIE

1. Généralités sur la phytothérapie :

Dans de nombreuses civilisations et sur tous les continents les pharmacopées végétales ont constitué le principal outil thérapeutique traditionnel avec ses limites qui sont celles de la connaissance scientifique tant médicale que pharmacologique.

Les progrès de ces dernières avec l'étude pharmacologique de la plante médicinale et la mise en évidence de ses principes actifs, ont permis alors de confirmer ou d'infirmer les données issues de la tradition. La recherche d'une puissance d'action accrue et d'une standardisation du produit thérapeutique ont conduit à l'isolement, à l'extraction et à la modification de ce principe actif et progressivement, de fait à l'abandon de la plante médicinale.

On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherchent des extraits actifs des plantes, les extraits actifs identifiés sont standardisés, cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique. (Carillon, 2009)

1.1. Définition de la phytothérapie :

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». Il s'agit d'une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations, la phytothérapie, qui étymologiquement signifie le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. (Gahbiche, 2008).

1.2. Historique :

Le premier texte connu sur la médecine par les plantes est gravé sur une tablette d'argile, rédigé par les Sumériens en caractères cunéiformes 3000 ans av. J.-C.; Ils utilisaient des plantes telles le myrte, le chanvre, le thym, le saule en décoctions filtrées.

Le Papyrus Ebers, du XVI^e siècle av. J.-C. est le premier recueil connu consacré aux plantes médicinales. De loin le plus volumineux connu de l'Égypte ancienne avec « 110 pages », il fait référence à de plus anciens documents citant des dizaines de plantes accompagné d'un mode d'utilisation.

Les Grecs et les Romains utilisaient également de nombreuses plantes. On en retrouve des références, entre autres, dans l'œuvre de Dioscoride. (Médecin grec de l'I^{er} siècle)

En Europe, les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée jusqu'à la fin du XIX^e siècle et l'avènement de la chimie moderne. Encore largement utilisées après la Seconde Guerre mondiale, elles furent ensuite supplantées par les médicaments de synthèse plus simple d'emploi.

En France, le diplôme d'herboriste a été supprimé en septembre 1941 par le gouvernement de Vichy. De 4 500 herboristes en 1941, ils sont désormais une dizaine tandis qu'en Allemagne ou en Italie, on compte plusieurs milliers d'herboristes.

Alors que depuis l'Antiquité les spécialistes des plantes étaient clairement identifiés, du médecin à l'herboriste, et que cette séparation est encore en vigueur dans d'autres sociétés de par le monde : certaines plantes sont sacrées, préparées uniquement par la personne qui remplit la fonction de guérisseur.(Amnaser, 2001)

Historiquement parlant, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIX^e siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire comme elles le sont actuellement dans l'arsenal de la médecine classique. Un grand nombre de principes actifs, qui ont aujourd'hui de l'importance, proviennent de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base. (Anonyme, 2005)

1.3. Phytothérapie et botanique :

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. (Abdul Razzaq et El Sayed haykle, 1993)

Elles sont impliquées dans différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont (Ahmed, 1995). Elle contient, au niveau de ses organes, un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. (Farnsworth et al, 1986)

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne. (Elqaj et al, 2007)

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité. (Gurib-Fakim, 2006)

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont pour finalité la compréhension des pratiques et des représentations relatives à la santé, à la maladie, et la description, l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles. (Gurib-Fakim, 2006)

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes sont employées en médecine moderne. (Gurib-Fakim, 2006)

1.4. Méthodes d'utilisation des plantes : (Rafal, 2008)

A-Techniques traditionnelles d'extraction :

Avec les techniques traditionnelles, les plantes peuvent être préparées en **infusion, décoction** ou **macération**.

1- L'infusion ou "thé" ou "tisane" :

consiste à verser de l'eau chaude sur les fleurs, les feuilles ou les herbes (tiges) des plantes choisies, après 3 à 6 minutes, on remue légèrement et on filtre, Il faut toujours couvrir l'infusion pour ne pas que les principes actifs s'évaporent, et c'est à consommer de suite tiède ou froide, on peut la conserver au frais 6 à 12 heures.



figure 1 : Infusion de feuilles de thé dans de l'eau chaude.

(<http://www.iteabio.com/Index.php?dir=Club&mod=LifeClub>)

2-La décoction :

La plante sèche ou fraîche, parfois en poudre, hachée ou contuse est mise dans un récipient avec de l'eau froide, on porte à l'ébullition et on laisse frémir 10 à 20 minutes, on filtre, et la décoction peut se conserver 2 à 3 jours au froid.



figure 2 : Décoction de gousse de vanille dans de l'eau chaude.

(http://fr.lush.eu/shop/lush/lushopaedia&ingredient_id=681)

3-La macération :

On laisse tremper des fleurs, écorces ou racines de plantes dans de l'huile, de l'alcool ou de l'eau à température ambiante pendant plusieurs heures, le macérat peut ensuite être utilisé sous forme de cataplasme.



figure3 : A droite macérat de rose et de lavande. A gauche macérat de romarin, d'eucalyptus et menthe poivrée dans du vinaigre.

(<http://zafromaniac.wordpress.com/2011/05/04/faire-macerer-des-plantes-dans-du-vinaigre/>)

4-Teinture alcoolique et teinture mère :

Par définition la teinture-mère est "une préparation liquide qui résulte de l'action dissolvante d'un véhicule alcoolique sur des drogues végétales fraîches.

La teinture-mère est obtenue par macération dans de l'alcool éthylique à différents degrés, de plantes médicinales fraîches ou « stabilisées»; si la plante est sèche on parle de teinture alcoolique.

Hormis le fait d'utiliser de l'alcool ce qui peut être rédhibitoire pour certains, la teinture alcoolique (ou -mère) est très intéressante car facile à mettre en œuvre, le résultat est assez régulier, la concentration en substance active contrôlable (permettant une prescription facile) et sa conservation tout à fait bonne.

B-Techniques d'extraction scientifiques :

On dispose de plusieurs techniques scientifiques permettant d'extraire les principes actifs des plantes médicinales. Parmi elles on compte : **l'hydro distillation, le CO2 supercritique, le cryobroyage et la centrifugation différentielle.**

a- L'hydro distillation:

L'hydro distillation est une technique d'extraction qui se fait généralement en **4 étapes** (on prendra ici l'exemple des fleurs de lavande) :

1) l'hydro distillation proprement dite : On porte à ébullition un mélange **d'eau, de plante** (fleurs de lavande) et de **pierres ponce** (pour régulariser l'ébullition et homogénéiser la température du mélange). Les cellules du végétal éclatent et libèrent alors les espèces chimiques odorantes qui (non solubles dans l'eau) sont entraînées par la vapeur d'eau puis récupérées dans un autre récipient après condensation dans le réfrigérant. L'hydro distillat obtenu contient une phase aqueuse ainsi qu'une phase organique constituée par l'huile essentielle (de lavande).

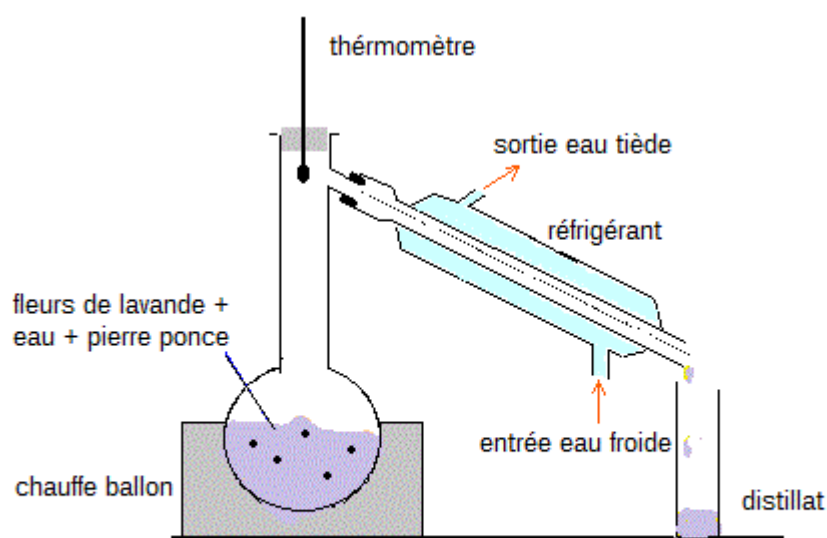


figure 4 : Schéma de l'hydrodistillation de fleurs de lavande.

(<http://www.chimix.com/ifrance/concours/atl00c.htm>)

2) le relargage : Les **huiles essentielles** que l'on désire extraire sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau. Le relargage consiste à les rendre **moins solubles** dans l'eau en ajoutant du chlorure de sodium (qui n'est tout simplement que du sel). De cette façon il sera plus aisé de récupérer ces huiles essentielles (de lavande).

3) la décantation : On la réalise dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles. Une **phase aqueuse**, en général plus dense, se situe dans la partie inférieure et une **phase organique**, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles (de lavande) se situe au-dessus.

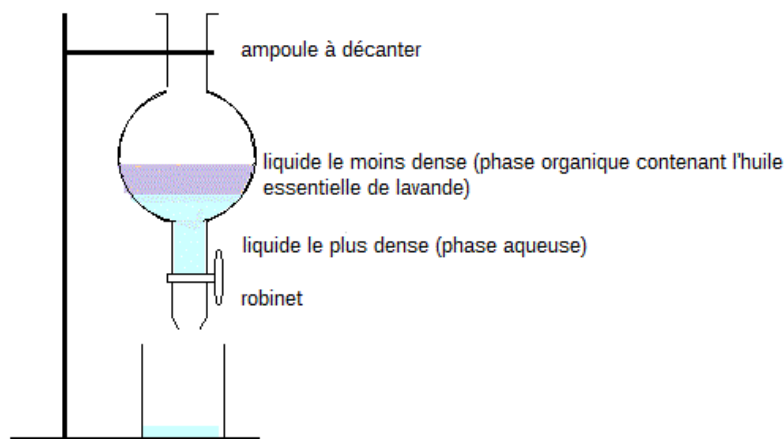


figure 5 : Schéma de la décantation d'huile essentielle de lavande.

(<http://www.chimix.com/an8/prem8/devoir8.htm> retouché avec paint)

4) le séchage et la filtration : Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un **déshydratant**. C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique.

---> Cette opération peut durer une demi-heure ou plus si nécessaire. Elle est très facile à réaliser et ne coûte presque rien. Il faut juste avoir le matériel nécessaire à la réalisation.

b- Le CO₂ supercritique :

Ce procédé se décompose selon les étapes suivantes :

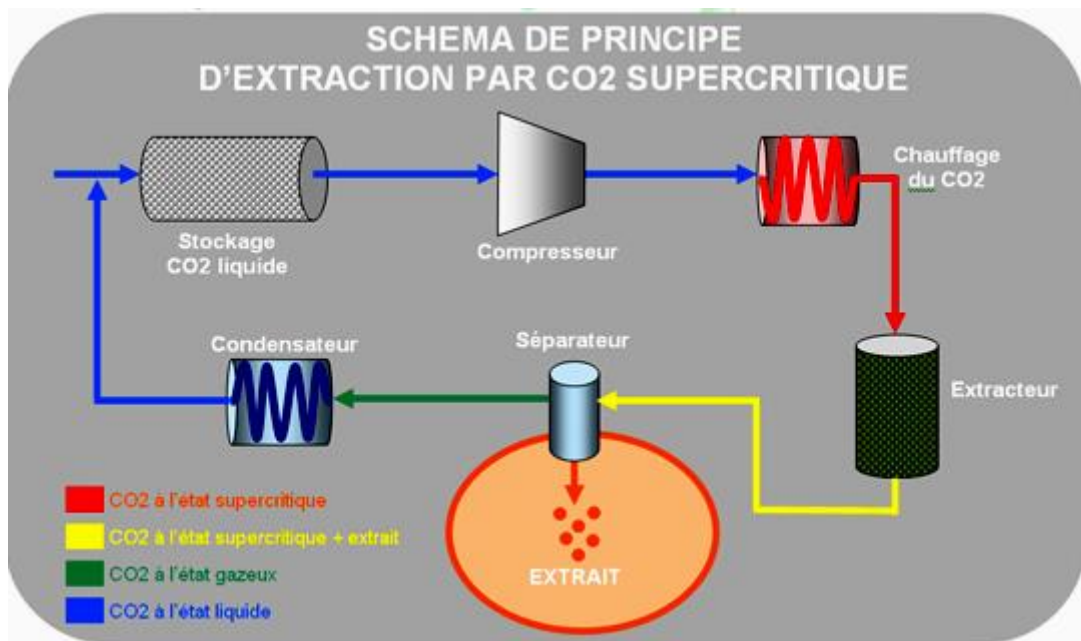


figure 6 : Schéma du principe d'extraction par CO2 supercritique
(<http://www.chimix.com/an8/prem8/devoir8.htm> retouché avec paint)

- 1- La plante est introduite dans l'extracteur
- 2- Le CO₂ est acheminé vers l'extracteur après avoir été comprimé sous plusieurs dizaines de bars et chauffé de 30°C à 40 °C maximum.
- 3- Le liquide présent dans l'extracteur se charge ainsi en composé extrait, puis il est détendu.
- 4- Le CO₂ retrouve alors une forme gazeuse qui lui permet de se séparer de l'extrait à proprement dit ; cette opération a lieu dans un séparateur.
- 5- L'extrait est récupéré par décantation alors que le CO₂ est recyclé par condensation pour être stocké de nouveau sous forme liquide.

---> Les avantages de cette extraction sont qu'à la fin du procédé, on obtient des extraits 100% naturels, sans trace de solvant et étant donné la faible température (40°C), tous les composés, même les plus fragiles, sont préservés. De ce fait, les propriétés thérapeutiques du produit final sont très proches du produit brut. L'extraction au CO₂ supercritique est donc actuellement le moyen le plus écologique et technologique d'obtenir des actifs végétaux de très haute qualité.

2. Les principes actifs des plantes :

- **Définition des plantes médicinales**

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France «une plante» est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elle est présentée pour ses propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. (MOREAU, 2003 in GHABRIER, 2010)

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

Leurs actions proviennent de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents. (SANAGO, 2006)

- **Définition des principes actifs**

Le principe actif est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments.(PELT, 1980)

Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal, est issue de plantes fraîches ou séchées.(BENGHANOU, 2012)

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être considérées comme des substances indirectement essentielles à la vie des plantes contrairementaux métabolites primaires qui sont les principaux responsables du développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi qu'à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...). (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006)

- **Différents groupes des principes actifs**

2.1. Les hétérosides :

A. Définition :

Les hétérosides (ou glycosides) sont des molécules nées de la liaison entre un ose et une substance non glucidique (aglycone) par une liaison glycosidique. Cette liaison est hydrolysée par les bactéries du tube digestif. Les aglycones sont ensuite absorbés au niveau du gros intestin et, après un passage par le foie où ils sont métabolisés, ils sont distribués dans l'organisme.

On distingue ainsi différents types de glycosides selon leur intérêt thérapeutique : (Vernex-Lozet, 2011).

✓ Les glycosides cardiotoniques :

Les glycosides cardiotoniques sont inotropes positifs et chronotropes négatifs, ils permettent d'augmenter la contraction du myocarde et de ralentir la fréquence cardiaque, le débit cardiaque est amélioré. Ils sont utilisés dans le cas d'insuffisance cardiaque congestive ou d'arythmie auriculaire. (Vernex-Lozet, 2011).

✓ Les glycosides anthracéniques (anthracénosides) :

Ils sont dérivés de l'anthracène qui est une quinone (anthraquinone). Les anthraquinones qui induisent des sécrétions d'eau et d'électrolytes et un péristaltisme. Ces molécules permettent une action laxative. Les anthraquinones ont d'autres propriétés, elles inhibent la prolifération excessive des cellules des tubules rénaux, et ralentissent la détérioration des patients souffrant d'insuffisance rénale. Ils inhibent également la cyclo-oxygénase et exercent ainsi un effet anti-inflammatoire. (Vernex-Lozet, 2011).

B. Propriétés physiques :

Les hétérosides cristallisés sont la plupart du temps des substances incolores, cependant les flavonosides sont colorés en jaune plus ou moins foncé, il en est de même des anthracénosides dont la teinte varie du jaune au rouge orangé, les anthocyanosides sont rouges ou violacés. Les hétérosides n'ont pas d'odeur, mais ils ont souvent une saveur amère; cependant certains ont une saveur sucrée : le glycyrrhizoside utilisé comme édulcorant, et le stéviolside, 300 fois plus sucré que le saccharose. La solubilité est variable, cependant la plupart des hétérosides sont assez solubles dans l'eau, surtout à chaud. Les meilleurs solvants sont les alcools méthyliques et éthyliques, mais ils sont peu sélectifs. Les hétérosides sont plus ou moins solubles dans l'acétone et surtout dans l'acétate d'éthyle anhydre ou hydraté ; quelques-uns se dissolvent dans le chloroforme (hétérosides cardiotoniques) ou dans l'éther aqueux (hétéromonosides). (René Paris ; 2014)

Ils sont actifs sur la lumière polarisée mais, contrairement aux oses, ils ne présentent pas le phénomène de la mutarotation ; le pouvoir rotatoire est modifié par la température, la concentration et la nature du solvant, il est très variable d'un hétéroside à l'autre. Il dépend également de la forme alpha ou Bétasous laquelle se trouve le sucre dans l'hétéroside : les d.glucosides alpha sont dextrogyres, les d. glucosides Beta sont lévogyres, cependant le phyllyroside, dédoublable par l'émulsine et appartenant donc à la série Betaest dextrogyre. (René Paris ; 2014)

C. Propriétés chimiques :

Nous retrouverons chez les hétérosides les propriétés chimiques des génines et celles des oses sauf celles de la fonction pseudo aldéhydrique par laquelle a lieu la liaison avec l'aglycone. La propriété la plus caractéristique est le dédoublement avec fixation d'eau, ou hydrolyse, sous l'influence de différents agents (acides, ferments) donnant naissance aux deux constituants : sucres et aglycone ou génine. (René Paris ; 2014)

2.2. Alcaloïdes :

A. Définition :

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure complexe. Ils dérivent du métabolisme azoté : dans les plantes à alcaloïdes, l'azote disponible ne s'est pas totalement transformé en protides végétales, mais continue à circuler dans la sève ou se fixe dans certaines parties de la plante. Il peut également se combiner avec du soufre et donner des hétérosides sulfurés, ou avec du cyanure et donner des hétérosides cyanogéniques. Le plus souvent ce sont des plantes à fleur.

Il existe un grand nombre d'alcaloïdes différents dans le monde végétal. Les principales familles de plantes alcaloïdes sont les Papavéracées (pavots, coquelicots), les Papilionacées (fabacées ou « légumineuses »), les Renonculacées (Aconit, Hellébore) et les Solanacées (belladone, jusquiame). Parmi les plantes les plus connues en thérapeutiques et toxicologie : Belladone, datura, jusquiame, pavot, piment, quinquina, caféier, douce-amère.

Ils agissent sur le système nerveux central et le système autonome grâce à leurs capacité à traverser la barrière hémato-méningée et à interagir avec les récepteurs de neurotransmetteurs. Ils possèdent une action stimulante sur l'appareil digestif. Ils ont des propriétés très diverses.

L'épine-vinette (*Berberis vulgaris*) contient des alcaloïdes responsables des propriétés anti-infectieuses et anti-inflammatoires de la plante. La berbérine et la berbamine peuvent inhiber le métabolisme et la synthèse protéique des bactéries, favoriser la fonction immunitaire et la phagocytose.

Les alcaloïdes ont un fort potentiel toxique, ils sont contre-indiqués chez la chienne gestante et allaitante. Ils sont fixés et précipités par les tannins, ce qui les rend totalement non absorbables.(Vernex-Lozet,2011).

En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante. Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles.

Cette même concentration se diffère selon la période de récolte. Signalons que la présence des alcaloïdes dans une partie de la plante ne prouve en aucun cas sa naissance dans ce milieu. (WICHTL et ANTON, 2009)

B. Propriétés physiques des alcaloïdes:

La masse moléculaire des alcaloïdes varie entre 100 et 900 g/mol. Les alcaloïdes et leurs sels purs sont en général des produits solides cristallisés caractérisés par un point d'ébullition propre. Certains alcaloïdes sont amorphes se trouvant sous forme de cires. D'autres alcaloïdes de faibles points d'ébullitions sont à l'état liquide sous forme d'huiles dont la viscosité varie.

Les alcaloïdes dans le cas général sont des produits incolores, sans odeur spécifique, particulièrement ceux qui ayant de faibles points d'ébullition. Un nombre limité des alcaloïdes possédant des cycles aromatiques virent vers le jaune tel que la berbérine et la colchicine, d'autres virent vers l'orange à l'image de la canadine. Les alcaloïdes liquides peuvent être volatils caractérisés par une odeur spécifique ou non volatils. Signalons enfin que les alcaloïdes ont un goût amer. (M. Paris, M. Hurabielle; et *al* ; 1986)

C. Propriétés chimiques des alcaloïdes:

Les alcaloïdes peuvent former des sels organiques ou non organiques par action des acides. Ces sels formés sont en général plus stables que les bases mères. Plusieurs alcaloïdes ont une activité optique très importante avec la présence d'un atome de carbone asymétrique. (J. Bruneton; 1999)

D. Propriétés basiques des alcaloïdes:

Les alcaloïdes sont en général des bases grâce à la présence d'un doublet électronique libre de l'atome d'azote. La présence de plus de deux atomes d'hydrogène, la structure cristalline et d'autres facteurs défavorisent la formation des alcaloïdes au milieu végétal. Plusieurs chemins biosynthétiques ont été proposés pour la formation des alcaloïdes. (J. Bruneton; 1999)

2.3. Les terpènes :

A. Définition :

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes). (DEHAK K ; 2013)

Ce sont des molécules à faible poids moléculaire et donc souvent très volatiles. Elles entrent dans la composition des huiles essentielles. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les Monoterpénoides :

Ce sont les constituants majoritaires des huiles essentielles et donnent leur odeur caractéristiques à certaines plantes aromatiques (anis, basilic, cannelle, livèche, thym ect.).

Ils sont responsables des propriétés variées des huiles essentielles et des plantes qui les contiennent : antiseptiques (cinéole de l'eucalyptus), antispasmodique (menthole des menthes).

✓ Les Iridoïdes :

Ce sont des mono terpènes rendus solubles par glucosilation. Ils sont constitués de 2 unités isoprènes de structure cyclique et sont très volatiles.

Ils sont capables d'inhiber certaines enzymes : élastase, hyaluronidase, lipoxygénase, permettant un effet anti-inflammatoire. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les Sesquiterpénoides :

Ils sont constitués de 3 unités isoprènes et sont bien souvent volatiles. Ils sont régulateurs de la croissance. L'extrait d'une armoise (artémisinine) est devenue, en association avec d'autres antipaludéens un traitement de référence du paludisme. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les Tétraterpénoides :

Ils sont les plus connus sous le nom de caroténoïdes, pigments responsables de la coloration jaune orangée de nombreux fruits. Le B-carotène est dégradé en vitamine A dans le tube digestif, responsable d'un effet antioxydant. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les lactones sesquiterpènes :

Elles sont constituées de 3 unités isoprènes de structure cyclique. Elles ont de nombreuses autres propriétés : anti-inflammatoire, immuno-modulatrices, vaso-régulatrice, antinéoplasiques... Les plantes riches en lactones sesquiterpènes sont par exemple : l'arnica, le ginkgo, la grande camomille. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les Phénylpropanoïdes :

Ce groupe comprend de nombreuses molécules aux propriétés diverses telle que l'eugénol qui a des propriétés antimicrobiennes et induit l'apoptose de certaines cellules en inhibant un facteur de transcription. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les Diterpénoides :

Ces molécules ne sont pas volatiles et sont les plus souvent sans odeur. Elles sont très lipophiles et donc très bien absorbées par les muqueuses digestives. Elles ont des activités antinéoplasiques. (Vernex-Lozet, 2011)

✓ Les triterpénoides et saponines stéroïdiennes :

Les saponines permettent lors de leur dissolution dans l'eau de former des solutions moussantes. Ce pouvoir tensio-actif confère aux plantes des propriétés antiseptiques, c'est par exemple le cas de *Calendula officinalis* qui contient des saponosides. On distingue les saponines

stéroïdiennes et les triterpénoides selon le nombre de structures cycliques (respectivement 4 ou 5). (Vernex-Lozet, 2011)

Les saponines augmentent l'absorption d'autres molécules au niveau digestif. Elles ont également des propriétés diurétiques, angioprotectrices et veinotoniques. Les saponines ont des propriétés immuno-modulatrices et antinéoplasiques. (Vernex-Lozet, 2011)

2.4. Les huiles essentielles :

A. Définition :

Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues des végétaux par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire. (A.Sanon, M.Garba et *al* ; 2002)

Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes.

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. (A.Sanon, M.Garba et *al* ; 2002)

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

B. Composition Chimique des Huiles Essentielles :

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent-en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines. (Tech, Doc ; 1987)

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes

(Mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. (V. A. Kurkin et *al* ; 2003)

C. Utilisation des huiles essentielles :

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinées à différents secteurs d'activités tels que:

➤ En pharmacie:

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme:

-Aromatisant des médicaments destinés à la voie orale. (J.Q. Cu; 1990).

-Pour leurs actions physiologiques (Menthes, Verveine, Camomille). (M. Paris, M. Hurabielle; 1980)

➤ Dans l'industrie:

-Parfumerie et cosmétologie: De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des bases de parfums.

Exemples: Rose, Jasmin, Vétiver, Ylang-ylang, etc. (M. Paris, M. Hurabielle; 1980)

➤ Alimentation:

Les huiles essentielles (huile de citron, de menthe, de girofle) sont très utilisées dans l'aromatisation des aliments (jus de fruits, pâtisserie). (J.Q. Cu; 1990) (M. Paris, M. Hurabielle; 1980)

Quel que soit le secteur d'activité, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre simultanée ou successive de diverses techniques. (J.F. Cavalli; 2002)

D. Toxicité des huiles essentielles:

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement thérapeutique telle que l'aromathérapie (définie comme le traitement des maladies par les essences de plantes ainsi que la connotation "produit naturel" attaché à ces produits conduisent à une utilisation souvent abusive.

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes.

On connaît par contre beaucoup mieux le risque de toxicité aigue lie à une ingestion massive, en particulier la neurotoxicité des huiles essentielles à thuyone (thuya, absinthe, tanaïsie, sauge, officinale) ou à pinocamphone (hysopé): ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation. De telles intoxications ne sont pas exceptionnelles. D'autres mono terpènes sont également toxiques à doses fortes: camphre, menthol, (risque de spasme de glotte chez le jeune enfant), cinéole, E-anéthol. Cette toxicité non négligeable conduit à adopter une attitude prudente face aux pratiques telles que l'aromathérapie lorsqu'elles utilisent des huiles essentielles-pures et à doses fortes -par voie orale et, a fortiori, en mélange. (N. Nait Said ; 2007)

E. L'activité biologique des huiles essentielles:

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques (A. Touil et *al* ; 2003). En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactériennes, par exemple contre les bactéries endocanalaies (F. Chemat et *al* ; 2007), ou au niveau de la microflore vaginale (J.F. Cavalli; 2002), et d'origine fongique contre les dermatophytes (M. E. Lucchesi et *al*, 2007). Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (A. Sivropoulou, *etal* ; 1996) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des labiacées: thym, origan, lavande, menthe, romarin, saug. L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives. (J.M. Tedder; 1970)

2.5. Les mucilages :

A. Définition :

Les mucilages proprement dits montrent des rapports biochimiques étroits lors de leur formation.

On les trouve dans des drogues telles que: Radix et Folium Althaeae, Folium Malvae Semen Lini , Semen Psylli, Semen Fcenugraeci, Semen Cydoniae.

Le rôle des mucilages serait pour les Ophridées et pour la racine d'althaea, par exemple, celui de substances de réserves que la plante utiliserait à un moment donné, (JaretskyetBereck 1999). Dans beaucoup d'autres cas on leur attribue le rôle de réservoirs d'eau.

Cette affinité pour l'eau et le pouvoir de gonfler seraient mis à profit lors de la germination des graines de lin coing par exemple. (RAYMOND AELLIG, 1995)

B. Action pharmacologique:

Les effets des mucilages dépendent de leurs propriétés physicochimiques. Ils sont utilisés comme régulateurs intestinaux et à dose plus élevée, comme laxatifs. Ils agissent en gonflant dans l'intestin. Conséquences: les selles se ramollissent et le transit est activé. Certains sont utilisés comme expectorants et dans la fabrication de pastilles à sucer. (C. Chkarnat, 2013)

2.6. Les gomme :

Les gommages sont des substances qui ne se distinguent des mucilages que par leur genèse, laquelle résulte ordinairement de lésions pathologiques, et de ce qu'elles donnent le plus souvent des solutions visqueuses collantes et tirant des fils alors que les solutions de mucilages ne sont pas ou peu collantes et ne tirent pas de fils. Il semble que toutes les parties de la plante peuvent prendre part à la formation de la gomme, mais on ne sait pas exactement jusqu'à quel point il se produirait une transformation de la membrane cellulaire. Cependant dans certains cas la gommose apparaît comme un phénomène physiologique normal. Cette production naturelle ne résulte alors en effet d'aucun traumatisme visible, étant donné que les tissus qui entourent les lacunes gommeuses demeurent manifestement intacts.

Dans les gommages-résines se trouvent aussi des polysaccharides du type des mucilages et des gommages, lesquels sont appelés ici gommages. Comme le rôle pharmaceutique de ces polysaccharides n'est pas le même que celui des produits traités dans ce travail, nous ne nous étendrons pas plus longtemps sur ce sujet.

Le rôle attribué aux gommages proprement dites est des plus divers. Certains les considèrent comme des substances de déchet, d'autres leur attribuent le rôle de substances de réserve. Elles interviennent en outre activement ou passivement dans la cicatrisation des plaies.

(Jaretsky, 1949) ; (Beauquesne, 1946) ; (Hirst et Jones, 1947) ; (Pringsheim, 1924).

A. Chimie des gommages :

➤ Gomme arabique :

La gomme arabique est composée, selon Normann, par un polymérisât (= acide arabique) lié en proportions variables à des alcalis et des alcalino-terreux, dans lequel des molécules d'arabinose sont fixées glucosidiquement à un noyau composé d'un anhydrogalactane et d'un acide anhydrourique, les quantités de galactose, arabinose et acide uronique étant variables. (Eder, Bùchi, et al, 1947 ; O'Sullivan, 1884 ; Normann, 1919 ; Hirst, 1942)

➤ **Gomme adragante :**

La gomme adragante est formée d'hydrates de carbone, avec des radicaux acides, qui sont en grande partie sous forme de sels de Ca, Mg et K. Cette gomme est composée d'une partie soluble dans l'eau, la tragacanthine (5 à 10 %), et d'une partie insoluble mais fortement gonflante, la bassorine (60 à 75 %). D'après Normann , la tragacanthine se compose d'un anneau de trois molécules d'acide glucuronique avec une molécule d'arabinose auquel est liée une chaîne latérale comprenant deux molécules d'arabinose.

L'hydrolyse de la gomme adragante a donné d'après van der Haar du 1-arabinose, du xylose, du fucose, du d-galactose et de l'acide d-galacturonique. Ehrlich a en outre trouvé 2,3 % d'acide acétique et Rosenthaler (6g) 3—6 % de méthoxyle. La gomme adragante ne contient pas d'oxydases. (O'Sullivan ,1884) ; (Weinmannetal,1929)

2.7. Les résines :

La résine est l'exsudat de certaines espèces telles que *Comiphora africana*, *Daniella oliveri*, *Boswellia dalzielii*, utilisé pour la production de la myrrhe, de l'encens, du parfum.

Les gommes diffèrent des résines par leur comportement face à l'eau et aux alcools. La gomme se dissout dans l'eau tandis que les résines sont très sensibles aux solutions d'alcools.

(Mathurin Zida et al, 2002)

Chapitre II : Présentation et description de la plante : *Centaurea africana*

1. SYSTEMATIQUE ET IDENTIFICATION :

1.1. SYSTEMATIQUE :

tableau.1: classification botanique de l'espèce étudiée (QUEZEL ET SANTA 1963)

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Compositae
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	Cynarées
Genre	Centaurea
Espèces	Africana Lamk, variété africana (Bonnet) M.

1.2. IDENTIFICATION :

L'espèce *Centaurea africana* a été récoltée durant le mois de juin 2014 dans la région de la Kabylie et plus précisément à DRAA EL MIZANE.

La détermination a été réalisée selon QUEZEL ET SANTA 1963 par Mme BENMOKHTAR maitre assistante en botanique médicale, département de pharmacie, faculté de médecine.



figure 7 : photo de la plante dans son espace naturel (photo personnelle)



figure8 : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce *Centaurea africana* (photo personnelle)



figure 9: capitule vu à l'œil nu, capitule en coupe (photo personnelle)



figure10: Fruit : akène à aigrette double (photo personnelle)

2. Répartition géographique de la plante étudiée :

La plante du genre *Centaurea* est répandue aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe, le bassin méditerranéen, Ouest de l'Asie et le continent Américain. Ce genre est présent en Algérie en majorité dans l'Est et le Sud-Est, et surtout dans les communes suivantes : Ouagnoun, Draa El Mizane et TiziRached, 7 espèces sont Sahariennes. (QUEZEL P, SANTA S ; 1963)

Cette immensité est disponible par sa répartition à travers tous les continents et se caractérise par son pouvoir d'adaptation aux milieux climatiques et pédologiques les plus divers. (TREASE G.F ; EVANS W.C ; 1983)

3. DESCRIPTION DE L'ESPECE « *Centaurea africana* » :

C'est une plante vivace, ferme, dressée et puissante 60-150cm, glabre, à feuilles grandes radicales et très vertes, capitules terminaux globuleux de 20-25 mm de diamètre à fleurs jaunes, akènes obscurément tétragones, glabres, à aigrette double plus longue qu'eux, appelée : Broussaille du Tell. (QUEZEL, P. and SANTA, S. (1963).

CHAPITRE IV : Phytothérapie et toxicologie

1- La famille des astéracée et leur utilisation :

La famille Astéracée est la plus vaste de la classe des dicotylédones, car elle comprend environ 900 genres et entre 15 000 et 20 000 espèces selon les estimations, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. Ce sont des plantes herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes. (Bayer, R. J., Starr, J. R., 1998)

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre. (Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L., 2006)

Les plantes Astéracée sont largement utilisées en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies (Bellakhdar, J., 1997). Cette utilisation à grande échelle par les sociétés ne pouvant pas accéder à la médecine moderne, en fait un argument prépondérant qui justifie les travaux intensifs de recherches réalisés tant du point de vue phytochimique que pharmacologique. A ce jour, nombre d'espèces sont utilisées en médecine traditionnelle. On citera :

Centaurea chamaerha ponticum Bail.: A Marrakech et à Fès, les racines, fraîches ou sèches, en décoction, sont utilisées dans le traitement des maladies du foie, de l'estomac et des intestins.

Centaurea maroccana Ball.et ***C. calcitrapa L.***:A Marrakech et dans la région de Kalâa des Sraghna, les sommités fleuries, en décoction, sont employées contre les palpitations.

Centaurea pungens Pomel.:A Tissint, la plante entière, réduite en poudre, est utilisée par voie orale pour combattre les refroidissements.

Centaurea montanaL. Cette plante est utilisée contre les dyspepsies. Employée en collyre ou compresse, elle soigne les affections des yeux aussi, elle est connue aussi comme diurétique. (Quezel, P., Santa, S., 1963).

2. Données phytochimiques :

2.1. Définition :

La phytochimie (chimie des végétaux) se charge d'étudier les substances actives, leur structure, leur distribution dans la plante, leurs modifications et les processus de transformation qui se produisent au cours de la vie de la plante, de la préparation du remède végétale, puis durant son stockage, la phytochimie est en liaison étroite avec la pharmacologie, la pharmacologie à son tour est en collaboration étroite avec la médecine clinique. (Volak J ; Stodola J, 1983)

Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types : les produits du métabolisme primaire, substances indispensables à la vie de la plantes, qui se forment dans toutes les plantes vertes grâce à la photosynthèse ; le second type de substance se compose des produits du métabolisme secondaire, c'est-à-dire des processus résultant essentiellement de l'assimilation de l'azote. Ces produits apparaissent souvent comme inutiles à la plante, mais leurs effets thérapeutiques sont par contre remarquables. Il s'agit notamment des huiles essentielles, des résines, des alcaloïdes comme ceux de l'ergot de l'opium. (Volak J ; Stodola J, 1983)

3. Données pharmacologiques :

Le genre ***Centaurea*** fait partie de la famille des astéracées, qui compte environ 700 espèces, et en Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 au sud. (Harborne, J.B. (1994), Harborne, J.B and Williams et all 2000)

Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulante, tonique ,(Ibn-el bitar (1980) Wai, J.M. et all (1962).), antidiabétique (Monya, M. et all (1974), Kaij-A-Kamb et all 1992), diurétique (Gonzalez, A.G et all 1977) et antirhumatismale (Teresa, J.P et all 1986), plusieurs activités biologiques ont été mises en évidence (-Arif, R., et all (2004)-Kumarasamy, Y, et all 2003): astringentes, dépuratives, antiseptiques, antipyrétiques, cytotoxiques, antibactérienne, antifongique, antirhumatismal, anti-inflammatoires, diurétique et fébrifuge.

Citons comme exemple l'espèce ***Centaurea cyanus*** (R. Kulikowski et all 1978-Garbacki, N. et all 1999)utilisée comme plante médicinale, car elle est réputé pour son traitement des affections oculaires, on dit qu'elle possède des propriétés légèrement antiseptiques, calmantes, fortifiantes, antirhumatismal, diurétiques, astringentes, digestives et cholagogues ainsi la décoction de fleurs soigne la toux et les catarrhes, est utilisée en lavage, contre l'inflammation des yeux, des paupières,

contre la conjonctivite. Aussi elle est réputée pour l'utilisation de l'extrait de ses fleurs (un colorant bleu) en peinture, imprimerie, cosmétique et en pharmacie.

Des tests de recherche d'activité biologique des extraits chloroformes des espèces algériennes *C. musimomum*, *C. furfuracea*, *C. granata* et *C. maroccana* ont montré des activités cytotoxique et antiparasitaire. (Medjroubi, K. (1999)

4. Données toxicologiques :

Peu de recherches et d'études ont été orientées vers la toxicité de la plante médicinale *C. africana*, néanmoins une étude de la toxicité aiguë de cette dernière par ADENEYE ET AGBAHE 2007 a démontré l'absence de signe de toxicité et ils ont pu également révéler une DL50 supérieure à 2 g/Kg de poids corporel obtenue par l'essai limite de la méthode de « l'ajustement des doses » du protocole 425 de l'OCDE 2006, d'autres études portant sur les plantes du genre *Centaurea* ont prouvé leurs richesses en flavonoïdes et cela selon (MANSOUR.A, 2009), Et des résultats d'études portant sur les effets indésirables des flavonoïdes qui proviennent de travaux effectués in vitro (Starvic.B 1984) et d'autres travaux portant sur des études au long cours ont montré l'absence de carcinogénicité (Yang CS et al 2001, Zhu BT et al 2001). Contrairement aux propriétés mutagènes potentielles des flavonoïdes rapportées dans des travaux antérieurs (Dunnick JK et al 1992), plusieurs études récentes montrent que les flavonoïdes, y compris la quercétine, semblent être antimutagènes in vivo (Duthie SJ et al 1997, Kato K et al 1984, Plakas SM et al 1985). Une étude clinique portant sur 9 959 patients des deux sexes, suivis pendant vingt-quatre ans, a montré l'existence d'une corrélation inverse entre la prise de flavonoïdes (quercétine) et le développement de cancer du poumon. Une des explications de ces données contradictoires réside dans le fait que les flavonoïdes sont toxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses mais ne sont pas toxiques ou moins toxiques à l'encontre des cellules normales. (Knekt P, Jarvinen R et al 1997)

CHAPITRE V : Etude toxicologique

1. Introduction à la toxicologie :

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature (Silbergeld, 2000). Comme telle, elle fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique. Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques à la mise au point et à l'interprétation de tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents. (Lapointe, 2004)

Pour qu'une drogue possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable. Les essais de toxicité accompagnent donc les essais d'activités biologiques au cours de la sélection de nouvelles molécules car dans certains cas l'absorption d'une substance a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme. (Bismuth et *al.* 1987)

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et d'autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques. (Trevoux et *al.* 2000 ; Saad et *al.* 2006)

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL50). (Rolland, 1988)

Cette technique, apporte néanmoins des renseignements de qualité :

□ Elle détermine en premier lieu la toxicité de la substance ainsi que la marge thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre la dose active et la dose toxique pour l'espèce animale testée ; c'est une étape indispensable à l'utilisation de toutes substances à des fins thérapeutiques.

□ L'observation des premiers symptômes de la toxicité des organes cibles, c'est-à-dire ceux qui sont préférentiellement atteints par la toxine; la toxicité est d'ailleurs un excellent critère d'orientation de la recherche d'activité pharmacologique. (Rolland, 1988)

2. La toxicité aiguë :

Elle représente la manifestation la plus spectaculaire de la nocivité d'un poison. Ce fait, qui conduit à considérer comme vénéneuse toute substance qui tue violement, se traduit par la mort rapide de l'individu ou des populations contaminées. La toxicité aiguë peut donc se définir comme celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai suivant l'absorption par voie trans-tégumentaire, pulmonaire ou buccale, en une fois ou en plusieurs répétitions d'une dose unique assez importante d'un composé nocif. (Ramade, 1979)

L'étude de la toxicité aiguë est aussi qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après l'administration de la substance active. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux. Elle permet:

- l'indication de la dose maximale sans effet toxique (DME), c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevée par rapport au lot témoin;
- la notation de la dose minimale pour laquelle la mort survient à tous les animaux de l'expérimentation;
- la détermination de la DL50 avec ses limites de confiance 95%. (Ruckebusch, 1981)

3. La détermination de la dose létale (DL50) :

La DL50 est dans sa forme la plus simple : la dose d'un composé qui provoque une mortalité de 50% dans une population d'animaux mis en expérience. C'est-à-dire ayant reçus une administration unique d'un produit dans des conditions expérimentales bien définies. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien: mort ou survie des animaux. Le protocole expérimental consiste à expérimenter sur 5 à 6 lots de 10 à 20 animaux auxquels sont administrées des doses croissantes de la substance à essayer de manière que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100 %. Ceci parce qu'il est impossible d'obtenir immédiatement 50 % de morts à partir d'un seul group. La construction d'une courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose conduit à déterminer la dose qui serait la DL50. (Wallace Hayes, 2008)

Cette dose sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances. (CSST, 2004)

4. Différentes méthodes de détermination de la DL50 :

On peut déterminer la DL50 par deux méthodes de calcul, la Méthode de Dragstedt et Lang, (1957) et la méthode de Karber et Behrens, (1935). Ainsi qu'on peut la déterminer par deux méthodes graphiques qui sont la méthode de Miller et Tainter, (1944) et la méthode de Litchfield et Wilcoxon, (1949).

5. La toxicité subaiguë :

Diffère de la précédente (toxicité aiguë) par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication, bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques se produisant à court terme sur des organes cibles, parfois réversibles et découlant de l'absorption répétée du toxique, mais à des doses plus faibles que celle de la toxicité aiguë. (Ramade, 1979)

Dans certains cas, il peut être indiqué d'étudier la chimie du sang et de l'urine, et de pratiquer des explorations fonctionnelles de certains organes, l'étude des organes doit comprendre un examen macroscopique et microscopique et la mesure des poids relatifs des organes dans les groupes d'épreuve et dans les groupes témoins. Dans de nombreux cas, les organes les plus importants à observer de façon détaillée sont le foie et le rein. (Shubik et Sicé, 1956 ; Truhaut, 1956)

6. La toxicité à long terme :

C'est l'exposition à de très faibles concentrations, parfois même infimes, à des substances dont la répétition d'effets cumulatifs finit par provoquer des troubles beaucoup plus insidieux et irréversibles. (Ramade, 1979)

Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez les animaux, à la suite d'une exposition répétée et prolongée au-delà de 90 jours.

Il est à signaler que des troubles de toxicité se manifestent souvent après une longue imprégnation de l'organisme. Des essais de toxicité par administration répétée chez l'animal sont toujours effectués lorsqu'une molécule présente un éventuel intérêt thérapeutique. (Wepierre, 1981)

7. Manifestation de la toxicité :

L'effet d'un toxique sur l'organisme dépend essentiellement de la quantité du toxique ou des substances réactionnelles qu'il engendre (métabolites actifs, radicaux libres) qui se fixe au niveau du site d'action (enzyme, récepteur cytoplasmique, ADN). Cet effet est fonction, non seulement de la

quantité du toxique actif qui atteint le site d'action, mais aussi de son affinité pour ce site. (Lauwerys, 2003)

Les quatre principaux facteurs biologiques influençant la concentration du toxique actif au niveau des récepteurs sont :

7.1. L'absorption (OU L'ENTREE)

On appelle absorption le processus de pénétration d'un produit dans l'organisme. Il s'agit d'une étape importante, car, tant qu'il n'a pas pénétré dans la circulation sanguine, un produit ne peut causer d'action toxique systémique, c'est-à-dire à des endroits éloignés du point de contact initial.

Divers facteurs peuvent influencer le processus d'absorption d'un produit: sa nature, sa solubilité, la perméabilité des tissus biologiques au point de contact, la durée et la fréquence de l'exposition. (Gilles Lapointe, Ph. D ; 2004)

La voie d'absorption peut même conditionner l'organe cible. Contrairement à la substance absorbée par les voies cutanée et pulmonaire, les molécules absorbées par voie digestive doivent généralement passer par le foie avant d'être éventuellement diluées dans la circulation systémique. Il n'est dès lors pas surprenant que le foie soit fréquemment l'organe cible de toxiques ingérés, surtout lors d'intoxication aiguë car il se trouve sur la voie de transport obligatoire du toxique. Le degré d'absorption d'une substance étrangère par le tractus gastro-intestinal est lui-même soumis à diverses influences. (Diamand et *al.* 1970)

7.2. La distribution : (LA RÉPARTITION)

Après avoir atteint la circulation sanguine, le produit peut être transporté dans tout l'organisme c'est ce qu'on appelle la distribution.

Entre le moment où elle est absorbée et le moment où elle est excrétée, une substance chimique peut se distribuer dans divers tissus de l'organisme et subir de nombreuses transformations métaboliques. Certaines substances peuvent se stocker préférentiellement dans certains tissus qui ne constituent pas nécessairement le site principal d'action toxique. (Lauwerys, 2003)

En plus de l'oxygène, de divers éléments nutritifs essentiels au fonctionnement de l'organisme et des déchets, le sang transporte aussi des toxiques.

Ceux-ci peuvent alors entrer en contact avec des cellules et se fixer dans certains tissus. Ainsi, les pesticides organochlorés comme le DDT se concentrent dans les tissus adipeux. Ils peuvent y rester emmagasinés sans causer d'effets toxiques pendant une période plus ou moins longue.

En revanche, ils peuvent causer des effets toxiques dans d'autres tissus ou organes où ils sont présents en quantités moindres. (Lapointe. G, 2004)

La nature, l'intensité et la localisation de ces perturbations dans l'organisme diffèrent d'un produit à l'autre et dépendent souvent de la dose. (Lapointe. G, 2004)

7.3. La biotransformation :(OU LE MÉTABOLISME)

Pendant ou après son transport dans le sang, le toxique peut entrer en contact avec différentes cellules de l'organisme qui ont la capacité de le transformer.

L'ensemble des réactions de la transformation métabolique est appelée biotransformation, tandis que les produits de la biotransformation sont appelés métabolites.

Il peut en résulter un produit moins toxique (détoxification) ou plus toxique (activation), l'accumulation ou l'élimination du produit et de ses métabolites. (Lapointe. G, 2004)

La transformation des toxiques est surtout effectuée par le foie, véritable laboratoire chimique de l'organisme, qui contient une multitude d'enzymes (Substance protéique qui catalyse une réaction chimique dans l'organisme). Il enrichit le sang d'éléments nutritifs et le purifie en concentrant et en éliminant beaucoup de substances. D'autres organes tels que les poumons et les reins peuvent aussi transformer des toxiques.

7.4. L'excrétion :

Ce processus consiste à rejeter le produit inchangé ou ses métabolites à l'extérieur de l'organisme.

L'excrétion peut se faire par voie rénale (l'urine), gastro-intestinale (les selles), pulmonaire (l'air expiré), cutanée (la sueur) ou lactée (le lait), néanmoins les voies urinaires et biliaires représentent les principales voies d'excrétion des substances étrangères.

L'importance relative des deux voies principales d'élimination est intimement liée aux transformations métaboliques que le toxique subit in vivo, Divers facteurs endogènes modifient les vitesses d'excrétion et ainsi la concentration du toxique au niveau de son site d'action. (Reidenberg, 1974)

Par exemple, le sang transporte de nombreux produits vers les reins, dont plusieurs déchets provenant du métabolisme. Les reins filtrent le sang, remplissant ainsi une fonction essentielle au maintien de l'équilibre des éléments sanguins, et assurent l'élimination de nombreux produits. (Lapointe. G, 2004)

1. Matériel d'études :

Voir annexe II

2. Méthodes :

2.1 Méthodes d'extraction :

Après avoir récolté la plante *C. africana*, elle a été portée à sécher pendant deux semaines pour en prendre les racines qui ont été par la suite broyées afin d'obtenir une poudre.

❖ Première macération :

- Peser 50g de poudre de végétale
- Mettre dans un erlenmeyer de 1L (entonnoir)
- Ajouter 500mL de solvant (Hexane) (éprouvette)
- Mettre un barreau magnétique dans l'erlenmeyer
- Boucher et couvrir par un papier aluminium
- Mettre sur l'agitateur 72 heures (marquer heure du début et de la fin)

❖ Filtration :

- Filtrer la solution sur un papier filtre, pour obtenir le liquide ou filtrat.
- Conserver dans une bouteille propre, sèche au réfrigérateur et mettre une étiquette comportant : code de plante, date, solvant utilisé (Hexane / Ether de pétrole).

- Le solide ou résidu : Mettre dans l'étuve pour sécher (pas plus de 40° la nuit)

❖ Deuxième macération :

- Ajouter 500mL de solvant hydro-alcool, 400mL méthanol+ 100mL d'eau distillé (à 80% méthanol /20% eau)
- Mettre un barreau magnétique dans l'erlenmeyer
- Boucher et couvrir par un papier aluminium
- Laisser agiter pendant 72 heures

Filtrer la solution et Conserver dans une bouteille propre, sèche au réfrigérateur et mettre un étiquette comportant : code de plante, date, solvant utilisé (Hexane / Ether de pétrole).

2.2. Préparation des lots de rats :

✓ Evaluation de la toxicité aiguë :

La sélection des lots de rats servant à notre expérimentation est basée sur le poids, l'âge, et le bon état de santé de l'animal.

Pour l'évaluation de la toxicité aiguë, les rats ont été répartis au hasard en sept lots de dix rats. Un lot est utilisé comme témoin et les autres lots sont traités chacun par une dose unique par voie orale de l'extrait méthanolique de la racine de la plante.

✓ Evaluation de la toxicité subaiguë :

Pour l'évaluation de la toxicité subaiguë nous avons utilisé 24 rats *Wistar* répartis en 4 lots, chaque lot comporte 6 rats à savoir :

Lot témoin de la voie orale auquel on a administré une solution véhicule.

Lot expérimental de la voie orale auquel on a administré une solution à base d'extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée.

Lot témoin de la voie cutanée auquel on a administré une solution véhicule.

Lot expérimental de la voie cutanée auquel on a administré une solution à base d'extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée.

Ceux de la voie cutanée ont été rasés sur la face dorsale avant l'administration du produit.

➤ Marquage des animaux :

Les rats sont identifiés par un marquage spécifique, numérotation individuelle sur la queue de chaque rat.

Chaque lot est mis dans une cage en plastique portant une étiquette sur laquelle est mentionnée témoin ou traitée.

➤ **Choix et préparation :**

- **La pesée des rats :**

La pesée des rats est effectuée le premier jour, le 7^{ème} jour, 14^{ème} jour et le 28^{ème} jour afin de suivre leur évolution pondérale.

- **Doses du produit à administrer :**

Une solution à base d'extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée à la dose de 1g/kg.

2.3. Méthode d'administration des extraits aqueux de la plante (Gavage) :

- **Toxicité aiguë :**

L'essai limite est réalisé sur des rats répartis en 7 lots de 10 individus, par l'administration orale de 2g/kg de poids corporel de l'extrait hydro alcoolique de *C. africana*, en une dose unique. Les animaux sont maintenus à jeun la veille du test et mis en observation pendant une période de 14 jours, afin de déceler toute manifestation toxique éventuelle et la mortalité est reportée quotidiennement.

- **Toxicité subaigüe :**

L'administration par voie orale est faite à l'aide d'une sonde à gavage pour chaque animal une fois chaque jour durant une période de 28 jours.

Les animaux sont privés de nourriture une heure environ avant l'administration du produit.



figure 13 : gavage des rats (photo personnelle).

L'administration par voie cutanée est faite à l'aide d'un applicateur après rasage de 4 à 5 centimètres de la face dorsale des animaux, une fois chaque jour durant une période de 28 jours.



figure14 : rasage des rats

(Photo personnelle)



figure15 : administration

cutanée (Photo personnelle)

2.4. Méthode de prélèvements sanguins :

Les prélèvements sanguins sont effectués le 28ème jour après administration de l'extrait durant l'étude de la toxicité subaigüe. Cette opération concerne l'ensemble des rats (témoins et traités).

Le prélèvement sanguin s'effectue sur des rats légèrement anesthésiés par inhalation d'éther en plaçant l'animal dans un cristalloir en présence d'un coton imbibé d'éther.

Le prélèvement a été réalisé à l'aide de tubes capillaires d'hématocrite au niveau du sinus rétro orbitaire par une pression rotative, le sinus veineux est alors ponctionné.

La paroi fragile des vaisseaux est perforée et le sang monte par capillarité pour être par la suite récupéré dans des tubes contenant un anti coagulant.(Laroche et Rousselet ,1990 ; Bourdon et Marchal,1973)

Le sang frais est récupéré dans des tubes portant un numéro d'identification de chaque rat ainsi que le numéro du lot des tubes.

Des tubes spécifiques à chaque analyse ont été utilisés. Ces tubes contiennent un anti coagulant EDTA, Héparine.

La quantité de sang à prélever est de 4ml.

Les prélèvements sanguins sont immédiatement centrifugés à 3000 tours/ minute pendant 10 minutes, le plasma obtenu est récupéré dans des tubes eppendorf et transporté dans une glacière au laboratoire d'analyses médicales.



figure 16 : prélèvement retro orbitaire (photo personnelle)

2.5. Méthode d'autopsie et de préparation des lames histologiques :

➤ Autopsie :

Au terme de notre expérience 3 rats de chaque lot (témoins et traités) sont sacrifiés et les organes cibles sont : le foie, les reins et le pancréas.

➤ **Technique :**

A. Position et fixation de l'animal :

Le rat est posé en décubitus dorsal sur un plateau, les extrémités des membres sont attachées avec une ficelle au support de la table.

B. Dépouillement de l'animal :

L'incision sera faite à partir du menton jusqu'à l'anus, les organes génitaux sont contournés de part et d'autres, deux autres lignes d'incisions perpendiculaires à la première sont réalisées, la première antérieure à la peau est mise à hauteur du bras du membre antérieur et une deuxième réalisée de la même façon pour les membres postérieurs, après incision, on commence le dépouillement à l'aide d'un couteau en dilacérant le tissu conjonctif sous cutané.



figure 17 : dépouillement de l'animal (photo personnelle)

C. Ouverture de la cavité abdominale :

On réalise une ponction de la paroi abdominale en région sous xiphoïdienne à partir de la ligne blanche jusqu'au pubis suivie d'une incision transversale de l'hypochondre.

D. Eviscération :

Elle consiste à extérioriser les organes de la cavité abdominale dont les organes cibles qui sont : foie, reins et pancréas.



figure 18: éviscération (photo personnelle)

➤ **Préparation des lames histologiques :**

L'étude histologique est faite au niveau de l'Institut Pasteur, Département Microbiologie et Pathologie Vétérinaire, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique Vétérinaire avec les différentes étapes suivantes :

- **Fixation.**
- **Macroscopie.**
- **Circulation.**
- **Inclusion à la paraffine.**
- **Réalisation des coupes.**
- **Coloration.**
- **Le montage.**
- **Lecture.**

2.6. Toxicité aigüe et détermination de la DL50 :

L'étude de la toxicité aigüe de l'extrait méthanolique de la racine de la plante *C. africana* a été réalisée selon le protocole décrit par l'OCDE N. 402 lignes directrices pour les essais des produits chimiques 1987, et cela à la dose limite de 2g/kg, les animaux sont maintenus à jeûn la veille du test, ensuite une observation et un enregistrement d'une éventuelle toxicité et/ou de mortalité est réalisée pendant 14 jours après l'administration.

2.7. Etude de la toxicité subaiguë :

L'étude de la toxicité à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs a été réalisée selon le protocole décrit par l'OCDE. (Adopté le 03 octobre 2008)

Dans l'étude de la toxicité subaiguë, 24 rats sont répartis en 4 lots de 6 individus chacun, et la substance (extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée) est administrée par différentes voies à la dose de 1g /kg comme suite :

Premier lot : lot témoin de la voie orale, les rats (au nombre de 6) ont reçu par voie orale pendant 28jours une solution véhicule.

Deuxième lot : lot essai de la voie orale : les rats (au nombre de 6) ont reçu par voie orale pendant 28jours une solution à base d'extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée à la dose de 1g/kg.

Troisième lot : lot témoin de la voie cutanée, les rats (au nombre de 6) ont reçu par voie cutanée pendant 28jours une solution véhicule.

Quatrième lot : lot essai de la voie cutanée : les rats (au nombre de 6) ont reçu par voie cutanée pendant 28jours une solution à base d'extrait hydro-alcoolique de la racine de la plante étudiée à la dose de 1g/kg.



figure 19 : Rats dans leur cage (photo personnelle)

Pendant 28jours les rats des différents lots traités selon le lot par la substance correspondante sont minutieusement observés, de manière à déceler toutes les manifestations éventuelles de toxicité

consécutives à l'accumulation de l'extrait hydro-alcoolique de la plante étudiée dans l'organisme, à terme, les mesures et les examens suivants sont réalisées :

- ☐ Etude de l'évolution pondérale ;
- ☐ Prélèvements sanguins ;
- ☐ Examens biochimiques ;
- ☐ Examens hématologiques ;
- ☐ Nécropsie ;
- ☐ Examens anatomo et histopathologiques.

A. Etude de l'évolution pondérale des rats durant l'expérimentation :

L'étude de l'évolution pondérale est effectuée par pesée de tous les rats des différents lots au 1er, 7ème, 14ème, 21ème, et 28ème jour du traitement.

B. Prélèvements sanguins :

La nuit du 28^e jour, tous les animaux sont gardés à jeûn. Le lendemain, les rats sont marqués par des initiales et des chiffres et un prélèvement sanguin de 4 ml est effectué au niveau du sinus rétro-orbitaire pour chaque rat après une légère anesthésie à l'éther.



figure20 : anesthésie du rat à l'éther

(Photo personnelle)



figure 21 : marquage du rat

(Photo personnelle)



figure22: technique de prélèvement sanguin (photo personnelle)

Deux prélèvements sanguins sont effectués pour chaque rat des quatre lots, le premier prélèvement servira à réaliser des analyses hématologiques et donc sera récolté sur tube préalablement marqué par les initiales correspondantes au rat prélevé et contenant l'anticoagulant: EDTA(Éthylène Diamine Tétra-Acétique), le deuxième prélèvement servira à réaliser des analyses biochimiques et donc sera récolté sur tube préalablement marqué par les initiales correspondantes au rat prélevé et contenant l'anticoagulant : héparine de lithium.

Les différents tubes sont classés selon leurs appartenances aux différents lots et placés dans des portoirs et acheminés au centre d'analyse dans une glacière tout de suite après le prélèvement à une température de +4°C.

C. Examens biochimiques :

Les analyses biochimiques sont réalisées au niveau du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Pacha d'Alger, laboratoire de biochimie médicale, à l'aide d'un automate de type « Hitachi 902 automatic analyzer ».



figure 23 : automate d'analyses biochimiques (photo personnelle)

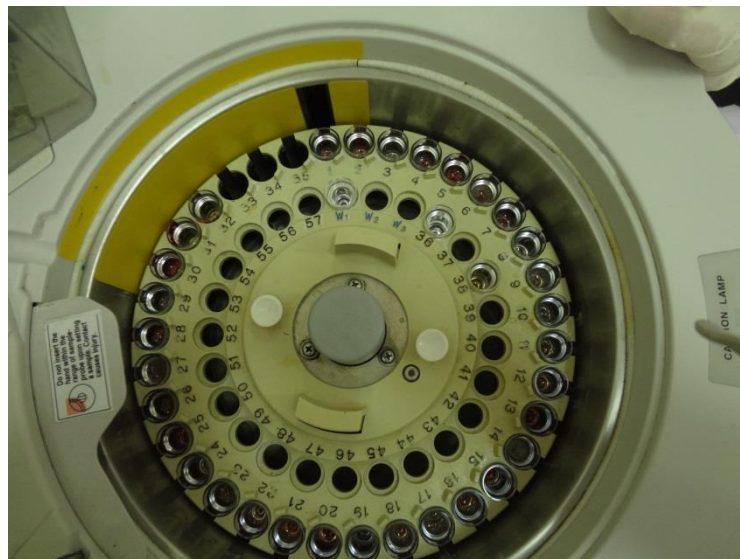


figure 24 : disposition des Eppendorfs dans l'automate (photo personnelle)

Une fois au laboratoire de biochimie, les tubes sont centrifugés à 3000 T/10min pour obtenir du sérum, ensuite les sérums sont mis dans des Eppendorfs, et congelés à -15°C , deux jours après on les a décongelé et centrifugé 5mn à 3000 T/mn pour les homogénéiser, ils sont par la suite placés dans l'automate et l'analyse est lancée.



figure 25: Manipulation au sein du laboratoire (photo personnelle)

Les paramètres dosés sont : GOT, GPT, PAL, GLYCEMIE, CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDE, CREATININE, UREE, PROTEINES TOTALES.

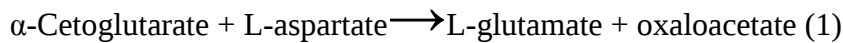


figure 26 : centrifugeuse utilisée « Hettichrotofix 32 »

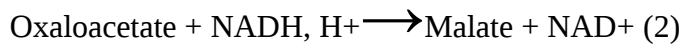
Dosage de la GOT (Transaminase Glutamo Oxaloacétique) :

Le dosage de la GOT est effectué en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH) en s'appuyant sur la mesure de la vitesse de disparition du NADH suivant les réactions suivantes (Bergmeyer, 1978) :

GOT



MDH



Un volume de 1ml de réactif est ajouté à 0,1ml d'échantillon et le tout est incubé à 25°C.

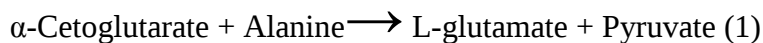
La lecture de l'absorbance (A) des solutions après incubation est effectuée à une longueur d'onde de 340 nm. Le taux de GOT exprimé en U/L est donné par l'équation suivante :

$$\Delta A / \text{min} \times 1745 = \text{U/L}$$

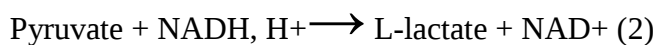
Dosage de la GPT (Transaminase Glutamo Pyruvique)

Le dosage de la GPT est effectué en utilisant la réaction secondaire qui permet de suivre l'oxydation du NADH, H⁺, dont le taux est proportionnel à l'activité catalytique de l'enzyme (GPT) (Bergmeyer, 1978). La transaminase glutamo pyruvique catalyse la réaction suivante :

GPT



LDH



Un volume de 1ml de réactif est ajouté à 0,1ml d'échantillon et le tout est incubé à 25°C. La lecture de l'absorbance (A) des solutions après 1, 2, 3 et 4mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 340 nm. Le taux de GPT exprimé en U/L est donné par l'équation suivante:

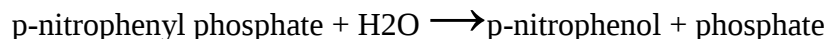
$$\Delta A / \text{min} \times 1745 = \text{U/L}$$

Dosage de la PAL (Phosphatase Alcaline) :

Le dosage de la phosphatase alcaline (PAL) est effectué par la technique colorimétrique de Bowers (1966), avec des substrats dont la déphosphorylation libère un produit coloré.

La PAL catalyse l'hydrolyse du p-nitrophenyl phosphate à pH10, en libérant le p-nitrophenol et un groupement phosphate selon la réaction suivante:

PAL



Un volume de 1,2 ml de réactif est ajouté à 20 µl d'échantillon. Les solutions sont par la suite incubées à 25°C. La lecture de l'absorbance des solutions après 1, 2 et 3 mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 405 nm. Le taux de phosphatase alcaline exprimé en g/l est donné par l'équation suivante:

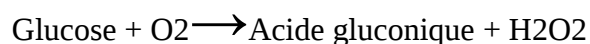
$$\Delta A / \text{min} \times 3300 = \text{U/L de PAL}$$

Dosage de la GLYCEMIE :

Le dosage du glucose est effectué selon la méthode enzymatique colorimétrique de Trinder (1969) impliquant un glucose oxydase. Le glucose est transformé par l'enzyme glucose oxydase en gluconolactone, hydrolysé en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène, selon la réaction chimique suivante :

Réaction 1 : réaction du dosage

Glucose oxydase



Réaction 2 : réaction indicatrice

Peroxydase

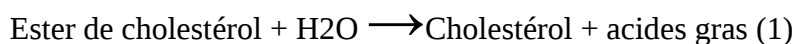


Trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0ml de réactif et 10 µl d'échantillon. L'ensemble est incubé à 37° C pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance (A) des solutions est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm. Le taux du glucose exprimé en g/l est donné par l'équation suivante : **(A échantillon / A standard) x 100=g/l**

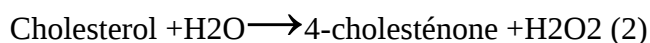
Dosage du CHOLESTEROL TOTAL :

Le dosage du cholestérol est effectué selon la méthode enzymatique colorimétrique impliquant l'enzyme cholestérol oxydase (Trinder, 1969). En effet, les esters de cholestérol sont hydrolysés par une cholestérol estérase en cholestérol libre et en acides gras. Le cholestérol total est oxydé par une cholestérol oxydase en 4-cholesténone et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase, oxyde le 4-aminophénazone et le phénol en quinonéimine de couleur rose selon les réactions chimiques suivantes:

Cholestérol estérase



Cholestéroloxydase



Peroxydase



La lecture des absorbances (A) est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm. La concentration du cholestérol en g/l est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$(\text{A échantillon} / \text{A standard}) \times 200 = \text{mg / dl}$$

Dosage des TRIGLYCERIDES :

Les triglycérides sont dosés par la méthode colorimétrique et enzymatique de Fossati, (1982). Le glycérol, libéré suite à l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase, est transformé en glycérol-3-phosphate grâce à l'action de la glycérokinase. Le glycérol-3-phosphate subit l'action de la glycérophosphate oxydase pour former la déhydroxy-acétone phosphate et le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci en présence de peroxydase, oxyde un groupement chromogène (amino-4-antipirine / chloro-4-phénol), pour former un composé coloré en rose. Les réactions chimiques sont les suivantes:

Lipoprotéine lipase

Triglycérides $\longrightarrow$ glycérol + acide gras

glycérokinase, Mg^{++}

Glycerol + ATP $\longrightarrow$ glycerol-3-P + ADP

glycerol-3-phosphateoxydase

Glycerol-3-Phosphate + O_2 $\longrightarrow$ dihydroxyacétone-phosphate

péroxydase

$2H_2O_2$ + 4 aminoantipyrine $\longrightarrow$ quinoneimine + HCL + $4H_2O$

La lecture est effectuée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 505 nm. Le taux de triglycérides exprimé en g/l est donné par l'équation suivante :

$$(A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 200 = \text{mg} / \text{dl}$$

Dosage de la CREATININE :

C'est le catabolite de la créatine et de la phospho-créatine d'origine musculaire. La créatinine est filtrée par le glomérule rénal (Hare, 1950). En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe coloré (couleur jaune orangé), dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.

Pour ce paramètre, deux lectures des absorbances (A) sont effectuées à une longueur d'onde de 492 nm.

La première lecture après 30 secondes, la deuxième après une minute. Une fois les lectures faites, la variation de la densité optique est calculée pour l'échantillon selon l'équation suivante :

$$(\Delta DO = DO_2 - DO_1)$$

Le taux de créatinine en g/l est obtenu par l'équation suivante:

$$[(\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}) / (\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc})] \times 2 = \text{mg} / \text{dl}$$

Dosage de l'UREE :

L'urée est dosée en cinétique selon la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte, le dicarboxylindophenol, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée (Chaney, 1962).

La lecture des absorbances (A) est effectuée à une longueur d'onde de 590 nm. Le taux d'urée en g/l est obtenu par l'équation suivante :

$$\Delta A \text{ échantillon} / \Delta A$$

Dosage des PROTEINES TOTALES :

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) permet de déterminer des concentrations très faibles de protéines. C'est une méthode colorimétrique, qui utilise le bleu de Coomassie G 250 qui s'associe au groupement amine des résidus protéiques modifiant son spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595 nm. Les concentrations des protéines sont proportionnelles à l'intensité de l'absorption du réactif de Bradford.

D/ Examens hématologiques :

Les analyses hématologiques sont réalisées au niveau du centre hospitalier universitaire (CHU) Mustapha Pacha d'Alger, laboratoire d'analyses hématologiques, à l'aide d'un automate de type « Beckman Coulter ».



figure27 : manipulation (photo personnelle)

Les paramètres hématologiques exploités sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), Hématocrite, VGM (Volume Globulaire Moyen), éosinophile (%), monocyte (%), lymphocyte (%), basophile (%).

E/ Nécropsie :

Juste après avoir réalisé les prélèvements sanguins, les rats sont sacrifiés et une autopsie est effectuée pour apprécier les différentes modifications voir lésions induites par l'administration pendant les 28 jours de la substance étudiée, sont récupérés pour chaque rat autopsié les organes suivants : foie, rein, pancréas, et sont fixés dans du formol à 4% pendant une semaine minimum.

F/ Etude anatomo et histopathologiques :

L'étude anatomo-histo-pathologique a été réalisée à l'institut pasteur d'Alger, département vétérinaire, laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques vétérinaire, la macroscopie et la préparation des coupes histologiques a pour but d'étudier et de conserver l'organe dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant, et préparer des lames histologiques ,et faire leur lecture qui pourra révéler des lésions diverses qui selon leur localisation et étendu et leur gravité pourront mettre en évidence toute toxicité liée à l'administration de la substance étudiée.

La technique histologique passe par plusieurs opérations qui s'enchaînent et qui sont obligatoires.

La technique histologique utilisée est l'inclusion à la paraffine qui passe par 7 étapes :

1. la fixation
2. la macroscopie
3. la circulation
4. l'inclusion
5. la microtomie
6. la coloration
7. le montage

1. La fixation :

Les organes sont imprégnés dans un fixateur qui est le formol 4% dans des centenaires adéquats : 10 volumes de formol pour un volume de prélèvement.

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures cellulaires et tissulaires dans leur état au moment de l'autopsie.

2. La macroscopie :

Elle consiste à effectuer un examen macroscopique du prélèvement (définir la taille, la forme, la couleur et la consistance), et décrire d'éventuelles lésions macroscopiques présentes.

Le prélèvement est ensuite recoupé en tranches et placés dans des cassettes spécialement conçues pour la circulation des spécimens qui sont identifiées à l'aide d'un crayon à la mine.

Ensuite les cassettes sont déposées dans un récipient muni d'un couvercle hermétique et contenant une solution de fixateur pendant quelques heures, puis dans l'alcool durant une nuit.



figure 28: emplacement dans des cassettes (photo personnelle)

3. La circulation :

Cette étape consiste à déshydrater et éclaircir les prélèvements.

a) La déshydratation :

- _ Alcool I : une nuit
- _ AlcoolII: 30 minutes
- _ Alcool III: 30 minutes

b) L'éclaircissement :

Le xylène a pour but d'éclaircir le tissu pour que son indice de réfraction soit plus élevé et que sa transparence soit augmentée, cette étape comporte 3 bains de Xylène :

- _ Xylène I : 2 heures
- _ Xylène II : 2 heures
- _ Xylène III : 1 heure

c) L'imprégnation :

Comporte deux bains de paraffine chaude (56C°), le premier se fait pendant une nuit pour solidifier le tissu, le deuxième bain : une heure avant l'inclusion.

4. L'inclusion :

Le couplage des blocs à la paraffine est réalisé dans des moules métalliques.



figure 29: inclusion (photo personnelle)



figure 30 : inclusion (photo personnelle)

L'inclusion consiste à réorienter convenablement les fragments d'organes dans le sens de la coupe dans un moule préalablement chauffé dans lequel on verse de la paraffine, ensuite les moules sont mis dans le congélateur.

5. La microtomie :

Les blocs d'organes préparés sont coupés à l'aide d'un microtome.

Les sections sont effectuées la plupart du temps à 3 ou 5 microns d'épaisseur, placées par la suite dans un bain d'eau chaude (43 à 45 C°) et étalées sur des lames.

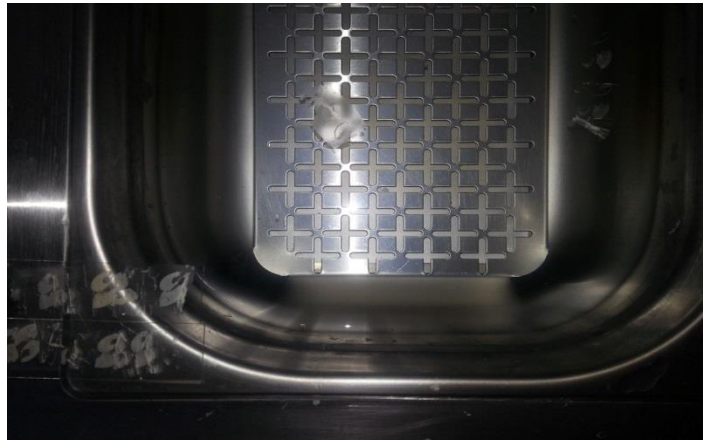


figure 31: bain d'eau chaude (photo personnelle)

Ensuite, il faut Identifier les lames à l'aide d'un marqueur muni d'un diamant.

Mettre les lames à l'étuve pendant 24 heures avant la coloration.

Préparation des lames avant la coloration (déparaffinage) : consiste à mettre les lames dans deux bains de Xylène, 20 minutes chacun.

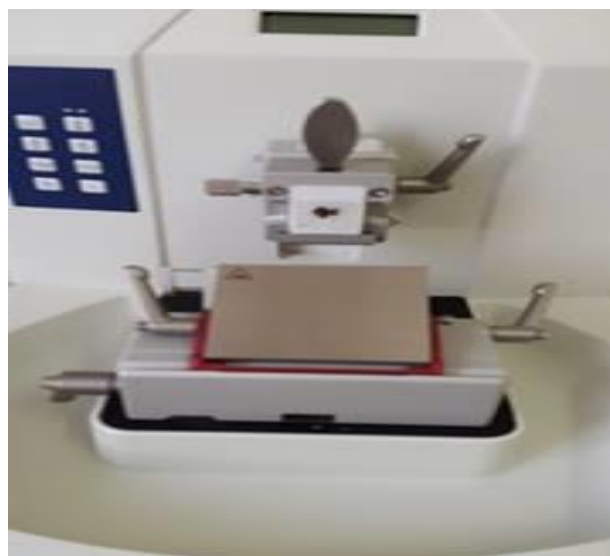


figure 32 : microtome utilisé (photo personnelle)

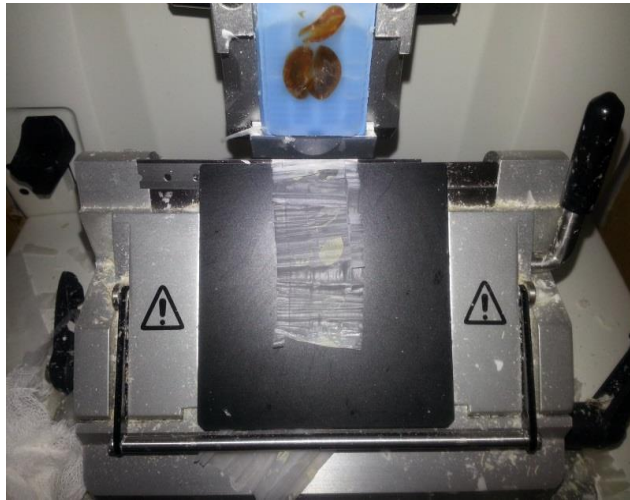


figure 33: microtomie (photo personnelle)

6. La coloration :

Les colorations sont effectuées à l'Hématéine-Eosine(HE) qui est la technique la plus utilisée en histologie et en anatomie pathologique de routine.

L'Hématoxyline colore les noyaux en bleu violet et l'Eosine colore le cytoplasme en rose.

a). Déparaffinage :

Deux bains de xylène, 20 mn chacun.

b). Réhydratation :

Deux bains d'alcool, 5 mn chacun.

c). Rinçage à l'eau courante.

d). Hématoxyline : selon le type de ce colorant :

Hématoxyline de Mayer : 15 mn

Hématoxyline de Harris : 20 sec

e). Rinçage à l'eau courante.

f).Eosine : 3 à 5 mn

g).Déshydratation : deux bains d'alcool

Bain 1 : Alcool 95°

Bain 2 : Alcool absolu



figure 34: coloration Hématéine-Eosine (photo personnelle)

7. Le montage :

Nettoyer la lamelle avec un peu de xylène et bien essuyer, et mettre un peu d'Eukitt qui sert de milieu de montage.

Mettre le xylène sur la lame, déposer ensuite au-dessus la lamelle sans faire de bulles.



figure 35: nettoyage au xylène et montage (photo personnelle)



figure 36: lames prêtes à la lecture (photo personnelle)

Après que toutes les lames soient préparées, elles seront interprétées à l'aide d'un microscope.

CHAPITRE II : Résultats et discussions

1-Résultats et discussions de l'étude de la toxicité générale aiguë (DL50) :

✓ Résultats :

Aucune mortalité ni signe de toxicité n'a été observé pendant une période de 14 jours d'observation à la suite de l'administration d'une dose unique de 2g/kg par voie orale de la poudre lyophilisée de l'extrait méthanolique de la racine de la plante *C.africana* chez le rat *Wistar*, et la dose létale 50% (DL50) est supérieure à 2g/kg de poids corporel obtenue par l'essai limite selon le protocole 425 de l'OCDE (OCDE, 2006).

✓ Discussion :

Les résultats de cette étude ont permis d'estimer la DL50 de cet extrait à une concentration supérieure à 2 g/kg.

Cette valeur le place dans la catégorie IV selon la classification de la toxicité aiguë de l'OMS, qui comporte quatre catégories (allant de hautement toxique : catégorie I, à non toxique : catégorie IV) et permet par conséquent de le qualifier notre extrait comme étant non dangereux.

2-Résultats et discussions de l'étude de la toxicité subaiguë :

✓ Résultats :

Dans la présente étude, aucun décès n'a été signalée pendant l'expérience, et le comportement des animaux reste normal et semblable entre rats témoins et rats expérimentés, l'évolution pondérale a été enregistrée, et illustrée sous forme de tableau et interprétée à partir des graphes.

Action de l'extrait sur l'évolution pondérale :

Les pesées hebdomadaires tout au long de la durée de l'expérimentation (28 jours) ont permis de suivre l'évolution pondérale des animaux traités et témoins.

Les résultats des 4 pesées hebdomadaires effectuées pendant l'étude expérimentale (28 jours) sont rapportés dans le tableau suivant :

tableau 7 : résultats de l'observation de l'évolution pondérale (g)

Lots	Rats	J0	J7	J14	J21	J28
Voie orale (temoin)	R1	191	204	216	234	244
	R2	197	212	214	227	231
	R3	200	204	216	224	233
	R4	192	197	218	235	244
	R5	210	213	224	239	247
	R6	216	210	228	229	253
	Moyenne	201,00	206,67	219,33	231,33	242,00
	Ecarype	10,04	6,12	5,47	5,61	8,44
Voie orale essai (dose 1g/kg)	R1	203	214	226	230	247
	R2	203	212	224	234	239
	R3	185	219	222	235	247
	R4	195	209	218	230	249
	R5	198	206	214	234	246
	R6	199	217	223	238	242
	Moyenne	197,17	212,83	221,17	233,50	245,00
	Ecartype	6,71	4,88	4,40	3,08	3,74
Voie cutanée (temoin)	R1	190	194	197	216	228
	R2	192	200	204	228	232
	R3	204	202	214	232	240
	R4	200	202	204	224	236
	R5	211	207	205	226	235
	R6	202	212	224	238	243
	Moyenne	199,83	202,83	208,00	227,33	235,67
	Ecartype	7,81	6,15	9,53	7,45	5,39
Voie cutanée (essai)	R1	192	200	224	234	245
	R2	195	214	223	234	243
	R3	201	216	227	237	244
	R4	192	209	211	226	235
	R5	201	215	221	231	241
	R6	197	204	229	238	240
	Moyenne	196,33	209,67	222,50	233,33	241,33
	Ecartype	4,08	6,53	6,32	4,37	3,61

Une étude statistique a été réalisée pour l'interprétation des données ci-dessus, et les résultats sont illustrés par les figures suivantes :

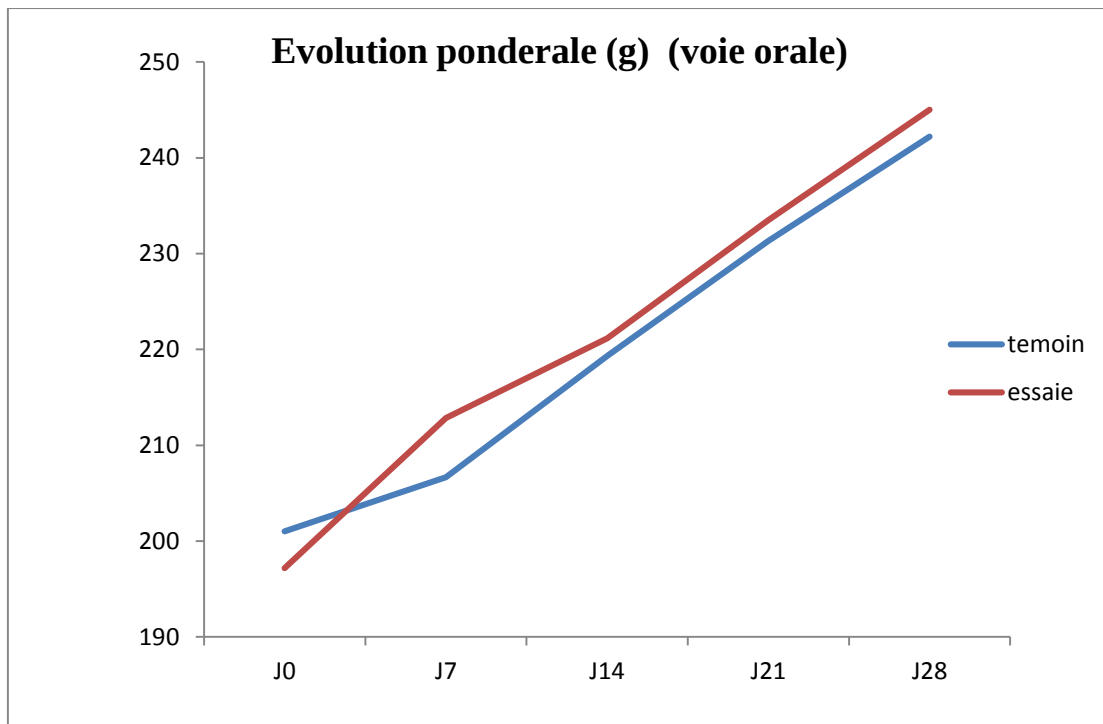


figure 37: formes graphiques comparant l'évolution pondérale des rats témoins et des rats expérimentales pour la voie orale

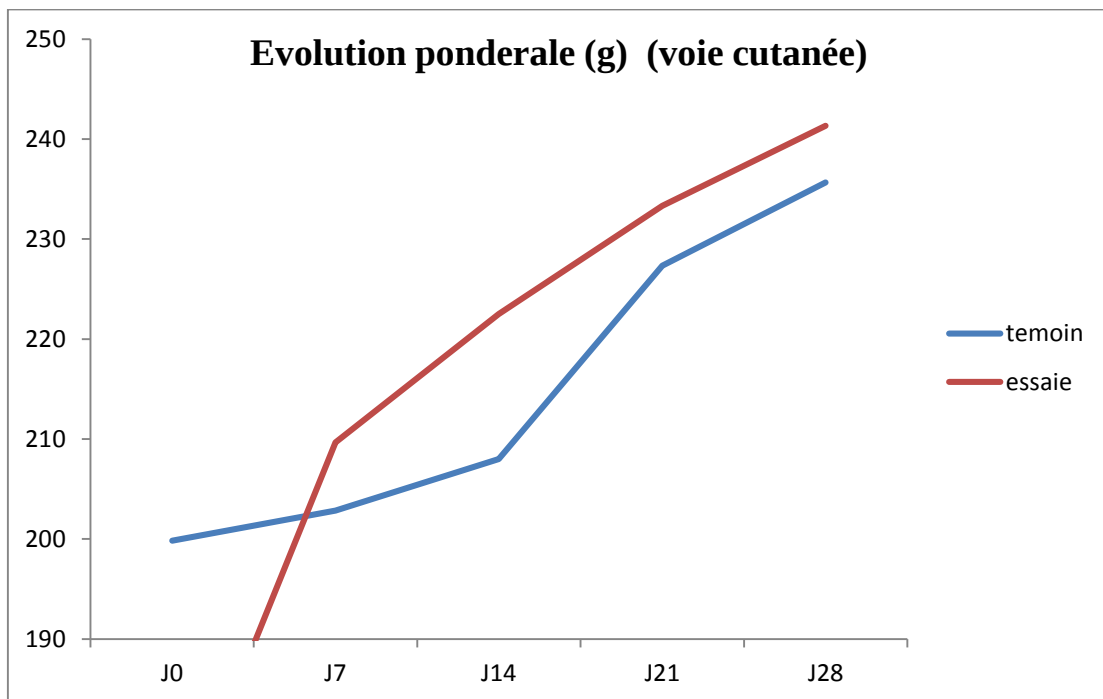


figure 38: formes graphiques comparant l'évolution pondérale des rats témoins et des rats expérimentales pour la voie cutanée

Le test statistique utilisé pour interpréter ces résultats est le test de MANN WHITNEY test non paramétrique.

Pour les deux voies : orale et cutanée par rapport au lot témoin le test est non significatif car $p > 0,05$, par conséquent, pour les deux voies étudiées, la différence entre témoin et essai n'est pas significative, et donc il semblerait que l'administration de l'extrait hydro alcoolique de la racine de la plante **C. africana** par ces deux voies n'affecte pas l'évolution du poids corporel des rats.

Action de l'extrait sur Les paramètres biochimiques :

Plusieurs composés de plantes toxiques s'accumulent dans le foie où ils sont détoxifiés (Clarke et Clarke, 1977). Le foie est la première cible de la toxicité et le premier organe exposé à tout ce qui est absorbé dans l'intestin grêle; il métabolise les substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxiques. (Rhiousani et *al.* 2008). Le foie travaille en association avec les reins pour éliminer les substances toxiques du sang. (Tulsawani, 2010)

Une étude de la fonction rénale et hépatique peut donc s'avérer utile pour évaluer les effets toxiques des plantes médicinales. Ces tests comprennent principalement la détermination de l'ASAT ou GOT, ALAT ou GPT, CRE, LDH et autres (Tilkian, 1979) et toute nécrose des cellules hépatiques conduit à une hausse significative des enzymes ASAT, ALAT, et LDH dans le sérum sanguin. (Adeneye et *al.* 2006)

Après une durée d'expérimentation de 28 jours durant laquelle les rats des différents lots ont reçu une dose journalière correspondante à 1g/kg de l'extrait hydro alcoolique de la racine de la plante **C. africana**, un prélèvement sanguin à jeûn a été réalisé sur chaque rat, et les résultats du dosage des différents paramètres biochimiques sont présentés dans les tableaux suivants :

tableau 8: résultats du dosage des différents paramètres biochimiques pour la voie orale

	Voie orale			
	Lot témoin		Lot essai DOSE (1g/kg)	
	J 28		J 28	
	Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype
GOT (UI/L)	97,50	19,48	86,66	14,50
GPT (UI/L)	73,33	13,95	64,50	8,83
PAL (UI/L)	159,03	5,11	155,83	7,73
GLYCEMIE (g/l)	0,88	0,10	0,83	0,06
CHOLESTEROL (g/l)	0,74	0,02	0,75	0,01
TRIGLYCERIDE (g/l)	0,88	0,36	0,67	0,24
CREATININE(mg/l)	5,50	1,04	5,50	0,54
UREE (g/l)	0,40	0,07	0,38	0,05
PROTEINE (g/l)	74,23	2,57	67,30	3,36

Une étude statistique a été réalisée pour l'interprétation des valeurs obtenues, et les résultats sont illustrés par la figure suivante :

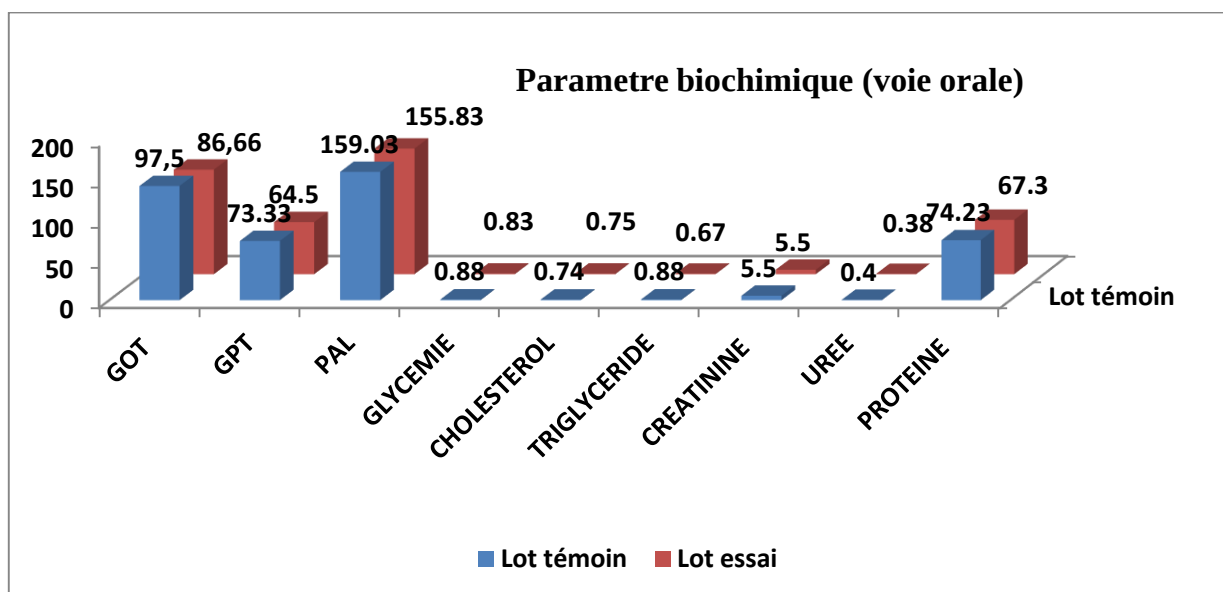


figure 39: illustration des résultats de l'analyse des paramètres biochimiques pour les rats de la voie orale (lot témoin et lot essai)

Les résultats obtenus après dosage des paramètres : PAL, GLYCEMIE, CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDE, CREATININE, et PROTEINES TOTALE, n'ont montré aucune différence statistiquement significative de leurs valeurs après comparaison entre le lot témoin et le lot expérimental, $p > 0,05$.

Les résultats obtenus après dosage des paramètres : GOT (ASAT) et GPT (ALAT) révèlent une différence statistiquement ($p < 0,05$) significative représentée par une diminution chez les rats traités par rapport à ceux du lot témoin.

tableau9: résultats du dosage des différents paramètres biochimiques pour la voie cutané

	Voie cutané			
	Lot témoin		Lot essai DOSE (1g/kg)	
	<u>J 28</u>		<u>J 28</u>	
	Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype
GOT (UI/L)	95,5	20,46	92,33	24,96
GPT (UI/L)	85,33	11,98	80,28	13,55
PAL (UI/L)	154,48	16,79	151,03	8,46
GLYCEMIE (g/l)	0,83	0,07	0,83	0,06
CHOLESTEROL (g/l)	0,71	0,06	0,73	0,034
TRIGLYCERIDE (g/l)	0,74	0,10	0,56	0,04
CREATININE (mg/l)	5,33	0,51	5,16	0,75
UREE (g/l)	0,47	0,02	0,52	0,06
PROTEINE (g/l)	74,6	3,38	71,86	3,94

Une étude statistique a été réalisée pour l'interprétation des valeurs obtenues et présentées dans le tableau ci-dessus, et les résultats sont illustrés par la figure suivante :

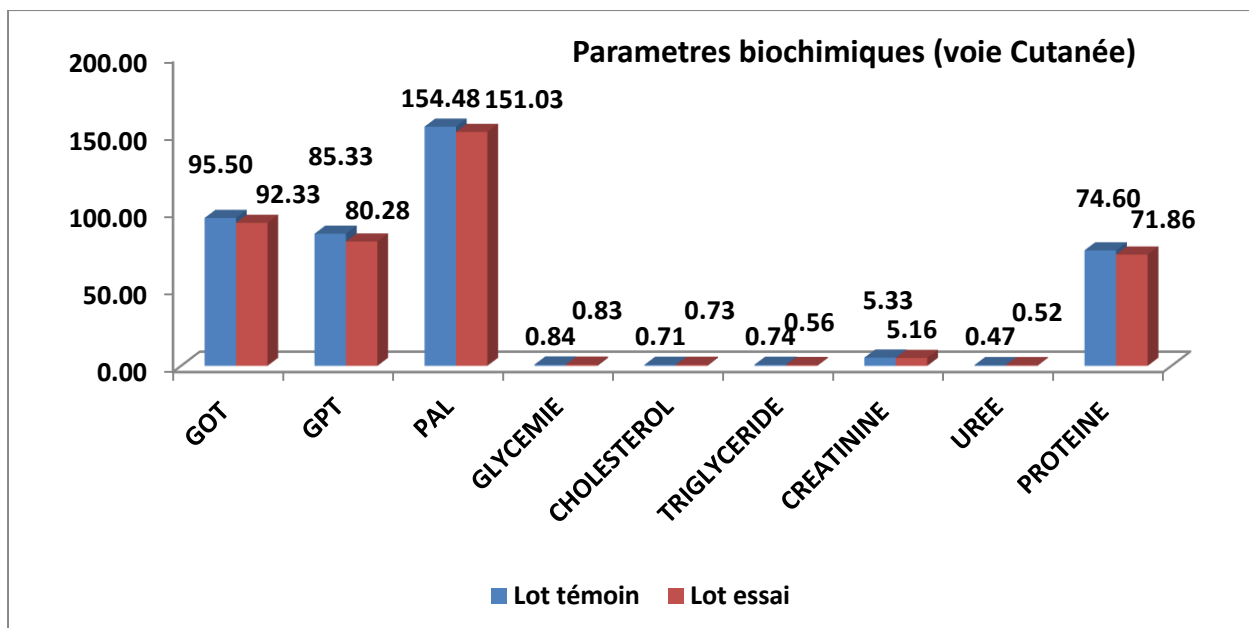


figure40 : illustration des résultats de l'analyse des paramètres biochimiques pour les rats de la voie cutanée (lot témoin et lot essai)

Les résultats obtenus après dosage des paramètres : PAL, GLYCEMIE, CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDE, CREATININE, et PROTEINES TOTALE, n'ont montré aucune différence statistiquement significative de leurs valeurs après comparaison entre le lot témoin et le lot expérimental, $p > 0,05$.

Les résultats obtenus après dosage des paramètres : GOT et GPT révèlent une différence statistiquement significative $p < 0,05$, représentée par une diminution chez les rats traités par rapport à ceux du lot témoin.

Action de l'extrait sur Les paramètres hématologiques :

Le système hématopoïétique est une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007). Les changements dans le système hématopoïétique ont une plus grande valeur prédictive pour la toxicité humaine, lorsque les données sont déduites des études réalisées sur des animaux (Olson et al. 2000). A cet égard, l'état de l'activité de la moelle osseuse et les effets intravasculaires ont été contrôlés par des examens hématologiques, après une durée d'expérimentation de 28 jours durant laquelle les rats des différents lots ont reçu une dose journalière correspondante à 1g/kg de l'extrait hydro alcoolique de la racine de la plante *C.africana*, un prélèvement sanguin à jeun a été réalisé sur chaque rat, et les résultats du dosage des différents paramètres hématologiques sont présentés dans des tableaux ci-dessous et illustrés par des graphiques.

tableau 10: résultats du dosage des différents paramètres hématologiques pour la voie orale :

	Voie orale			
	Lot témoin		Lot essai DOSE (1g/kg)	
	J28		J28	
	Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype
GR (×106 µl-1)	8,12	0,85	7	0,56
GB(×103 µl-1)	13,20	0,75	13,07	0,41
Hématocrite (%)	45,84	0,78	43,91	0,83
Eosinophile (%)	2,63	0,29	3,01	0,33
Monocyte (%)	8,16	0,23	8,26	0,11
Lymphocyte(%)	77,80	0,56	82,60	1,1
Basophile (%)	18,90	1,04	18,38	0,41

Une étude statistique a été réalisée pour l'interprétation des valeurs obtenues et présentées dans le tableau ci-dessus, et les résultats sont illustrés par la figure suivante :

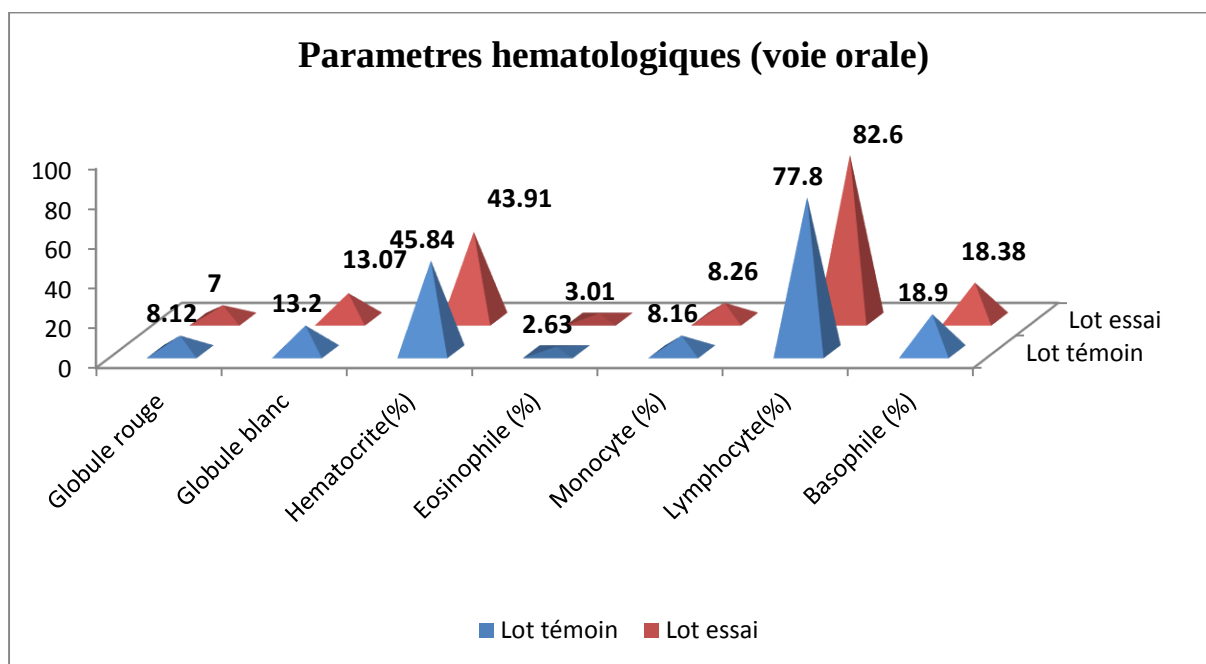


figure41 : illustration des résultats de l'analyse des paramètres hématologiques pour les rats de la voie orale (lot témoin et lot essai)

On ne constate aucune variation des paramètres hématologiques après les 28 jours de l'expérimentation. L'analyse de la variance ne met en évidence aucune modification statistiquement

significative chez les rats d'essais par rapport aux témoins, Ainsi les taux d'hématocrite (HT), de globules rouges (GR), des globules blancs (GB), d'éosinophile, de monocyte, de lymphocyte, et de basophile des rats essais sont restés comparables à ceux des rats témoins.

tableau11: résultats du dosage des différents paramètres hématologiques pour la voie cutanée :

	Voie cutanée			
	Lot témoin		Lot essai DOSE (1g/kg)	
	J28		J28	
	Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype
GR ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	5,9	0,18	6,4	0,12
GB($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	12,97	0,59	13,07	0,61
Hématocrite (%)	44,72	2,02	46,16	1,16
Eosinophile (%)	2,65	0,18	2,5	0,2
Monocyte (%)	10,47	0,52	12,19	0,46
Lymphocyte(%)	78,4	4	81,7	3,95
Basophile (%)	21,46	0,65	22,18	0,23

Une étude statistique a été réalisée pour l'interprétation des valeurs obtenues et présentées dans le tableau ci-dessus, et les résultats sont illustrés par la figure suivante :

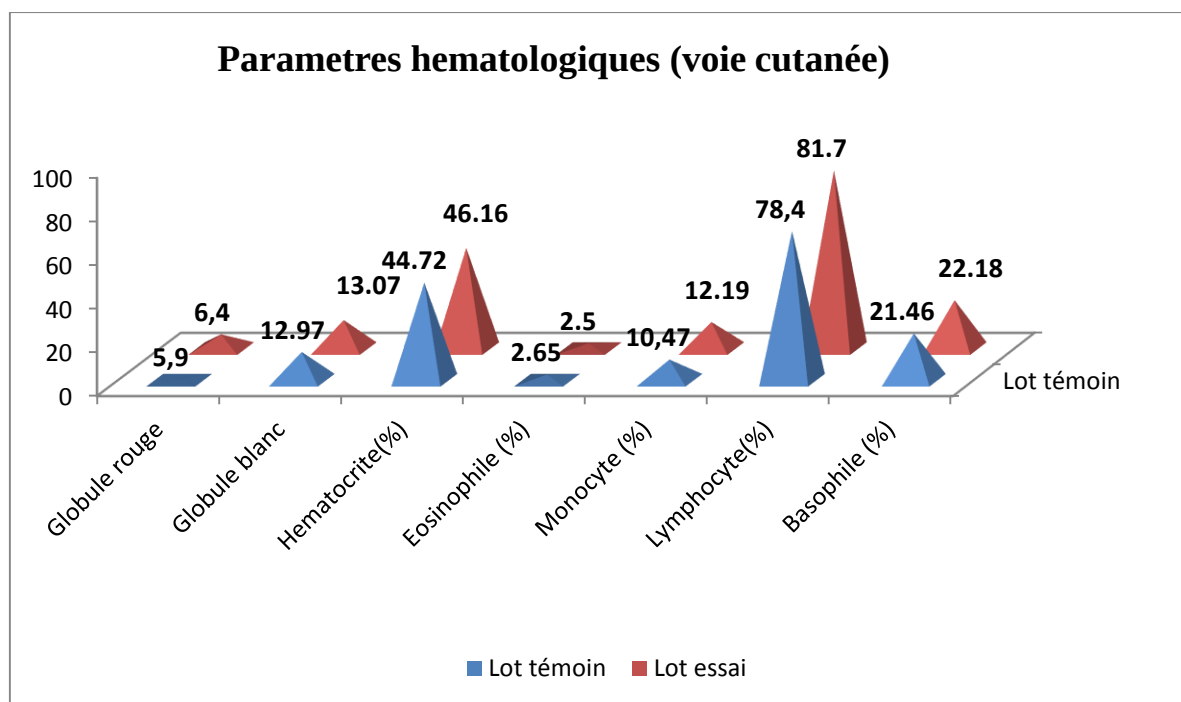


figure 42 : illustration des résultats de l'analyse des paramètres hématologiques pour les rats de la voie cutanée (lot témoin et lot essai)

On ne constate aucune variation des paramètres hématologiques après les 28 jours de l'expérimentation. L'analyse de la variance ne met en évidence aucune modification statistiquement significative chez les rats d'essais par rapport aux témoins, Ainsi les taux d'hématocrite (HT), de globules rouges (GR), des globules blancs (GB), d'éosinophile, de monocyte, de lymphocyte, et de basophile des rats essais sont restés comparables à ceux des rats témoins.

✓ **Résultats de l'étude anatomopathologique :**

L'étude a été réalisée sur des prélèvements hépatiques, rénaux, rectaux et pancréatiques effectués lors de l'autopsie sur l'ensemble des rats.

Un examen macroscopique a été effectué, il met en évidence une stéatose plus ou moins diffuse observée chez l'ensemble des animaux.

Un examen histo pathologique effectué après circulation, inclusion, coupe et coloration en Hématéine éosine, réalisé en comparaison avec les animaux du lot témoin, ne montre que des lésions rectales chez les animaux des groupes de la voie orale.

Ces lésions sont de type inflammatoire et consistent en une infiltration inflammatoire focale mononuclée (lymphocytes, histiocytes et plasmocytes) dans la muqueuse, la sous muqueuse et la musculature muqueuse, un effacement des glandes ainsi qu'une ulcération de l'épithélium de surface est également rapportée.

L'inflammation pour la voie orale est d'intensité minime.

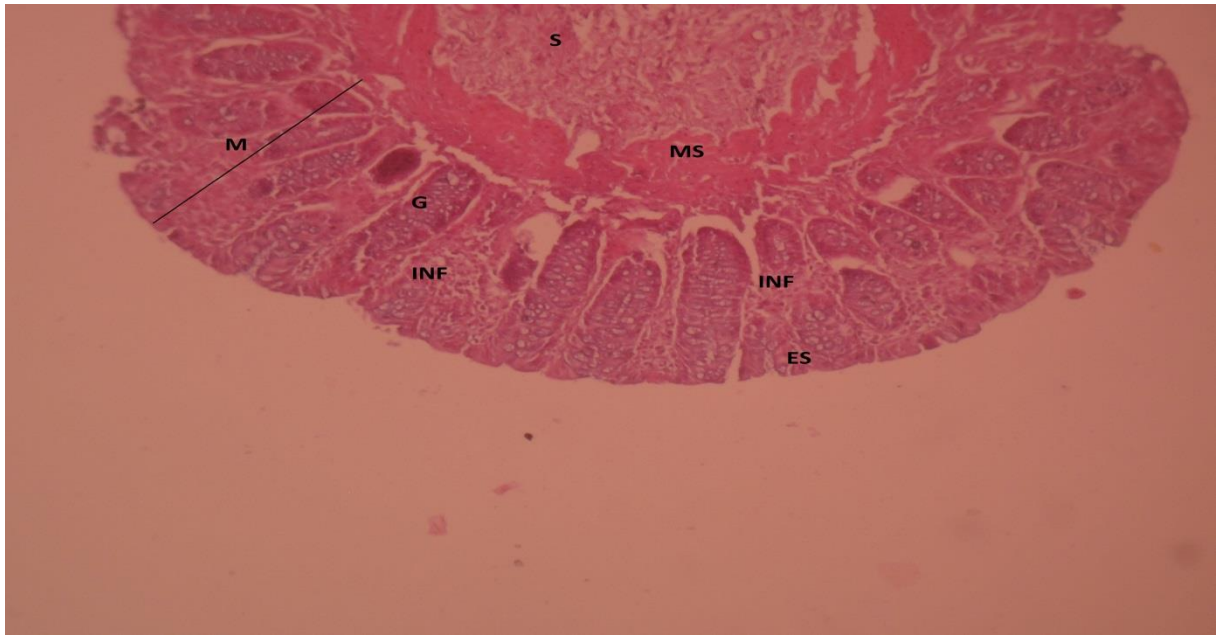


figure43 : rectum voie orale HE GX10

Légendes :

S : séreuse

M : muqueuse

MS : musculature muqueuse

G : glande

INF : inflammation

ES : épithélium de surface

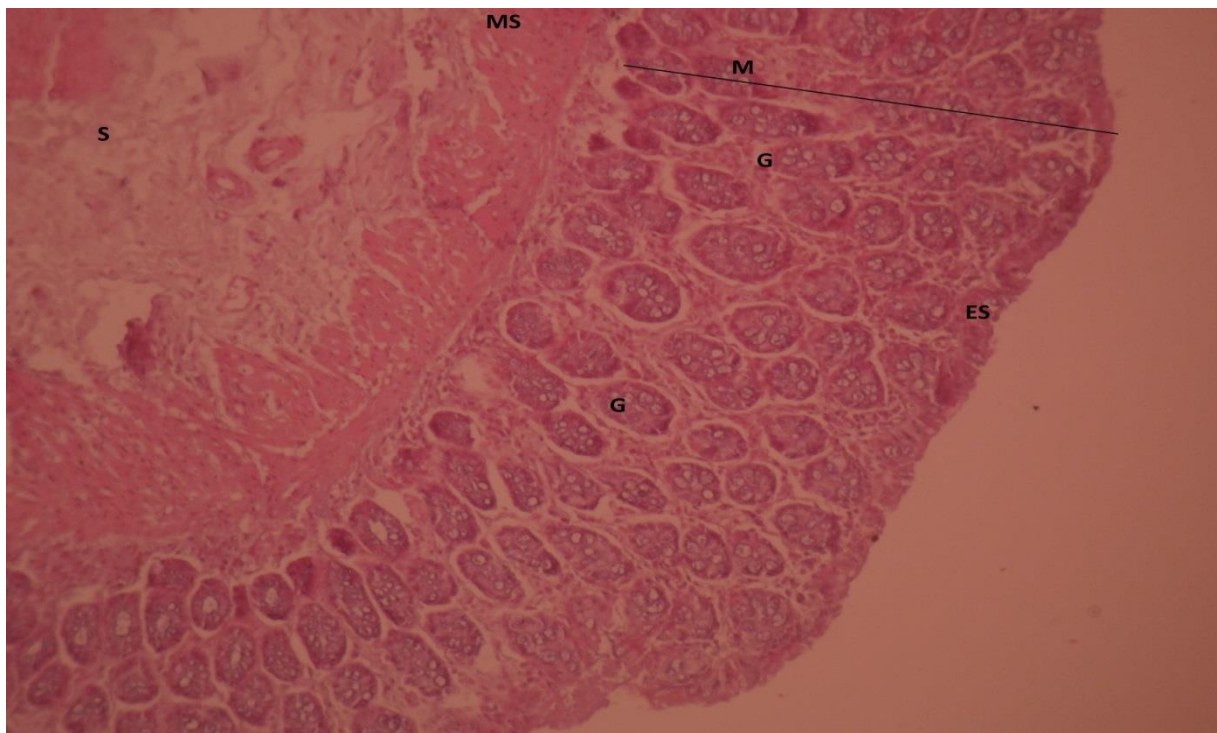


figure44 : rectum témoin HE GX10

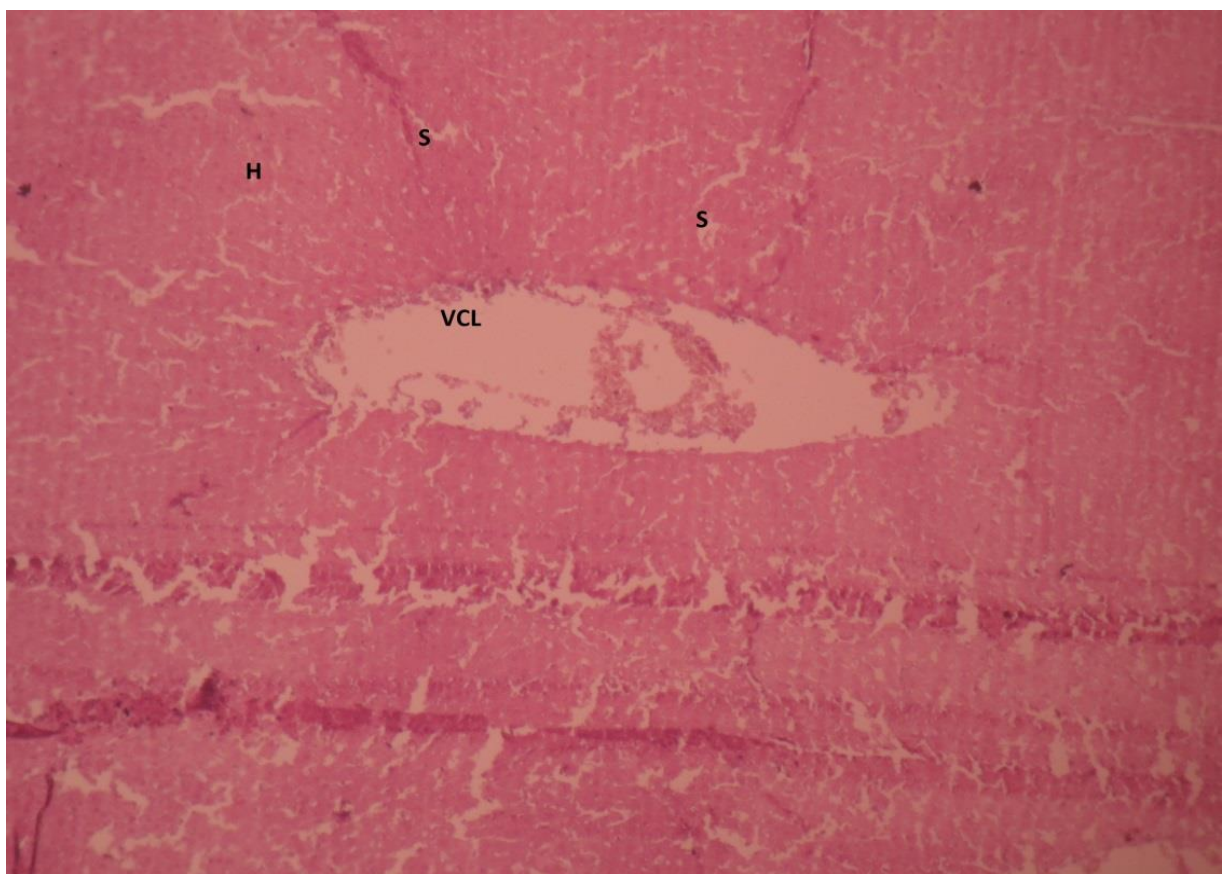


figure45 : foie témoin HE GX10

Légendes :

H : hépatocyte

S : sinusoïde

VCL : veine centrolobulaire

TH : travée hépatocyttaire

SH : sinusoïde hépatique

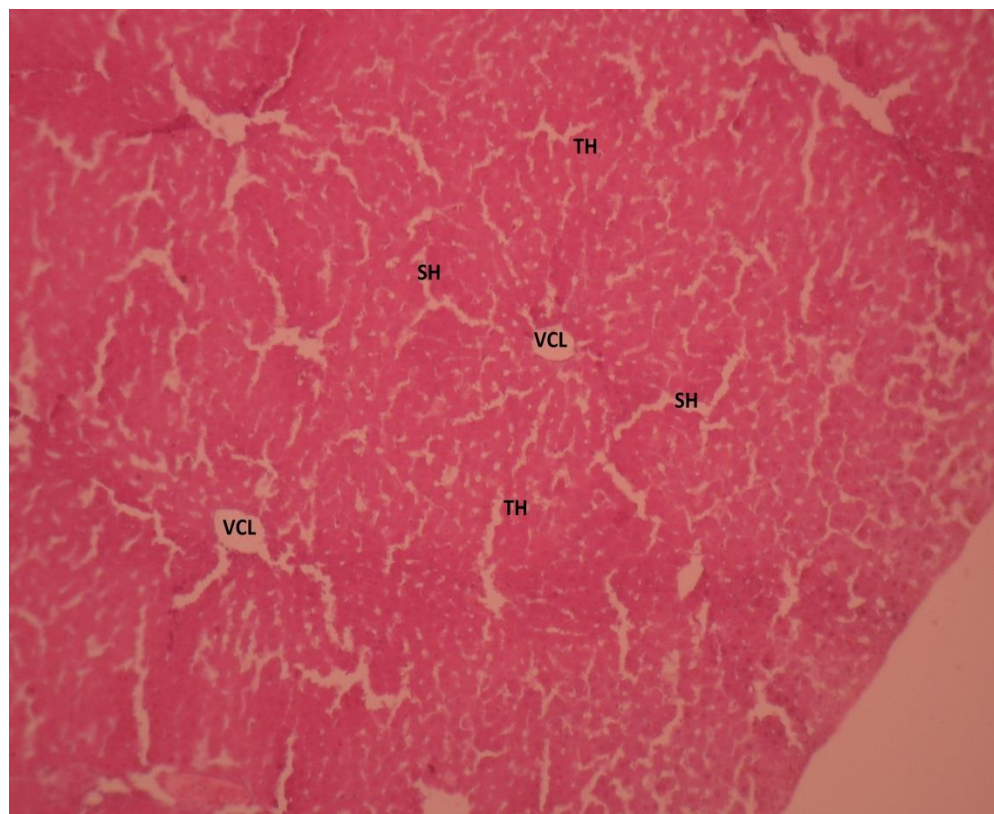


figure46 : foie voie orale HE GX10

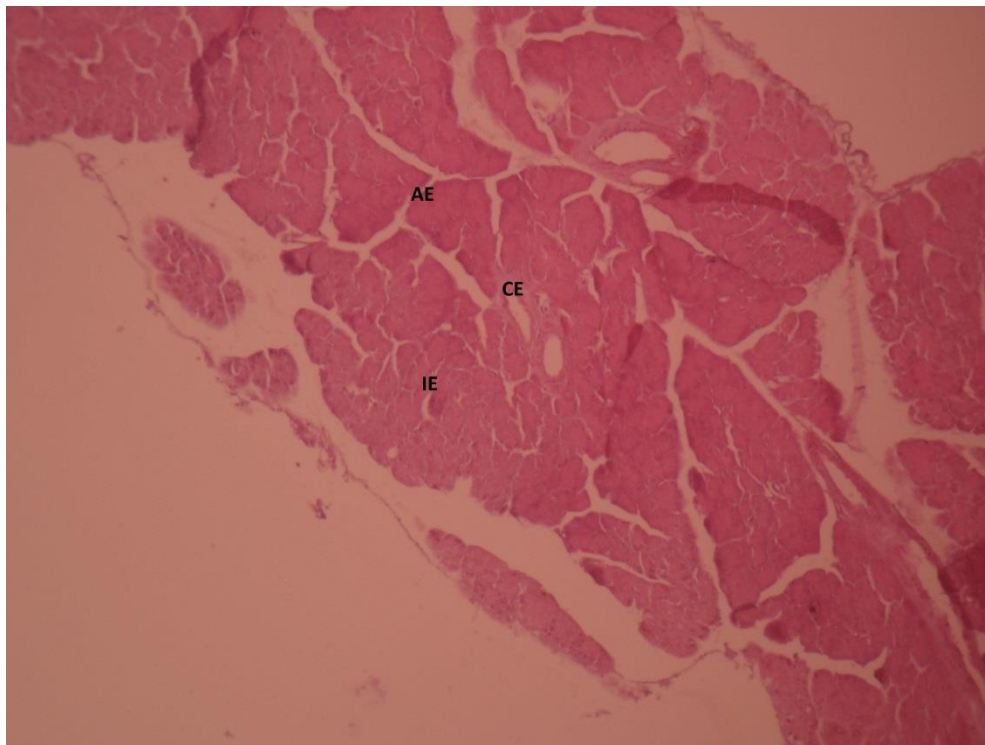


figure47 : pancréas témoin HE GX10

Légenedes :

AE : acini exocrine

CE : canal excréteur

IE : ilots endocrines

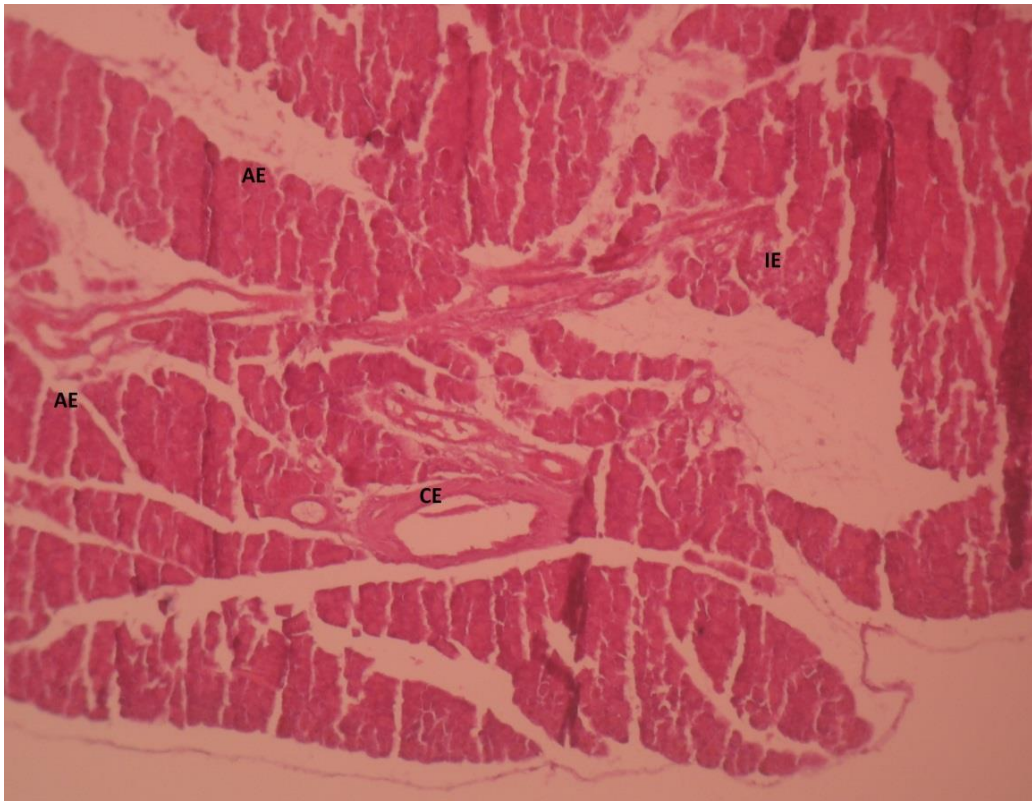


figure48 : pancréas voie orale HE GX10

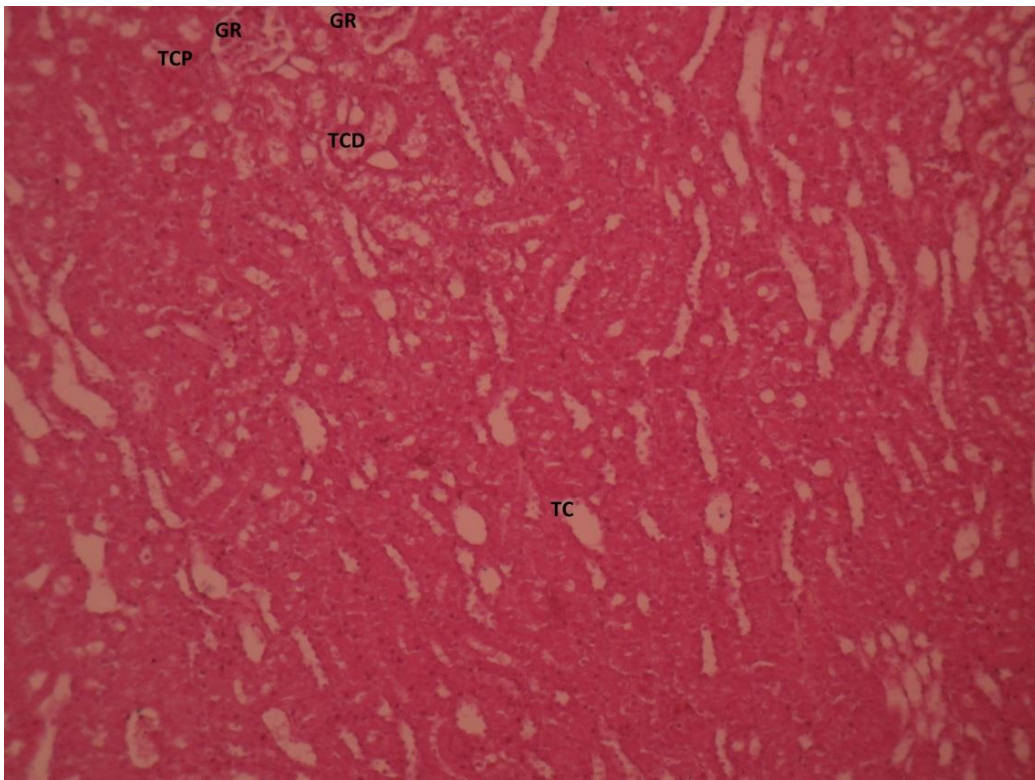


figure49 : rein témoin HE GX10

Légendes :

GR : glomérule rénal

TCP : tube contourné proximal

TC : tube collecteur

TCD : tube contourné distal

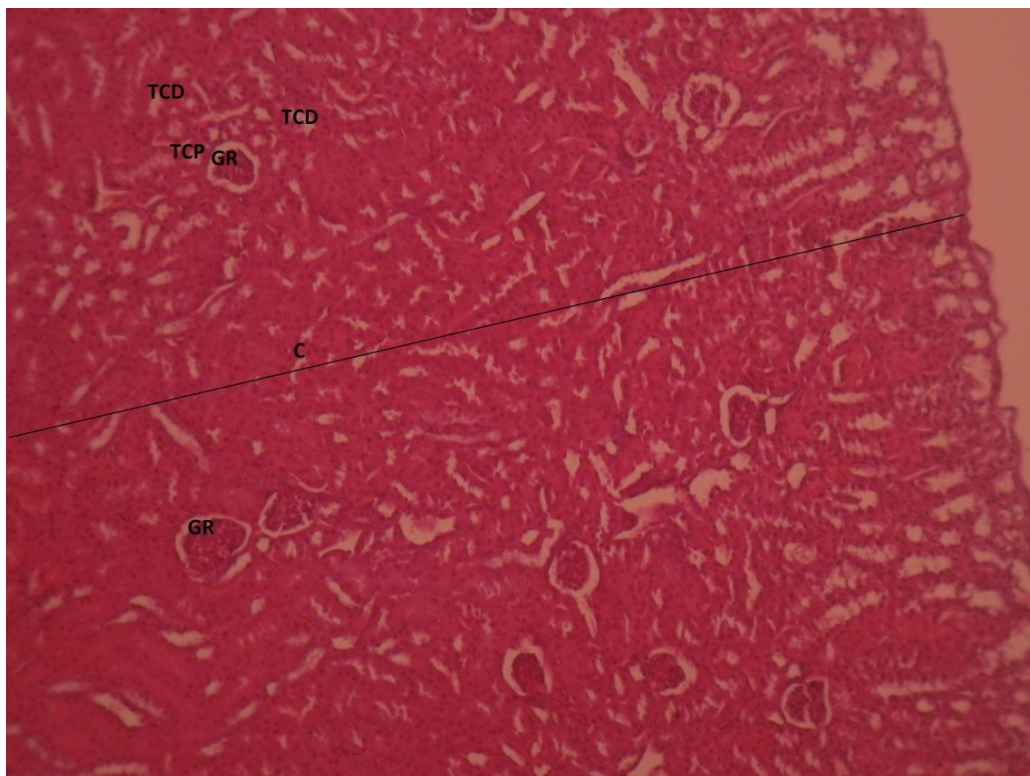


figure50 : rein voie orale HE GX10

Légendes :

GR : glomérule rénal

TCP : tube contourné proximal

TCD : tube contourné distal

C : cortex rénal

✓ Discussion :

Dans ce chapitre, nous allons discuter les résultats obtenus et les comparer à ceux rapportés dans la littérature.

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques et sa diminution témoigne d'une éventuelle souffrance de l'organisme et de la toxicité de la substance administrée. (Hilaly et *al.*2004)

Or durant le suivie de l'évolution pondérale des rats lors de notre expérimentation, aucune variation statistiquement significative n'a été enregistrée entre les rats des lots témoins et essais pour les deux vois d'administration. (Orale, et cutanée)

Cela suggère que l'administration subaiguë par voie orale et cutanée de l'extrait méthanolique de la racine de la plante *C. africana* n'exerce aucun effet négatif sur la croissance des rats Albinos *Wistar*, Or la diminution du poids corporel est l'une des constatations les plus fréquemment observées lors d'une exposition subaiguë à certaines plantes toxiques chez le rat par voie orale. (Campbell, 1989 ; OMS 1999 ; Environmental Protection Agency EPA, 2006), néanmoins des recherches et analyses complémentaires doivent être effectuées.

Dans de nombreuses études toxicologiques, il a été démontré que le foie est la première cible de la toxicité et le premier organe exposé à tout ce qui est absorbé dans l'intestin grêle et donc le premier à souffrir; et cela car il métabolise les substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxiques (Rhiauani et *all*, 2008), mais aussi le rein représentant l'organe de filtration de tout l'organisme est un carrefour par lequel passent toutes les substances toxiques.

Une étude de la fonction rénale et hépatique peut donc s'avérer utiles pour évaluer les effets toxiques des plantes médicinales.

Les résultats du dosage des différents paramètres biochimiques (à savoir : Pal, glycémie, cholestérol, triglycéride, créatinine, protéines totales) et des différents paramètres hématologiques (à savoir : hémocrite (HT), globules rouges (GR), globules blancs (GB), éosinophile, monocyte, lymphocyte, et basophile) au bout des 28jours de notre expérimentation n'ont montré aucune différence statistiquement significative ($p>0,05$) entre les rats témoins et les rats expérimentés pour les deux voies d'administrations : orale et cutanée, cela suggère que l'administration de l'extrait méthanolique de la plante :*C. africanan* n'entraîne pas la modification des taux sériques des paramètres étudiés, ce qui pourrait témoigner de la relative innocuité de notre extrait, ceci est en accord avec les résultats des travaux de recherche de Mr. Jason L. *et all*, en 2011, publiés dans un

article scientifique au : new mexico state university, collège de l'agriculture, consommateurs et sciences de l'environnement , dont le titre s'intitule : « Russian knapweed and yellow star thistle poisonig of horse », étudiant la toxicité dose dépendante des plantes : *Centaurea repens* et *Centaurea solstitialis*, et qui ont démontré que ces deux plantes sont relativement peu toxiques puisque il faudrait que le cheval en consomme une dose correspondante à 85-100% de son poids vif pour que des signes d'intoxications apparaissent.

Plusieurs autres études récentes rapportent les mêmes résultats, et affirment que les plantes du genre *Centaurea* sont peu ou pas toxiques, notamment Mr. Muhittin ARSLANYOLU et *all*, dans leur article publié dans le journal « Ankara Ecz. Fak. Derg., 35 (2) 103-109, 2006' », dont le titre s'intitule : « evaluation of the anti bacterial activity and toxicity of isolated arctiin from the seeds of *Centaurea sclerolepis* », dans lequel ils démontrent que cette plante présente une faible toxicité.

Les résultats obtenus lors de l'étude anatomo histopathologique viennent confirmer notre résultat concernant la toxicité subaiguë de la plante pour les rats et cela car aucune lésion macroscopique et histologique témoignant d'une éventuelle toxicité n'a été constaté pour l'ensemble des organes prélevés.

Par contre, les résultats du dosage des paramètres biochimiques : GOT et GPT au bout des 28jours de notre expérimentation ont montré une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les rats témoins et les rats expérimentaux pour les deux voies d'administrations : orale et cutanée et qui correspond à une diminution du taux sériques de ces deux paramètres pour les rats expérimentaux par rapports aux rats témoins.

La GOT est une enzyme considérée comme un bon indicateur de la fonction hépatique (Hilaly et *al.* 2004) et un biomarqueur pour prédire la toxicité éventuelle. (Rahman et *al.* 2001)

En générale l'élévation des transaminases dans le sang est un indice de dommage des cellules parenchymateuses du foie (Wolf et *al.* 1972). En outre, la GOT trouvée dans le sérum est d'origine mitochondriale et cytoplasmique et toute augmentation peut être prise comme un premier signe de lésions cellulaires qui mène à l'écoulement de l'enzyme dans le sérum (James et *al.* 2010), or nos résultats ont révélé une diminution de ces enzymes chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins, cela peut être expliqué par un éventuel effet hépatoprotecteur et anti oxydant de l'extrait méthanolique de la racine de la plante : *C. africana*.

Plusieurs études récentes et auteurs sont en accord avec notre hypothèse et nous rejoignent en affirmant que les plantes du genre *Centaurea* sont douées d'une propriété hépato protectrice et anti oxydante.

Nos résultats corroborent ceux acquis par Hossam M. Abdallah et all, 2013, qui publient un article scientifique dans le journal « Medicinal Chemistry Research » dont le titre s'intitule : « Protective effect of *Centaurea pallescens* Del. against CCl₄-induced injury on a human hepato macell line (Huh7) », et qui ont démontré l'effet hépato protecteur de la plante ***Centaurea pallescens***.

Mais aussi : Pushplata Krishna deo Chougul et all, publient en 2014 un article scientifique dans le journal « international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences » dont le titre s'intitule « : protective effect of ethanol extract of *centaurea behenlinn* in carbon tetra chloride-induce dhepatitis in rats » démontrant l'effet hépato protecteur et anti oxydant de la plante ***Centaurea behenlinn***.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Dans la médecine traditionnelle, le rôle joué par les plantes est connu depuis fort longtemps, la recherche apporte les preuves scientifiques de leur efficacité, mais aussi de leur toxicité, reposant sur des données résultantes de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*.

Parmi les plantes médicinales traditionnelles il y a celles qui peuvent être toxiques à de fortes doses ou après administration prolongée, en même temps d'être une source de molécules naturelles actives douées de propriétés thérapeutiques, et l'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ses effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer l'abus de son utilisation, ou de son utilisation à tort, c'est la raison pour laquelle, il nous a semblé nécessaire de procéder à l'étude de la sécurité d'une de ces plantes.

Ce présent travail porte sur l'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë d'une plante utilisée en médecine traditionnelle dans les traitements de diverses maladies tant humaines qu'animales notamment dans certaines régions de la Kabylie, le choix de cette plante a été effectué dans la flore médicinale algérienne grâce aux informations fournies par les tradi praticiens, il s'agit de l'espèce *C. africana*, une astéracée endémique à l'Afrique du nord.

Les plantes du genre *Centaurea* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulante, tonique (Ibn-el bitar (1980) Wai, J.M. et all (1962)), antidiabétique (Monya, M. et all (1974), Kaij-A-Kamb et all 1992), diurétique (Gonzalez, A.G et all 1977) et antirhumatismale (Teresa, J.P et all 1986), mais sa toxicité et ses effets indésirables sont encore peu connus, et c'est dans ce cadre que s'est inscrit le présent travail.

L'objectif principal de notre travail est l'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait méthanolique de plante étudiée, chez le rat Wistar.

Au travers de cette étude préliminaire, l'étude de la toxicité aiguë dans un premier temps, a permis de déterminer la DL50, qui a été estimée à une concentration supérieure à 2 g/kg.

Cette valeur le place dans la catégorie IV selon la classification de la toxicité aiguë de l'OMS, qui comporte quatre catégories (allant de hautement toxique : catégorie I, à non toxique : catégorie IV) et permet par conséquent de qualifier notre extrait comme étant non dangereux.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la toxicité subaiguë de cet extrait, les résultats ont démontré que ce dernier ne perturbe pas la croissance des rats, et qu'il n'entraîne pas de variations des paramètres biochimiques et hématologiques explorés, exceptés les deux paramètres : GOT et GPT, pour lesquels on a enregistré une légère diminution chez les rats expérimentaux comparativement au rats témoins, tout en sachant que les résultats de l'étude anatomo histopathologique n'a révélé aucune lésion témoignant d'une éventuelle toxicité, par conséquent nous en concluons que l'extrait méthanolique de la racine de la plante ***C.africana*** est peu ou pas toxique par voie orale et cutanée sur une durée de 28 jours, et qu'au contraire il pourrait présenter des propriétés hépatoprotectrices et anti oxydantes.

Néanmoins, ce travail reste une étape préliminaire quant à l'étude de la toxicité de cette plante, cependant, une investigation plus approfondie et d'autres études plus poussées sont souhaitables pour confirmer ou infirmer nos résultats et élucider certaines zones d'ombres sur la physiopathologie.

Dans ce contexte, il est nécessaire d'envisager d'autres études perspectives orientées vers :

- ✚ Des études pharmacologiques et toxicologiques à plus grande échelle et des tests complémentaires de toxicité sur ***Centaurea africana*** par d'autres voies ;
- ✚ Des études de toxicité chronique sur cette plante, afin de déterminer les effets à long terme ;
- ✚ Des expériences ultérieures utilisant des extraits purifiés pour identifier précisément les composés responsables des éventuelles activités hépatoprotectrices et antioxydantes;
- ✚ Un isolement des alcaloïdes de cette plante et leurs applications dans des essais de toxicité pour une identification plus précise des principes actifs toxiques de cette espèce ;
- ✚ Etudier la toxicocinétique et la toxicodynamie des différents principes actifs de la plante pour compléter notre étude de toxicité.

Annexe I : Rappels anatomo-histologique et physiologique

1- Foie :

1.1-Anatomie :

Le foie est un organe abdominal rougeâtre riche en sang, impair et asymétrique, de 15 à 20g chez le rat. Placé sous le diaphragme, il occupe la plus grande partie des régions hypochondriaque droite et épigastrique et s'étend plus loin à droite qu'à gauche de la ligne médiane du corps. (Marieb E.N, 2005 ; De Bari et *al* ,201)

1.2-Histologie :

Le foie est doté de cellules parenchymateuses et des cellules non parenchymateuses lui conférant une hétérogénéité cellulaire. Ces différents types cellulaires présents dans le foie sont très organisés d'un point de vue architectural et coopèrent pour assurer les différentes fonctions métaboliques et excrétrices de cet organe. (Kmiec Z, 2001 ; Khalil G et *al* ,1954)

Sur le plan histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules.

Les lobules ont une forme hexagonale et sont constitués de travées cellulaires hépatocytaires, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur des quelles cheminent les sinusoides hépatiques. Chaque lacune est ainsi divisée en une sinusoides et un espace péri sinusoidal qui contient les cellules dendritiques et les cellules de Ito .La surface basale des hépatocytes est donc séparée des cellules endothéliales sinusoidales adjacentes par l'espace de Disse, lieu des échanges de substances entre sérum et les hépatocytes.(Sear J, 1992). Ces lobules hépatiques contiennent une veine centrale (veine centrolobulaire), et séparés entre eux par des espaces portes contenant des canaux biliaires, des petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que des vaisseaux lymphatiques. (MacPhee P.J et *al* ,1995 ; Wiss E et *al* ,1985 ; Mann F.C ,1942 ; Wakim K.G.et Mann F.C, 1953)

1.3. Physiologie :

Le foie est une glande endocrine et exocrine qui est séparés en deux lobes.

Placé à l'intersection du tube digestif et des autres organes, le foie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie métabolique générale. Les principales fonctions physiologiques sont présentées ci-dessous (Mac Maillet, 1980 ; Marieb E.N, 2005 ; LE Douaris Nicole, 1968 ; EbelleLottin Mac fredy ,2007) :

- Détoxification des produits de déchets métaboliques.
- Destruction des hématies usées et récupération de leurs constituants.
- Synthèse et excrétion de la bile dans le duodénum par les voies biliaires.
- Synthèse des lipoprotéines plasmatiques.
- Fonction métabolique comme la synthèse de glycogène ou la néoglucogenèse.

2. Pancréas :

2.1. Anatomie :

Le pancréas est un organe situé dans le cadre duodénale comprenant trois parties : tête, corps et la queue et entouré d'une capsule conjonctive qui envoie des travées à l'intérieur du parenchyme formant ainsi des lobules.

C'est une glande amphicrine hétérotypique composées de deux structures distinctes :

A-le pancréas exocrine :

Constitué d'acini et des canaux excréteurs qui ont pour rôle la synthèse des enzymes pancréatiques. (Kohler Ch,2010)

B- Le pancréas endocrine : Ilots de Langerhans

C'est glande endocrine diffuse trabéculaire, prédominant dans la queue du pancréas (1% de l'organe) qui a pour rôle :

- La synthèse d'insuline
- La synthèse de glucagon
- La synthèse de somatostatine

2.2. Histologie :

A-Pancréas endocrine : Ilots de Langerhans :

Ce sont des amas cellulaires arrondis peu colorables en microscope optique en coloration classique (hémalin éosine), de 200 à 400µm de diamètre, dispersés à l'intérieur du pancréas, mêlés aux constituants exocrine entourés d'une fine capsule conjonctive constituée de fibres de réticulines (KohlerCh, 2010).

Le pancréas endocrine est composé de 4 types cellulaires mis en évidence par méthodes immunohistochimiques ou par coloration de Gomori :(KohlerCh, 2010)

- ✓ Cellules B à insuline (70%)
- ✓ Cellules alpha à glucagon (20%)
- ✓ Cellules à somatostatine (5 à 10%)
- ✓ Cellules PP (synthèse d'un polypeptide 1 à 2%)

2.3- Physiologie :

Le pancréas a deux fonctions principales :

- Une fonction exocrine avec production de suc pancréatique, participant à la digestion, et se déversant par le canal de Wirsung ou par un canal accessoire (Santorini).
- Une fonction endocrine avec la production d'insuline et de glucagon, participant à la régulation de la glycémie. (Genève et Jaun, 2007)

3- Rein :

3.1- Anatomie :

Les reins sont des organes pairs de couleurs brun rougeâtre et en forme d'haricot.

Ils sont situés sous le diaphragme, plaqués contre la paroi postérieure de la cavité abdominale, au niveau des premières vertèbres lombaires et de part et d'autre de la colonne vertébrale. (Legrain et al, 1981)

Chaque rein comporte des néphrons situés dans le tissu interstitiel ou cheminent également les vaisseaux et les nerfs.

Chaque néphron comporte plusieurs segments :

- Le glomérule
- Le tube proximal comprend deux parties :un tubule contourné et un tubule droit
- Le tube intermédiaire qui comporte une branche fine descendante et ascendante de l'anse de Henle
- Le tube distal avec 2 parties : un tube droit large constituant la branche ascendante large de l'anse de Henle et un tube contourné qui se jette dans un canal collecteur
- La macula densa, élément de l'appareil juxta glomérulaire, au contact du tube contourné distal et de l'artériole afférente. (Gardner et al, 1993)

Le rein est formé de deux zones distinctes :

- La médullaire.
- Le cortex.

➤ La médullaire :

Elle est formée par 8 cônes (4 à 18) appelés les pyramides de Malpighi dont l'extrémité interne dénommée « papille », fait saillie dans les calices et dont la base externe jouxte le cortex.

➤ Le cortex :

Coiffe la base des pyramides de Malpighi et s'insinue entre les pyramides constituant les colonnes de Bertin.

Le cortex contient des glomérules, le tube contourné proximal et le tube contourné distal (Gardner et *al*, 1993).

3.2-Histologie :

3.2.1-Néphron :

A- Le glomérule :

Il est constitué de deux pôles, un pôle vasculaire avec artère afférente qui se divise en 4 à 6 branches donnant naissance aux capillaires glomérulaires et artère efférente ; et un pôle urinaire formé par le tube contourné proximal. (KohlerCh, 2010)

Il est entouré d'une capsule fibreuse : capsule de Bowman tapissée d'un épithélium : un feuillet pariétal qui forme la limite interne de la capsule et un feuillet viscéral entre les deux feuillets : chambre glomérulaire qui se prolonge au niveau du pôle urinaire.

La lame basale comporte une couche centrale dense (lamina densa lamina rara) qui contient du collagène IV des protéoglycanes et de la fibronéctine. (KohlerCh, 2010)

B-Tube contourné proximal :

La paroi est formée par un épithélium à cellules prismatiques : les néphrocytes, à lumière assez large ; est divisé en trois segments : S1 (partie proximale sinueuse, à proximité du glomérule), S2 et S3 (portion rectiligne ou tube de Schachowa).(KohlerCh, 2010).

C-Anse de Henlé :

A diamètre réduit. Formée de la branche descendante et ascendante. Structure différente selon la position du glomérule. (KohlerCh, 2010)

D-Tube contourné distal :

Formé d'un épithélium cubique sans bordure en brosse ; quelques véhicules apicales, des mitochondries au pôle basal en quantité moindre. (KohlerCh, 2010)

E-Appareil juxta glomérulaire :

Il est formé de trois composants :

- Cellules spécialisées de l'artère afférente
- Cellules mésangiales du lacis
- Cellules de la macula densa du tube distal. (KohlerCh, 2010)

3.2.2-Tube collecteur ou tube de BILLINI :

La paroi est formée de cellules cubiques hautes puis prismatiques ;le cytoplasme fait saillie dans la lumière, il est formée de :

- Cellules claires ou cellules principales sont pauvres en organites et rares microvillosités apicales. Elles sont dotées d'une pompe à sodium
- Cellules sombres ou intercalées sont plus riches en organites ; à membrane basale plissées et microvillosités apicales. Possèdent une pompe à protons. (KohlerCh, 2010)

3.3-physiologie :

Le rein a plusieurs fonctions qui assurent le bon fonctionnement de l'organisme dont :

- Rôle important dans la filtration et l'homéostasie hydro-électrolytique grâce à sa filtration glomérulaire : élimination de nombreux acides comme les acides organiques
- Rôle endocrine (formation de calcitriol = forme active de la vitamine D)
- Synthèse d'EPO (érythropoïétine) et de rénine. (Hennen, 1996)

Annexe II : MATERIEL D'ETUDE

1. Matériel d'études :

1.1. Matériel biologique :

- **Animaux :**

Pour effectuer les essais toxicologiques, le choix de l'animal est particulièrement important. (Brikci ; 1989)

Les animaux de laboratoire utilisés dans cette étude sont des rats mâles de souche Wistar âgés de 3 mois, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger.

Le rat est le modèle expérimental le plus utilisé pour tester la toxicité des produits chimiques ; vu que l'incidence des malformations spontanées est moins importante chez le rat.

Plusieurs caractéristiques font du rat **Wistar** un modèle intéressant dans les études à long terme.

Il est facile à manipuler si on l'aborde correctement ; s'habitue au manipulateur et tolère le gavage ; son poids permet de nombreuses investigations ; intelligent ; moins grégaire et moins photophobe que la souris ; sa grande disponibilité favorise la constitution de lots de taille compatible aux évolutions statistiques des données expérimentales et sa longévité (2 à 3 ans) permet une étude tout au long de la vie de l'animal. (Laroche et Rousselet, 1990)

➤ **Systématique du rat Wistar :**

Règne : Animal

Embranchement : Vertébrés

Classe : Mammifères

Ordre : Rongeurs

Genre : *Rattus*

Espèces : *Rattus novregicus*

Souche : *Wistar*

Nom commun : Rat blanc (Albinos). (Berkenhout , 1769)

tableau 2 : Caractéristiques des animaux utilisés :

Espèce	Souche	Sexe	Poids moyen	Age	Nombre
Rat albinos	<i>Wistar</i>	Mâles	180 ±20g	3mois	24

- **Conditions d'élevage :**

Les rats de l'expérience, sont élevés dans l'animalerie du CRD-Saidal, dans des cages solides en plastique dans des conditions suivantes :

Température : 24 +/- 2°

Degrés d'hygrométrie (humidité) : 55 +/- 1%

Eclairage : l'éclairage est naturel maintenu 12/24 heures, la période de la lumière débute à partir de 7 heures de matin.

- **Régime alimentaire :**

Les rats recevaient un régime alimentaire standard, équilibré sous forme de granulés provenant de l'ONAB (office national des aliments de bétail) et de l'eau de robinet donnée dans des biberons, ce régime est installé sur la cage pour une consommation à volonté.

tableau 3 : composition d'un régime alimentaire des rats :

Aliment	Glucides	Protéines	Lipides	Minéraux et vitamines	Boissons
Quantité (%)	49.80	23.50	05.00	05.70	Eau de robinet



Figure 11: rat dans les cages (photo personnelle)

- **Plante :**

Notre étude a porté sur les racines de la plante ***Centaurea africana*** durant le mois de juin 2014 dans la région de la Kabylie et plus précisément à DRAA EL MIZANE.

L'identification a été réalisée selon QUEZEL ET SANTA 1963 par Mme BENMOKHTAR maitre assistante en botanique médicale, département de pharmacie, faculté de médecine.



Figure 12 : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce *Centaurea africana*

1.2. Matériel non biologique :

- **Matériel d'élevage :**

- ✓ Cage en plastique
- ✓ Biberons
- ✓ Eau de robinet

- **Matériel d'administration et de prélèvement :**

- ✓ Verreries classiques du laboratoire (béchers, pipette, micropipette,...)
- ✓ Sonde de gavage

- **Matériel de prélèvement**

- ✓ Tubes héparines
- ✓ Tubes E.D.T.A
- ✓ Tubes capillaires
- ✓ Coton

- **Matériel d'autopsie et préparation de lames :**

- ✓ Trousse à dissection (ciseaux, pince, lame bistouris,...)
- ✓ Béchers
- ✓ Boîtes de pétries
- ✓ Coton

- **Matériel anatomohisto pathologique :**

tableau 4 : appareillages et équipements

Appareils	Marques
Etuve	Memmert®
Congélateur	EXCELLENCE®
Microtome	LEICA®
Bain-marie	NUVE BATH®
Microscope photonique pour la lecture	ZEISS® axiostarplus

tableau 5 : produits chimiques et réactifs :

Réactifs et produits chimiques	Firmes
Formol	PANREAC
Xylène	SIGMA-ALDRICH
Alcool (75°,95°100°)	SIGMA-ALDRICH
Paraffine	LEICA
Hemalun	SIGMA
Eosine	-----
Baum de fixation	EUKITT
Eau distillée stérile (flacon 500 ml)	IPA
Ether	-----

tableau 6 : consommable

Consommable	Marque
Cassettes d'inclusion	LEICA®
Moules d'inclusion métallique	LEICA®
Lames et lamelles	Cytoglass®/ AZS laboratoire
Lames couteau	LEICA®

Adeneye et al. 2006

Ahmed, 1995 : dans : plantes médicinales et aromatiques dans le monde arabe, l'agriculture et la fabrication de plantes médicinales dans le monde arabe. Institution arabe pour les études et publication, p: 2-22.**Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie Option : Biochimie appliquée Thème Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubium vulgare L.

Alain CARILLON 2009 source d'information article de «Christian Duraffourd – Jean-Claude Lapraz -Traité de Phytothérapie Clinique– Editions Masson– Paris 2002 ,Médecines Traditionnelles : Besoins croissants et potentiel – Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments- n°2 mai 2002 – WHO/EDM/2002.4 – OMS 2002 , Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle (2002-2005) –WHO/EDM/TRM/2002.1- OMS 2002 »

A.Sanon, M.Garba, J. Auger, J. Huiganrt, Journal of Stored Products Research, 2002, 38, 129 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , spécialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L., 2006. Flora of north America Asteraceae. 19, 3-69. **Repris par** : Mlle MOUFFOK Soumia dans son mémoire en vue d'obtention du Magister en chimie organique theme Etude des métabolites secondaires de Centaurea pubescens ssp. Omphalotricha (Asteraceae).

Bayer, R. J., Starr, J. R., (1998). Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences. 85, 242-256.**Repris par** : Mlle MOUFFOK Soumia dans son mémoire en vue d'obtention du Magister en chimie organique theme Etude des métabolites secondaires de Centaurea pubescens ssp. Omphalotricha (Asteraceae).

Beauquesne:Ann. pharm. franc. 4, 271. (1946.) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibis Press. **Repris par** : Mlle MOUFFOK Soumia dans son mémoire en vue d'obtention du Magister en chimie

organique theme Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae).

BENGHANOU M., 2012. La phytothérapie entre la confiance et mefiance. Memoire

Professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA

(Alger): 56. repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat, spécialité chimie organique et catalyse, thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Berkenhout, 1769, the taxonomy and karyology of *Rattus norvegicus*. Tr.J.of zoology.Turkey 22:203-212.

Bismuth et al., 1987 :Bismuth C.; Baud F. ; Fréjaville P.P. ; Garnier R., 1987: Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, p 956, **Repris par :** Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. »

Braunschweig. 1949-) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Brikci ; 1989.

Brunetton .J Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier - Tech. & doc, 1987, 584 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , spécialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES.

Campbell, 1989 ; OMS 1999 ; Environmental Protection Agency EPA, 2006

Chemat .F et al ; 2007.

Chkarnat .C, 2013

Clarke et Clarke, 1977.

CSST, 2004 : CSST (Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec), 2004 : Notion de toxicologie. Bibliothèque nationale du Québec ; 2e édition. **Repris par :** Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. »

De Bari B, Pointreau Y, Rio E, Mirabel X, Mornex F (2010). Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: liver cancer/ radiothérapie ; **14:** 344-349.**Repris par :** Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

DEHAK K ; 2013.

Diamand et al., 1970: Diamand, L., Doluisio, J., Crouthamel, W., 1970. Physiological factors affecting intestinal drug absorption. Eur. J. Pharmacol 11, 109.**Repris par :** Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

Eder, Bùchi, Flück et Kâsermann: Kommentar zur Ph. Helv. V.(1947.) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Elqaj et al, 2007 : Dans : La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc. **Repris par :** Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie Option : Biochimie appliquée Thème Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L.

Farnsworth et al, 1986 : dans : Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 64 (2) : 159-164.**Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie Option : Biochimie appliquée Thème Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubiumvulgare L.

Fleurentin J., Pelt J.M., (1990) Les plantes médicinales La Recherche, 21, 222, 810-818.

Gardner, Gray D.Y, O'Rahilly R, (1993). Anatomies, Adaptation Française de Jean Bossy volume2, DOIN éditeurs : 786. **Repris par** : Mme TAMIN Fatima dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en biologie Option Génie Biologique sur le thème Impact du Romectin sur les paramètres hormonaux thyroïdiens (tsh et ft4) et néphrotoxicité (aspect biochimique et histopathologique) chez le rat Wistar mâle.

GHABRIER J. Y., 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , specialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Gilles Lapointe, Ph. D ; 2004 : Lapointe, G., 2004 : Notions de Toxicologie. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, Québec. 67 p., **Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubiumvulgare L. »

Gonzalez, A.G., Bermejo, J., Caberar, J., Gahido, A. and Massnet,G.N. 1977). Ann.Quim., 73,86.

Gurib-Fakim, 2006 : dans : Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, Molecular Aspects of Medicine 27, 1-93.**Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie Option : Biochimie appliquée Thème Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubiumvulgare L.

Harborne, J.B. (1994). The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge

Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000). Phytochemistry 55(6): 481-504

Hennen G, (1996). Biochimie humaine. De Boeck université : 784. **Repris par** : Mme TAMIN Fatima dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en biologie Option Génie Biologique sur le thème Impact du Romectin sur les paramètres hormonaux thyroïdiens (tsh et ft4) et néphrotoxicité (aspect biochimique et histopathologique) chez le rat Wistar mâle.

Hilaly ET al .2004

Hirst:J. chem. Soc. London 1942, 70. repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Hirst et Jones: J. Soc. Dyers and Colourists 63, 249. (1947.) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Hossam M. Abdallah et all, en 2013, dans un article scientifique dans le journal « Medicinal Chemistry Research » dont le titre s'intitule : « Protective effect of Centaurea pallescens Del. against CCl4-induced injury on a human hepato macell line (Huh7) »

Ibn-el bitar (1980). Mofradat Al-Adwiah Wa Al-Agzia, Al-Zharia, Press Cairo, 148.

James et al, 2010.

J.Q. Cu; 1990.

Jaretzky et Bereck: Arch. Pharm. 276, 27. (1938.)repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Jaretzky: Lehrbuch der Pharmakognosie. II. Auflage. Vieweg & Sohn, repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Jason L. et all, en 2011, dans un article scientifique au : new mexico state university, college de l'agriculture, consommateurs et sciences de l'environnement , dont le titre s'intitule : « Russian knap weed and yellow star thistlepoisonig of horse »

Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M. and Girrel, L. (1992). Pharma.Acta.Helvena, 67, 178.

Khalil G, Wakim, M.D, Kochesler, Minnesota. (1954). Physiology of the liver. American journal of medecine.256-271. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé..

Kmiec Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. Adv .Anat.Embryol.Cell.Biol; 161: 1-151. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Kohler Ch,(2010). Collège universitaire et hospitalier des histologistes, embryologistes, cytologistes et cytogénéticiens (CHEC). Université Médicale Virtuelle Francophone.

Kühnau, J. (1976). Wld. Rev.Nutr.Diet. 24: 117-191.

Laroche et Rousselet, 1990.

Laroche et Rousselet ,1990 ; Bourdon et Marchal, 1973).

Lauwerys, 2003 : Lauwerys, R.R., 2003. Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles, Ed MASSON, Paris, p.12.**Repris par** : Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

Le Douaris Nicole. (1968). Synthèse du glycogène dans les hépatocytes en voie de différenciation : rôle des mésenchymes homologue et hétérologues. DEVELOPIMENTAL BIOLOGY : 17 : 101-114. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la

vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Legrain M, Suc J.M, Durand D, Lebon P, Jacobs CL, Tonthat H (1981). Néphrologie: sciences et techniques-Médecine Néphrologie Reins. 2ème edt Masson, paris: 390. **Repris par** : Mme TAMIN Fatima dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en biologie Option Génie Biologique sur le thème Impact du Romectin sur les paramètres hormonaux thyroïdiens (tsh et ft4) et néphrotoxicité (aspect biochimique et histopathologique) chez le rat Wistar mâle.

Lucchesi .M.E et al, 2007.

MacPhee P.J, Schmidt E.E, Groom A.C.(1995). Intermittence of Blood Flow in liver sinusoids, Studied by High-Resolution in Vivo Microscopy. Am J Physiol; **269** (5,1): G692-8. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Mann F.C.(1942). The circulation of the liver. Quart. Bull. Indiana Univ. M. center; **4**:43. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Medjroubi, K. (1999). Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri-Constantine

Mishio T, Houma, Iwashina T,(2006). Yellow flavonoids in *Centaurea ruthencia* flower pigments. Biochemical systematic and ecology. 34,108-184. **Repris par** : Mlle ZEKIRINI Khadidja et TOUATI Nesrine dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de docteur vétérinaire thème contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité cicatrisante d'extrait hydro alcoolique de la racine de *Centaurea Africana*.

Monya, M. and RACZ, G. (1974). Plantes Médicinales et Phytothérapie, 8,126.

M. Paris, M. Hurabielle; et al ; 1986.

Muhittin ARSLANYOLU et all, dans leur article publié dans le journal « Ankara Ecz. Fak. Derg., 35 (2) 103-109, 2006' », dont le titre s'intitule : « evaluation of the antibacterial activity and toxicity of isolate darctiin from the seeds of *Centaurea sclerolepis* »

Mukinda et Syce, 2007.

Nait Said. N ; 2007.

Olson et al. 2000.

Omar Abdul Razzaq et Mohamed El Sayed haykle, 1993: dans : plantes médicinales et aromatiques deuxième édition, installations connaissances d'Alexandrie, p: 13-134. **Repris par :** Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie Option : Biochimie appliquée Thème Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L.

O'Sullivan: J. chem. Soc. London 45, 41 (1884); 52, 1029. (1891.) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

PELT J. M., 1980. Les drogues, leur histoire et leurs effets. Édition Doin, Paris: 221 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , spécialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Pringsheim: Z.physiol. Chem. 140, 301. (1924); 164, 117. (1925); Ann. Chem. 460, 32. (1928.) repris par RAYMOND AELLIG en vue de l'obtention du grade de docteur sciences naturelles, these : Etudes sur le dosage pharmaceutique de quelques drogues à mucilages

Pushplata Krishna deo Chougul et all, en 2014 dans l'article scientifique dans le journal « international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences » dont le titre s'intitule « : protective effect of ethanol extract of *centaurea behenlinn* in carbon tetra chloride-induced hepatitis in rats »

Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris. **Repris par** : Mlle MOUFFOK Soumia dans son mémoire en vue d'obtention du Magister en chimie organique theme Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae).

Quezel, P and Santa, S, (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions désertiques méridionales. Tome II édition CNRS, Paris. **Repris par** : Mlle ZEKRINI Khadidja et TOUATI Nesrine dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de docteur vétérinaire thème contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité cicatrisante d'extrait hydro alcoolique de la racine de *Centaurea Africana*.

Quezel, P. et Santa, S. (1963): Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques

Méridionales, Tome II, Edition CNRS, Paris.

Ramade, 1979 : Ramade, F., 1979. Ecotoxicologie, Ed Masson, Paris, pp. 5.**Repris par** : Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

Rahman et al. 2001.

Reidenberg, 1974 : Reidenberg, M., 1974. Kidney disease and drug metabolism. Med. Clin. N. Am 58, 1059.**Repris par** Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

René Paris ; 2014.

Rhiouani et al. 2008

Rolland, 1988 : Rolland A., 1988 : Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'*Eschscholtziacalifornia*, Doctorat de l'université de M et z, mention pharmacognosie, p 441., **Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubiumvulgare* L. »

Ruckebusch, 1981 : Ruckebusch Yves, 1981: Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. 2e Edit., **Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de Marrubiumvulgare L. »

Sadok Gahbiche 2008 [archive et "MEDICINE IN ANCIENT EGYPT" Health Technology Assessment (HTA) Phytothérapie (p. 15–24), publié en 2005

SANAGO R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , spécialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

SARNI-MANCHADO P., VERONIQUE C., 2006. Les polyphénols en agroalimentaires.

Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France): 398 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat, spécialité chimie organique et catalyse, thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES

PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Sear J.(1992). Anatomy and physiology of the liver. Baillider's Clinical Anaesthesiology; **6(4):** 7020-1736. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son Mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Serge Rafal 2008 : "Le grand guide des médecines douces " du Docteur Serge Rafal (édition marabout 2008) (généralités phytothérapie)

Shubik et Sicé, 1956 ;Truhaut, 1956 : Shubik P. et Sicé J., 1956: Chemical carcinogenesis as a chronic toxicity test. Cancer Res., 16, 728., **Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubiumvulgare* L. »

Silbergeld, 2000 : Silbergeld, E. K., 2000 : La Toxicologie : Introduction. In Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail.Vol 1 (edited by J. M. Stellman). Organisation Internationale du Travail, Genève.pp 33.2-33.3, **Repris par** : Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème« Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubiumvulgare* L. »

Sivropoulou. A, et al; 1996

Tech, Doc ; 1987.

Tedder J.M. ; 1970

Teresa, J.P., Caballero, E., Anaya, J., Caballero, M.C. and Gonzalez, M.S. (1986). Phytochemistry, 25, 1365.

Tilkian, 1979.

Touil . A et al ; 2003.

Trease, G.F.and Evans, W.C. (1983), Pharmacognocny, 225,514, Bailliére, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico city, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong.) **Repris par** :Mlle ZEKRINI Khadidja et TOUATI Nesrine dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de docteur vétérinaire thème contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité cicatrisante d'extrait hydro alcoolique de la racine de *Centaurea Africana*.

Trease, G.E. and Evans, W.C. (1983): Pharmacognosy, 225, 514, 12th Edition Bailliére Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong

Trevoux et al. 2000 ; Saad et al.,2006 : Trevoux R.; Arnal-Schnebelen B. Schnebelen J., 2000 : Interaction médicamenteuses, Interaction entre les plantes médicinales et la médecine traditionnelle. Actualités reproduction humaine ; VIII (1) : 28- 32., **Repris par :** Mlle BENSALAH Fouzia dans son mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option biochimie appliquée Thème « Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. »

Tulsawani, 2010

V. A. Kurkin, Chem. Nat. Compd. 2003, 39,123 repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , spécialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES.

Vernex-Lozet, 2011.

Volak J, Stodola J.(1983). Les plantes médicinales. Ed. Grund. **Repris par :** Mlle ZEKIRINI Khadidja et TOUATI Nesrine dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de docteur vétérinaire thème contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité cicatrisante d'extrait hydro alcoolique de la racine de *Centaurea Africana*.

Wai, J.M. and Breyer-Brandwijk M.G. (1962). The Medicinal and Poisonous Plants of Southerm and Easter Africa, Livingstone, Edinburgh, 210

Wakim K.G et Mann F.C.(1953). The blood supply of the normal liver. Proc. Staff Meet. Mayo Clin, 28:218. **Repris par :** Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Wallace Hayes, 2008 :Wallace Hayes, A., 2008. Principle and methods of toxicology.Ed Tayler& Francis, New York, p. 1134.**Repris par :** Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

We pierre, 1981 : Wepierre, J., 1981. Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire. Ed Masson, Paris, p. 203.**Repris par** : Mlle BOUSSAHEL Soulef dans son mémoire de Magister Spécialité : Biologie et Physiologie végétale Option: Valorisation des ressources végétales Thème « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif »

WICHTL M., ANTON R., 2009. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, Science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris: 38, 41. repris par Abderrahim EL HAIB dans son mémoire en vue l'obtention du Doctorat , specialité chimie organique et catalyse , thème VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES

Wisse E, De Zanger R.B, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey R.S.(1985). The liver Seive : Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse Hepatology :5(4) :683-92. **Repris par** : Melle DJEGHLAF Akila et Mlle AKOUM Nassira dans son mémoire en vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la nature et de la vie Option Génie biologique et innovation technologiques Thème effets du venin d'*Androctonus australis hector* sur le foie isolé.

Wolf et al, 1972.

Résumé :

Centaurea africana est une plante médicinale endémique aux pays de l'Afrique du nord, elle est bien connue par son utilisation traditionnelle dans certaines régions d'Algérie dans le traitement des blessures, des brûlures et de la cicatrisation cependant très peu d'études relatives à la toxicité de cette plante ont été réalisées. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë de cette plante dans le but d'approfondir nos connaissances sur ses effets indésirables notamment, avoir une bonne approche de sa toxicité. L'objectif de ce travail était dans un premier temps l'étude de la toxicité aiguë, qui avait permis de déterminer la DL50, qui a été estimée à une concentration supérieure à 2 g/kg, cette valeur le place dans la catégorie IV selon la classification de la toxicité aiguë de l'OMS, qui comporte quatre catégories (allant de hautement toxique : catégorie I, à non toxique : catégorie IV) et permet par conséquent de qualifier notre extrait comme étant non dangereux. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la toxicité subaiguë de cet extrait, les résultats avaient démontré que ce dernier ne perturbe pas la croissance des rats, et qu'il n'entraînait pas de variations des paramètres biochimiques et hématologiques explorés, tout en sachant que les résultats de l'étude anatomo histopathologique n'avaient révélé aucune lésion témoignant d'une éventuelle toxicité, ces résultats viennent confirmer ceux déjà établis à travers d'autres études concernant les plantes du genre *Centaurea*.

Mots clés : *Centaurea africana*, toxicité aiguë, toxicité subaiguë.

Abstract :

Centaurea africana is an endemic medicinal plant to the countries of North Africa, it is well-known by its traditional use in certain areas of Algeria in the treatment of the wounds, of the burns and of the cicatrization however very few relative studies to the toxicity of this plant were carried out. This is why we were interested in the evaluation of acute and subacute toxicity of this plant with an aim. approach to its toxicity, the objective of this work was initially the study of acute toxicity, which had determined the LD50, which was estimated at a concentration greater than 2 g / kg, this value instead in category IV according classification of acute toxicity of OMS, which has four categories (ranging from highly toxic class I, non-toxic: category IV) and therefore allows our extract qualify as non-hazardous, secondly, we studied the subacute toxicity of this extract, the results had shown that it does not disturb the growth of rats, and it did not lead to changes in biochemical and hematological parameters explored, knowing the results of the histopathological study anatomy had not revealed any lesion indicating a possible toxicity, these results confirm those already established through other studies of plants of the genus *Centaurea*.

Keywords: *Centaurea africana*, acute toxicity, subacute toxicity.

ملخص

قنطريون افريكانا من النباتات الطبية المستوطنة في دول شمال أفريقيا، و المعروفة جيدا للاستخدام التقليدي في مناطق معينة من الجزائر في علاج الجروح والحروق والتآلم الجروح، ولكن دراسات قليلة جدا أجريت على سمية هذا النبات . مما دفعنا للاهتمام في تقييم سميته الحادة وتحت الحادة من أجل تعميق معرفتنا من آثارها السلبية على وجه الخصوص نهج جيد لسميته، الهدف من هذا العمل في البداية دراسة السمية الحادة و التي حددت جرعتها المتوسطة و قدرت بتركيز اكبر من 2 غ\كغ هذه القيمة صنفها ضمن الفئة الرابعة للسمية الحادة وفقا لتصنيف منظمة الصحة العالمية. التي تتألف من اربع فئات (تتراوح من الاشد سمية "الفئة الاولى" الى الغير سامة "الفئة الرابعة") و بالتالي يسمح لنا بوصفها بغير سامة. ثانيا، قمنا بدراسة سمية تحت الحاد من

هذا المقتطف، النتائج أظهرت أنها لا تخل نمو الفئران، وأنها لم تؤدي إلى تغييرات في القياسات البيوكيميائية والدموية ، مع العلم ان نتائج التشريح دراسة الأنسجة لا تكشف عن أي آفة يدل على السمية المحتملة، وتؤكد هذه النتائج تلك التي أنشئت بالفعل من خلال دراسات أخرى من النباتات من جنس قنطريون.

كلمات البحث: قنطريون افريكانا، سمية حادة، سمية تحت الحادة.