

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach - Alger

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de **Magister en Sciences Agronomiques**

Option : Alimentation et nutrition

Département : Technologie alimentaire

Thème

**Etude de l'effet protecteur de l'extrait d'*Artemisia campestris*
sur le stress oxydant induit chez le rat par le tétrachlorure de
carbone (CCl₄)**

Présenté par : M^{elle} BERROUANE Nour El Houda

Soutenu le : 18/01/2014

Jury:

Président: M. HAZZIT M.

Maître de conférences A à l'ENSA

Promoteur: M. BENCHABANE A.

Professeur à l'ENSA

Examineurs: Mme FERHAT Z.

Professeur à l'ENSA

M. BITTAM A.

Maître de conférences A à l'ENSA

Promotion: 2012-2013

RESUMÉ

Artemisia campestris est une plante médicinale très répandue dans le sud algérien appartenant à la famille des Astéracées, elle est connue sous le nom de « Dgouft ». Les extraits aqueux et éthanoliques ont été obtenus par macération à chaud et par extraction au soxhlet respectivement. Les rendements sont de **12,08%** pour l'extrait aqueux et de **14,9%** pour l'extrait éthanolique. La teneur en phénols totaux déterminée par le réactif de Folin-Ciocalteu est de **81,25** et **205,35** mg Eq AG/g d'extrait dans les extraits aqueux et éthanolique, respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode du trichlorure d'aluminium, leur teneur est de **13,64** et **28,56** mg Eq quercétine/g d'extrait dans les extraits aqueux et éthanolique, respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes *in vitro* : la méthode de réduction du radical libre DPPH et celle du pouvoir réducteur. Pour le premier test, l'IC50 a été estimée à **191,68 mg/l** pour l'extrait aqueux, à **27,8 mg/l** pour le BHT et à **9,97 mg/l** pour l'extrait éthanolique, par contre le second test a montré un faible pouvoir réducteur des deux extraits par rapport au BHT.

L'étude *in vivo* a porté sur 24 rats répartis en quatre lots de six rats chacun, l'expérimentation a duré 30 jours. Le lot témoin et le lot 01 ont reçu une dose quotidienne de paraffine et d'extrait aqueux d'*A.campestris* respectivement, tandis que les lots 02 et 03 ont reçu la même dose que les lots témoin et 01, respectivement ; plus une dose orale de CCl₄, 24h avant chaque sacrifice.

Les analyses des marqueurs biochimiques du bilan hépatique (ASAT, ALAT, PAL et Bilirubines) ont enregistré des teneurs élevées en ces derniers pour le lot 02 ; par contre, les rats prétraités par l'extrait aqueux et intoxiqués au CCl₄, ont montré une diminution.

Mot clés:

Artemisia campestris, polyphénols, toxicité, CCl₄, bilan hépatique

SUMMARY

Artemisia campestris is a medicinal plant belonging to the *Asteraceae* family, also known by the name of « Dgouft ». This species is wide-spread in the Algerian south.

The aqueous and ethanolic extracts were obtained using hot maceration and soxhlet extraction respectively, leading to a yield of **12.08%** for the aqueous extract and **14.90%** for the ethanolic extract. The phenol content determined with Folin-Ciocalteu reagent represents **81.25** and **205.35** mg AG/g of extract in aqueous and ethanolic extracts respectively. The flavonoid content was obtained following the “aluminium trichloride method” which leads for the aqueous and ethanolic extracts to **13.64** and **28.56** mg eq quercetin /g of extract. Two different methods were performed in vitro for the antioxidant activity: the free radical DPPH and the reduction power. For the first test, the CI50 were estimated to **191.68** mg/l for the aqueous extract, **27.8** mg/l for the BHT and **9.97** mg/l for the ethanolic extract. However, the second test had shown a weak extracts reduction power compared to the BHT. The “*in vivo*” study used rats divided in 4 batches of 6 rats each, for a period of 30 days. The model batch and the batch 01 have received a daily dose of paraffin and *A.campestris* aqueous extract respectively, whereas the batches 02 and 03 received in addition, an oral dose of CCl₄, 24 hours before every sacrifice. The biochemical markers analyses of hepatic check up (ASAT, ALAT, PAL and bilirubin) registered high contents for these markers for batch 02 when aqueous extract pretreated rats and CCl₄ intoxicated showed a reduction on the biochemical markers.

Key Words

Artemisia campestris, polyphenols , Toxicity, CCl₄, Hepatic check-up.

الملخص

Artemisia campestris نبتة طبية تنتمي لعائلة *Astéracées* معروفة بإسم " دقوفت " منتشرة بكثرة في الجنوب الجزائري

المستخلصات المائي و الإيتانولي مستخرجة عن طريق الإنحلال بالحرارة و مستخلصة بواسطة Soxhlet على التوالي. المرود بالنسبة للمستخلص المائي يقدر ب 12.08 % و ب 14.9 % للمستخلص الإيتانولي. تم تحديد محتوى الفينول الكلي بواسطة كاشف **Folin-Ciocalteu** قدرت قيمته ب 81.25 و 205.35 مغ معادل لحمض الفاليك /غ من المستخلص في المستخلصات المائي و الإيتانولي على التوالي. تم تقييم كمية الفلافونويد باستعمال طريقة ثلاثي كلورور الألمنيوم و قيمته تعادل 13.64 و 28.56 مغ مكافئ كرسيتين/غ من المستخلص في المستخلصات المائي و الإيتانولي على التوالي. تم تقدير النشاط ضد الأكسدة باستخدام طريقتين مختلفتين في المختبر (*In vitro*) النشاطية الإزاحية اتجاه جدر DPPH و الإمكانية المرجعة في الطريقة الأولى CI 50 تعادل 191.68 مغ/ل بالنسبة للمستخلص المائي 27.8 مغ/ل لل BHT و 9.97 مغ/ل للمستخلص الإيتانولي أما الطريقة الثانية فبينت ان الإمكانية المرجعة للمستخلصات المدروسة اقل من BHT . الدراسة الحيوية (*In vivo*) شملت 24 فأر موزعة على اربعة حصص و كل حصة تحتوي على 6 فئران الفترة التجريبية دامت 30 يوم الحصة الشاهد و الحصة 1 تلقوا جرعة يومية من البارافين و المستخلص المائي ل *A. campestris* على التوالي أما الحصة 2 و 3 تلقوا نفس العلاج بإضافة إلى جرعة من CCl_4 24 سا قبل كل ذبح. تحاليل الرموز البيوكيميائية للحصيلة الكبدية ASAT, ALAT, PAL, Bilirubine سجلت تركيز مرتفع لهذه الرموز بالنسبة للحصة 2 أما فيما يخص الفئران المعالجة بالمستخلص المائي و مسمومة ب CCl_4 بينت نقص لهذه الرموز.

الكلمات الأساسية *Artemisia campestris* , الفينول الكلي الفلافونويد, DPPH , فئران (*In vivo*) , ,سمية الحصيلة الكبدية

REMERCIEMENTS

« Merci mon Dieu de m’ avoir donné le courage d’ accepter les choses que je ne peux pas changer et de m’ avoir donné le pouvoir de les distinguer ».

J’ adresse tout d’ abord mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **BENCHABANE Ahmed**. Merci d’ avoir dirigé ce travail, merci pour votre disponibilité, votre soutien, votre encadrement sans faille tout au long de ces deux années. Consciente de vos nombreuses responsabilités, je suis particulièrement touchée du temps que vous m’ aviez consacré.

Je remercie Mr **HAZZIT Mohamed**, Maitre de conférences à l’ Ecole Nationale Supérieure Agronomique d’ EL HARRACH, pour son aide apportée et d’ avoir accepté de présider mon jury. Qu’ il soit assuré de mon entière reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie vivement Mme **FERHAT Zoulikha**, Professeur à l’ Ecole Nationale Supérieure Agronomique d’ EL HARRACH, pour avoir accepté de faire partie du jury. C’ est un très grand honneur et un très grand plaisir de vous soumettre mes travaux de recherche.

J’ adresse mes profonds remerciements à Mr. **BITAM Arezki**, Maitre de conférences à l’ Ecole Nationale Supérieure Agronomique d’ EL HARRACH, pour avoir accepté d’ examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

Un grand Merci !

DEDICACES

Pour tes mains qui ont tant travaillé,
Pour ton cœur qui m'a tant donné,
Pour ton sourire qui m'a tant réchauffé et qui me manque terriblement,
Pour tes yeux qui m'ont vu grandir,
Pour toi qui m'a tant aimé.

...A toi mon cher papa

A toi qui a tant fait pour tes enfants,
Sois sure de mon amour, mon respect et ma gratitude pour toi,
Que Dieu te garde pour nous.

...A toi ma chère maman

A ma sœur **Wassila** et son mari **Mohamed**, je vous suis reconnaissante de votre soutien et de vos encouragements tout au long de ce travail.

A mes frères **Mohamed, Charif et Abdou** ;
A ma tante **Malika** « mwima » ;
A ma belle sœur **Kahina** et toute sa famille.

A mes amies **Yasmina, Samira, Houda**.

A **Fériel** et **Sarah** pour tous les bon moments passés au laboratoire de chimie.

A mon amie, huit ans déjà, et ce n'est que le début : Melle **ATTAL Fella**, dans la joie comme dans la détresse toujours à mes côtés, je te remercie pour ton aide si précieuse au niveau de l'animalerie.

A ma chère JiJi ; Melle **BELALOUI Djahida** ; depuis qu'on s'est connu je découvre chaque jour une fille avec un cœur en or, je te dédie ce travail signe de ma reconnaissance envers l'aide et les conseils que tu m'as apportés.

Et enfin, il y a les compagnons de route, ceux avec qui l'on partage les joies du quotidien, les doutes, je suis heureuse de vous avoir rencontré : Melle **LAKER Khaoula**, Melle **ALLOUN Kahina**, M. **KEDDAR Nadir**, M. **AISSIOU Yahia**, M. **BENAMIRA Abdenour**.

A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

Houda

TABLE DES MATIERES

RESUMÉ**SUMMARY****LISTE DES ABREVIATIONS****LISTE DES TABLEAUX****LISTE DES FIGURES****LISTE DES ANNEXES****INTRODUCTION..... 1****PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE****CHAPITRE I: MONOGRAPHIE DE LA PLANTE 4****I. GENERALITES..... 4****II. APERÇU HISTORIQUE 4****III. TAXONOMIE 5****IV. REPARTITION GEOGRAPHIQUE..... 5****V. DESCRIPTION BOTANIQUE 5**

V.1 Caractères diagnostiques..... 6

V.2 Principales régions de culture 6

VI. COMPOSITION CHIMIQUE..... 7**VII. UTILISATION TRADITIONNELLE D'ARTEMISIA CAMPESTRIS 9**

VII.1 Activités biologiques..... 9

VII.1.1 Activité antioxydante 9

VII.1.2 Activité antibactérienne 9

VII.1.3 Effet insecticide..... 10

VII.1.4 Propriétés allélopathiques 10

VII.1.5 Activité hypoglycémiant 11

VII.1.6 Effet antipoison 11

CHAPITRE II: LES COMPOSES PHENOLIQUES 12**I. GENERALITES..... 12****II. LES ACIDES PHENOLIQUES..... 16**

II.1 Les acides hydroxybenzoïques..... 16

II.2 Les stilbénes 17

II.3 Acides hydroxycinnamiques 17

III. LES FLAVONOIDES..... 18

III.1 Structure et classification 18

III.2 Localisation et distribution..... 19

IV.	LES PRINCIPALES CLASSES DE FLAVONOÏDES	19
IV.1	Les flavones et les flavonols	19
IV.2	Les flavanones et les dihydroflavonols	20
IV.3	Les chalcones	20
IV.4	Les anthocyanidines	21
V.	BIOSYNTHESE DES POLYPHENOLS	22
V.1	La voie de l'acide shikimique	22
V.2	La voie du phénylpropanoïde.....	23
VI.	ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES	24
VI.1	Activité antibactérienne	24
VI.2	Activité antioxydante	26
VI.3	Flavonoïdes et NO	27
VI.4	Propriétés antihépatotoxiques	27
VI.5	Propriétés anticancéreuses	28
VI.6	Activité anti-inflammatoire.....	29
VI.7	Effets antiallergiques.....	29
VI.8	Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité	30
VI.9	Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire.....	30
VI.10	Autres activités des flavonoïdes.....	31
VII.	LES TANINS	31
VII.1	Localisation et distribution.....	31
CHAPITRE III: LE STRESS OXYDANT		32
I.	LES RADICAUX LIBRES	32
I.1	Généralités	32
I.2	Nature des radicaux libres.....	33
I.2.1	Les espèces réactives dérivées de l'oxygène	33
I.2.2	Les espèces libres non oxygénées	34
I.3	Production de radicaux libres.....	34
I.4	Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme.....	36
I.4.1	Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire.....	36
II.	LE STRESS OXYDATIF	39
II.1	Détermination des dommages biologiques	39
II.1.1	Peroxydation lipidique.....	39
II.1.2	Oxydation des lipoprotéines	41
II.1.3	Oxydation des protéines	41
II.1.4	Oxydation de l'ADN	42
II.2	Les systèmes antioxydants	42

II.2.1	Modes d'action des antioxydants	42
II.2.2	Les différentes localisations cellulaires des antioxydants	43
II.2.3	Origines des antioxydants.....	43
II.3	Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif.....	44
II.3.1	La défense contre les radicaux libres oxygénés.....	45
II.3.2	Systèmes antioxydants de protection.....	45
II.3.3	Les antioxydants	46
II.4	Evaluation du stress oxydatif	51
II.5	Les maladies liées au stress oxydatif	52
CHAPITRE IV: TOXICITÉ		53
I.	GENERALITES.....	53
II.	NOTIONS DE TOXICITE.....	53
II.1	Toxicité par administration unique: toxicité aiguë	53
II.2	Toxicité par administration réitérée : toxicité subaiguë et chronique.....	54
III.	DEFINITION ET PROPRIETES DES SOLVANTS	54
IV.	METABOLISME ET TOXICOLOGIE	55
IV.1	Résorption	55
IV.1.1	Voies respiratoires	55
IV.1.2	Epiderme	56
IV.1.3	Tractus gastro-intestinal.....	56
IV.2	Biotransformation et élimination	56
IV.3	Interactions.....	57
IV.3.1	Interactions pharmacocinétiques.....	57
IV.3.2	Interactions biologiques	57
IV.4	Tableaux cliniques	57
IV.4.1	Epiderme	58
IV.4.2	Voies respiratoires	58
IV.4.3	Système nerveux	59
IV.4.4	Organes internes.....	60
V.	CANCEROGENICITE DE SOLVANTS	61
VI.	LE TETRACHLORURE DE CARBONE CCL₄.....	61
VI.1	Propriétés physico-chimiques	62
VI.2	Propriétés cinétiques principales.....	62
VI.3	Toxicité chez l'homme	62
VI.3.1	Toxicité aiguë.....	63
VI.3.2	Toxicité chronique	63
VI.4	Etudes chez l'animal	64

VI.5	Effets cancérogènes	64
VI.5.1	Etudes principales	64

PARTIE II: ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES	66
I. MATERIEL VEGETAL	66
I.1 Récolte des plantes.....	66
I.2 Conservation	66
II. PREPARATION DES EXTRAITS D'ARMOISE	66
II.1 Préparation de l'extrait éthanolique.....	66
II.2 Préparation de l'extrait aqueux	68
III. ETUDE CHIMIQUE	69
III.1 Détermination de la teneur en eau.....	69
III.2 Détermination du taux de cendres.....	70
III.3 Dosage des polyphénols.....	70
III.4 Dosage des flavonoïdes.....	71
III.5 Evaluation de l'activité antioxydante.....	72
III.5.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	72
III.5.2 Mesure du pouvoir réducteur	74
IV. ETUDE TOXICOLOGIQUE	75
IV.1 Expérimentation animale	75
IV.2 Echantillonnage.....	75
IV.3 Protocole expérimental	76
IV.4 Calcul de l'indice hépato-somatique.....	78
IV.5 Calcul de la prise de poids	78
IV.6 Dosages des paramètres biologiques: Dosages biochimiques <i>in vitro</i>	78
IV.6.1 Dosage des transaminases (ASAT, ALAT)	79
IV.6.2 La phosphatase alcaline (PAL)	81
IV.6.3 Dosage de la bilirubine	82
CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION	83
I. RENDEMENT D'EXTRACTION D'ARTEMISIA CAMPESTRIS	83
II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	84
II.1 Teneur en eau	84
II.2 Teneur en cendres	85
II.3 Teneur en phénols totaux	86
II.4 Teneur en flavonoïdes	89

III.	EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS D'ARTEMISIA CAMPESTRIS.	91
III.1	Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	91
III.2	Mesure du pouvoir réducteur	93
IV.	EXPERIMENTATION ANIMALE	95
IV.1	Dosages des paramètres biologiques	95
IV.2	Dosage des activités enzymatiques des transaminases dans le sérum sanguin des rats	97
IV.3	Dosage des activités enzymatiques de la phosphatase alcaline	100
IV.4	Dosage des activités enzymatiques de la bilirubine totale et directe	102
	CONCLUSION	104
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
	ANNEXES	129

LISTE DES ABREVIATIONS

AG: Acide Gallique

ALAT: alanine amino transferase

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium

ANC : Apports nutritionnels conseillés

Aq : aqueux

ASAT: Aspartate amino transférase

B.D : bilirubine directe.

B.T : bilirubine totale

BHA : Butyl-Hydroxyl-Anisol

BHT: Butyl –Hydroxyl -Toluène

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone

CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

Da : Dalton

DL₅₀ : Dose létale qui tue 50% de la population.

DMSO: diméthyl sulfoxide

DO: Densité optique

DPPH : 2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl

EA : extrait aqueux

EC: Enzyme Commission

EE : extrait éthanolique

EOA: Espèce oxygénée active

Eq: équivalent

Eq.AG : équivalent Acide gallique.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène

FeCl₃ : chlorure de fer

GOT: Transaminase Glutanique oxaloacétique

GPT: Transaminase Glutanique pyruvique

GPx : Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion réduit.

GSSG: Glutathion oxydé.

H: Hydrogène

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HNE: 4-Hydroxynonanal.

HPLC: Chromatographie liquide haute performance

IC50 : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux

IHS : Indice Hepato somatique

J: jour

LDH: Lactate Dehydrogenase

LDL: Low Density Lipoprotein.

MDA: Malonedialdéhyde

MDH : Malate Dehydrogenase

MH: Matière Humide

MS : Matière sèche

MV : Matière Végétale

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NaNO₂ : Le nitrite de sodium.

Nm: nanomètre

NO : oxyde nitrique

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAL: Phosphatase alcaline

PC:Poids Corporel

pH: Potentiel hydrogène

Qr : Quercétine

RI : Indice de rétention.

ROO[•] : Radical libre peroxide

ROOH : Hydroperoxyde

SGOT : glutamate-oxaloacétate transaminase

SOD: Superoxide dismutase

TBA :Acide thiobarbiturique

TBHQ :Ter-Butyl-Hydroxy-quinone

UI : Unité Internationale.

UV: Ultra violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 01: Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d' <i>A. campestris</i>	8
Tableau n° 02: Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>A. campestris</i>	8
Tableau n° 03: Les différents acides phénoliques	
Tableau n° 04: Les différents groupes des Anthocyanidines	22
Tableau n° 05: Activités biologiques des composés polyphénoliques	25
Tableau n° 06: Les DL ₅₀ (mg/kg) de quelques espèces utilisées en expérimentation animale	64
Tableau n° 07: Récapitulatif de la conduite de l'expérimentation animale	77
Tableau n° 08: Rendement d'extraction en %.....	83
Tableau n° 09: Rendement en extrait éthanolique de deux échantillons d' <i>A. campestris</i>	84
Tableau n° 10: Teneur en eau du de l'armoise rouge.	85
Tableau n° 11: Teneur en cendres de l'armoise rouge.	85
Tableau n° 12: Teneur en phénols totaux de l'extrait aqueux de quelques espèces d'armoises.	87
Tableau n° 13: Teneur en phénols totaux de l'extrait éthanolique de quelques espèces d'armoises.	88
Tableau n° 14: Teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux de quelques espèces d' <i>Artemisia campestris</i>	90
Tableau n° 15: Teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de quelques espèces de l'armoise.....	90
Tableau n° 16: Moyenne du gain de poids des rats.	95
Tableau n° 17: Moyenne des poids des organes des rats.....	96

LISTE DES FIGURES

Figure n° 01: <i>Artemisia campestris L.</i>	6
Figure n° 02: Les principales classes des polyphénols	14
Figure n° 03: Les principaux acides hydroxybenzoïques	16
Figure n° 04: Principaux acides hydroxycinnamiques.....	17
Figure n° 05: Structure de base des différents flavonoïdes.....	18
Figure n° 06: Structure chimique de quelques flavanols	20
Figure n° 07: Structure des chalcones.....	21
Figure n° 08: Structure chimique des anthocyanidines.....	21
Figure n° 09: La voie de shikimate	23
Figure n° 10: La voie de phénylpropanoïde.....	24
Figure n° 11: Origine des radicaux libres dans la cellule	35
Figure n° 12: Mécanisme de la lipoperoxydation lipidique.....	40
Figure n° 13: Les systèmes d'antioxydants cellulaires.....	43
Figure n° 14: Sites d'action des nutriments antioxydants et des enzymes antioxydantes	44
Figure n° 15: Action antioxydante de la vitamine E: interruption de la phase de propagation.	46
Figure n° 16: Solvants et toxicité.....	55
Figure n° 17: Devenir toxique du CCl ₄ dans l'organisme.....	63
Figure n° 18: Dispositif de l'extraction solide liquide.....	67
Figure n° 19: Evaporation du solvant (éthanol) à l'évaporateur rotatif.....	67
Figure n° 20: Filtration du macéré aqueux à l'aide d'un Büchner.....	68
Figure n° 21: Lyophilisation de l'extrait aqueux de l'armoise.	69
Figure n° 22: Dosage des polyphénols.....	70
Figure n° 23: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	72
Figure n° 24: Piégeage du radical DPPH.....	73
Figure n° 25: Détermination du pouvoir réducteur	74
Figure n° 26: Répartition des rats en 4 lots.....	75
Figure n° 27: Gavage quotidien des rats.	76
Figure n° 28: Dissection d'un rat.	77
Figure n° 29: Photo des organes étudiés (le cœur, les reins et le foie)	78

Figure n° 30: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	86
Figure n° 31: Teneur en phénols totaux des extraits aqueux et éthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	87
Figure n° 32: Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	89
Figure n° 33: Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux et éthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	90
Figure n° 34: Activité de piégeage du radical libre DPPH des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> comparée à celle du BHT.	91
Figure n° 35: Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres de l'extrait éthanolique , de l'extrait aqueux de l'armoise rouge et du BHT.....	92
Figure n° 36: Pouvoir réducteur des différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et du BHT.	94
Figure n° 37: Dosage de l'Aspartate Aminotransférase sériques	97
Figure n° 39: Le rapport ASAT/ALAT des sérums sanguins des rats.....	99
Figure n° 38: Dosage de l'Alanine Aminotransférase dans le sérum sanguin des rats.....	98
Figure n° 40: Dosage de la Phosphatase alcaline dans le sérum sanguin des rats.....	101
Figure n° 41: Dosage de la bilirubine directe dans le sérum sanguin des rats.....	102
Figure n° 42: Dosage de la bilirubine totale dans le sérum sanguin des rats.....	102

LISTE DES ANNEXES

Annexe n°01: Activité de piégeage du radical libre des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> comparée à celle du BHT	129
Annexe n°02: Pouvoir réducteur des différents extraits d' <i>Artemisia campestris</i> comparé au pouvoir réducteur du BHT.....	129
Annexe n°03: Dosage des activités enzymatiques des transaminases dans le sérum sanguin des rats.	130
Annexe n°04: Dosage de la Phosphatase alcaline et de la bilirubine dans le sérum sanguin des rats.....	130
Annexe n°05: Dosage de la bilirubine directe et de la bilirubine totale dans le sérum sanguin des rats.	131

INTRODUCTION

De l'antiquité, aux temps modernes ; sorciers, chamanes et autres guérisseurs ont exploité les avantages des remèdes fournis par « dame nature », pour guérir les maladies humaines. Comme de nombreux produits de la nature, les plantes sont utilisées en médecine, en pharmacie et en biologie (**Teiten** et *al.*, 2013).

Les plantes médicinales sont employées parfois de façon sélective de par la tradition. Au fil des siècles, une première distinction a pu être faite entre les plantes comestibles et celles toxiques. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du 20^e siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes.

De nos jours, et surtout dans les pays du tiers monde, la phytothérapie occupe encore une place importante. La flore de ces pays reste assurément riche et prometteuse, tant dans la perspective de découvrir de nouvelles espèces botaniques que de trouver de nouvelles molécules ayant une activité thérapeutique, pour la mise au point de nouveaux médicaments.

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement riches, elles contiennent des structures chimiques complexes. Le métabolisme des plantes contient des milliers de différents constituants dont l'effet thérapeutique n'est évidemment pas lié à tous les composés, de même pour ce qui est d'effet nocif ou toxique.

Seulement 20% des plantes dans le monde ont été soumises à des tests et à des examens pharmacologiques ; dans ce contexte, il devient possible que des antioxydants anti- cancéreux et anti-inflammatoires naturels dérivés des plantes soient utilisés comme supplémentation nutritionnelle et pour la consommation humaine (**Khelifi** et *al.*,2013).

Selon l'organisation mondiale de la santé, en 2008, 80% de la population mondiale a eu recours à la médecine traditionnelle pour les premiers soins. Les composés dérivés des plantes, sont à la base de plusieurs médicaments commercialisés aujourd'hui dans les pays industrialisés.

Par ailleurs, l'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique au vu de sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. En effet, la flore algérienne est potentiellement riche, beaucoup d'espèces endémiques la composent.

Dans ce sens, nous partageons avec les pays méditerranéens et ceux du Sahel un large éventail de composés phytochimiques d'un intérêt grandissant d'où l'importance du travail de recherche proposé.

Ce brassage d'espèces constitue pour notre pays une véritable richesse qui doit être préservée et gérée rationnellement et durablement dans le but de maintenir les équilibres écologiques déjà fragiles et de conserver notre diversité biologique.

De nombreuses plantes algériennes possèdent des propriétés médicinales et une demande croissante pour les remèdes d'origine végétale est relevée (**Bakchiche** et *al.*, 2013).

Ces plantes contiennent des composés phénoliques et flavonoïdes qui sont des antioxydants naturels qui ont aussi des propriétés anti mutagènes, anti cancérigènes, cardioprotectrices, anti inflammatoires et antimicrobiennes.

De nombreux antioxydants synthétiques tels que le Butylhydroxyanisole (BHA) et le Butylhydroxytoluène (BHT) ont largement été utilisés comme additifs alimentaires et leur utilisation a donné naissance à des interrogations concernant leur toxicité. Dans ce sens, la médecine préventive s'intéresse de plus en plus au développement des antioxydants d'origine naturelle de source botanique et obtenus spécialement à partir des plantes médicinales (**Riahi** et *al.*, 2013).

Chez l'être humain, le stress oxydatif, résultant des radicaux libres, contribue à d'innombrables désordres au niveau du corps, causant l'athérosclérose, l'arthrite, les infections tissulaires, les gastrites et le cancer (**Suhartono** et *al.*, 2012 ; **Rashid** et *al.*, 2013). Les maladies du foie sont considérées, aujourd'hui, comme étant les plus répandues. Malgré l'avancée de la médecine, leur traitement reste limité. Cependant, les pathologies liées aux maladies hépatiques sont dues au stress oxydatif et aux inflammations qu'il produit. Selon que l'on retarde ou que l'on bloque les processus d'oxydation et d'inflammation, on peut arriver à une thérapie pour la prévention ou le traitement des maladies hépatiques.

Récemment, le modèle le plus probable dans la recherche *in vivo* des agents hépatoprotecteurs est celui utilisant le tétrachlorure de carbone comme déclencheur sachant que ce dernier cause des dommages hépatocellulaires (**Amat** et *al.*,2010 ; **Hou** et *al.*,2013).

Pour cela, les tests scientifiques portant sur une substance active d'une plante donnée sont d'abord effectués sur des animaux et /ou sur des cellules. Il est de ce fait important de vérifier si la substance examinée exerce une action quelconque sur la formation cellulaire et si elle peut déclencher des mutations. Ces examens sont réalisés tant sur le système cellulaire que sur des animaux ; principalement les souris. Il est également essentiel de savoir si cette substance est susceptible d'être cancérogène. (**Grünwald** et *al.*, 2006).

C'est dans cette optique que s'insère l'objectif du présent travail qui consiste, en premier lieu, en une extraction, une caractérisation et une évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits d'une plante médicinale et aromatique d'Algérie: *Artemisia campestris* (l'armoise rouge); puis l'étude d'un éventuel effet protecteur des antioxydants présents dans cette plante contre un polluant à savoir le tétrachlorure de carbone sur des rats contaminés par ce dernier (essai *in vivo*).

CHAPITRE I: MONOGRAPHIE DE LA PLANTE

I. GENERALITES

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres les plus répandus et les plus étudiés de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (**Mucciarelli et Maffei.**, 2002).

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquiniques, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (**Kundan et Anupam.**, 2010).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans les industries alimentaire et pharmaceutique (**Mirjalili et al.**,2007).

***Artemisia campestris* L.,1753.**

Le genre *Artemisia*, *disposé* autour du monde, pousse sauvagement dans l'hémisphère nord ;onze espèces ont été recensées dans la flore de l'Algérie.

Artemisia campestris, est connu sous l'appellation « **dgouft** », poussant dans la steppe et le désert (**Bakchiche et al.**, 2013). Les populations du Sud l'utilisent pour calmer les troubles digestifs, les maux abdominaux ainsi que les nausées. En usage externe, elle cicatrise les plaies et les brûlures (**Temani**, 2005).

II. APERÇU HISTORIQUE

On peut lire dans maints ouvrages de la mythologie grecque et romaine que l'armoise – la «mère des herbes» – était tenue en haute estime en tant que plante médicinale. Dans l'Empire romain, l'armoise était soi-disant plantée le long des routes afin que les légionnaires n'aient pas les jambes fatiguées lors de leurs déplacements. Cette conviction a persisté pendant des siècles, jusqu'au Moyen-âge. Le savant William COLES écrivait en 1656: «...*en mettant de l'armoise le matin dans les chaussures, on peut parcourir des lieues et des lieues jusqu'à midi sans fatigue.*».

On a fréquemment attribué à l'armoise des forces magiques. C'est ainsi qu'un bouquet d'armoise accroché sous le faîtage était censé protéger la maison et tous ses habitants contre les épidémies et la foudre.

III. TAXONOMIE

Selon **Caratini** (1971), *Artemisia campestris* est classée dans:

Règne: *Plantae*
Sous règne: *Tracheobionta*
Embranchement: *Spermatophyta*
Sous embranchement: *Magnoliophyta*
Classe: *Magnoliopsida*
Sous classe: *Asteridae*
Ordre: *Asterales*
Famille: *Asteraceae*
Sous famille: *Asteroideae*
Tribu: *Anthemideae*
Sous Tribu: *Artemisiinae*
Genre: *Artemisia*
Espèce: *Artemisia campestris* L.

Nom vernaculaire : Armoise champêtre, Aurone-des-champs, Armoise rouge (Lombard et Bajon, 2000).

IV. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Espèce présente dans toute l'Europe, à l'exception des zones arctiques et de la plupart des îles ; Baléares, Corse, Sicile, Crète, Irlande, Islande, Spitzberg, etc.; aussi en Sibérie, en Asie occidentale et au Maghreb. En France, elle a une distribution inégale: assez bien représentée dans le sud et l'ouest, elle est plus rare dans les montagnes de l'est, et plus encore dans le nord-est.

V. DESCRIPTION BOTANIQUE

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm (**figure 01**). Cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre.

Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (Boudjouef, 2011).

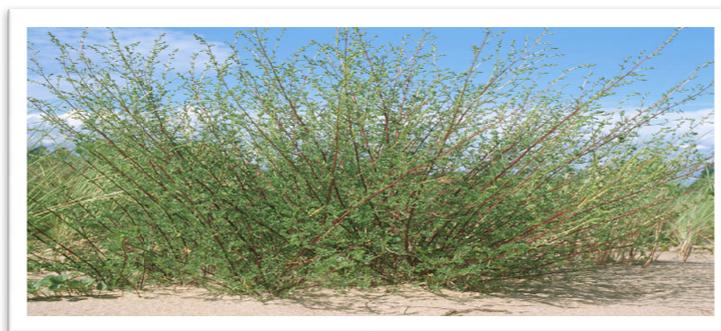


Figure n°01:*Artemisia campestris L.*

V.1 Caractères diagnostiques

C'est une plante vivace, à souche ligneuse très ramifiée, de 20 à 80 cm de hauteur, pratiquement inodore à tiges rameuses, couchées à leur base, puis redressées, généralement rougeâtres, glabrescentes. Ses feuilles sont vertes ou vert-brunâtre, divisées en fines lanières; feuilles deux fois divisées, les supérieures sessiles, les inférieures pétiolées. Les fleurs jaunâtres sont réunies en de nombreux capitules très petits, ovoïdes; involucre et réceptacle glabres; fleurs du centre du capitule stériles ou hermaphrodites, celles de la périphérie généralement unisexuées et femelles; étamines à anthères prolongées en pointe à leur sommet. La floraison a lieu du mois d'août au mois d'octobre. C'est une espèce particulièrement polymorphe, à l'intérieur de laquelle on a décrit de très nombreux taxons infraspécifiques, sous-espèces, variétés, de valeur médiocre, très localisées, et correspondant souvent à des variations stationnelles.

V.2 Principales régions de culture

Ce sont les pays méditerranéens (Espagne, Portugal, sud de la France, nord de l'Afrique), le groupement des Etats indépendants (Crimées), l'Inde, les Philippines, les Antilles, l'Afrique du sud, l'Australie, les Etats-Unis et le Mexique.

VI. COMPOSITION CHIMIQUE

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnement et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes.

Les études chimiques des espèces du genre *Artemisia* indiquent que les classes des composés qui sont présents sont en particulier : les terpénoïdes et les flavonoïdes. La riche accumulation des terpénoïdes et des flavonoïdes dans les huiles essentielles de ce genre est responsable de leur utilisation pour aromatiser les aliments et les liqueurs (**Baykan Erel et al.**, 2010).

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (**Joa et al.**, 1998 ; **Juteau et al.**, 2002).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (**Bruneton**, 1999), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (**Jerkovic et al.**, 2003).

Plusieurs études (**Akrout et al.**, 2001 ; **Juteau et al.**, 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), **Juteau et al.** (2002), ont identifié et caractérisés dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après **Akrout et al.** (2001) les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24,2-27,9 %), p-cymène (17,4–22,3%) et α -pinène (4,1–11,0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydroxybenzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemesia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométrique (**tableau 01**).

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Valant et al., 2003)(Tableau 02).

Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes et des saponines (Naili et al.,2010).

Tableau n° 01: Teneur en polyphénols de la partie aérienne d'*A. campestris* (Djeridane et al.,2007).

Plante	Phénols totaux ^a	Flavonoïdes ^b	Dérivés hydrox Cinnamiques ^c	Dérivés hydrox Benzoïques ^d
<i>Artemisia campestris</i>	103.4	5	95	0

a: mg EAG/g ps, **b :** EQ(m/m), **c :** EAC (m/m), **d :** EAG (m/m).

Tableau n° 02: Composition chimique de l'huile essentielle d'*A. campestris* (Akrouf et al., 2011).

Composés	RI	%	Composés	RI	%
a-Pinene	930	5,3	a-Humulene	1457	0,3
b-Pinene	975	34,2	a-Ylangene	1470	1,3
b-Myrcene	992	6	Germacrene D	1485	7,3
a-Terpinene	1117	0,3	Zingiberene	1490	0,4
p-Cymene	1026	2,3	Bicyclogermacrene	1494	2
Limonene	1031	8,2	(E,E)-a-Farnesene	1508	1
(Z)-b-Ocimene	1043	4,6	c-Cadinene	1511	0,2
(E)-b-Ocimene	1053	4,3	d-Cadinene	1528	1,9
c-Terpinene	1063	6,1	a-Cadinene	1550	0,1
a-Terpinolene	1088	1	Elemol	1561	0,2
Linalool	1103	0,1	Spathulenol	1576	1,9
Terpinen-4-ol	1185	0,8	Globulol	1582	0,6
a-Terpineol	1195	0,8	Geranyl isovalerate	1606	0,5
Z-3-hexenyl isopentanoate	1142	0,4	1-epi-Cubenol	1627	0,3
Geranyl acetate	1381	0,8	a-Acorenol	1630	0,6
(E)-b-Caryophyllene	1422	0,4	a-Cadinol	1640	1,2
Aromadendrene	1446	0,2	b-Eudesmol	1649	2,8

VII. UTILISATION TRADITIONNELLE D'*Artemisia campestris*

VII.1 Activités biologiques

En plus de son utilisation traditionnelle, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on peut citer:

VII.1.1 Activité antioxydante

Les composés phénoliques sont rapportés comme possédant de multiples effets biologiques incluant une activité antioxydante ; ils peuvent agir comme des piègeurs de radicaux libres ou en empêchant leur formation (**Bakchiche et al.**,2013).

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives. En effet, cette plante est riche en composés dotés d'une activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins. Ces différents constituants exercent des actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (**Bruneton**, 1999).

Dans une étude réalisée par **Aniya et al.** (2000) ; l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* a été testée par la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-1-picrylhydrazyl) ; les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante élevée.

De leurs coté,**Akrout et al.**(2011) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode au DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid) ; ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante comparée à celle de l'huile essentielle.

VII.1.2 Activité antibactérienne

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaires. **Naili et al.** (2010), testant l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ont trouvé que l'activité de cet

extrait est plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que celles de gram négatif (*Eischerichia coli*).

De leur côté, **Ben Sassi et al.**(2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (Méthanol, acétate éthyle, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales dont *Artemisiacampestris* contre 14 bactéries gram positif et gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait d'acétone est le seul qui montre une action inhibitrice contre trois types de bactéries: *Staphylococcus epidermidis*, *saprophyticus* et *aureus*.

En outre, *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques. Dans ce sens, **Kyeong et al.** (2007) ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize ; les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

Par ailleurs, les plantes du genre *Artemisia* contiennent une endoperoxydase type du genre sesquiterpène lactone appelé: artemesinine (**Paul et al.**, 2013) . Ce composant constitue le métabolite secondaire le plus important chez toutes les espèces d'*Artemisia* : il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria: *Plasmodium falciparum* (**Donrop et Day.** 2007 ; **Nakase et al.**, 2008) comme il est efficace contre les maladies infectieuses telle que l'hépatite B (**Romero et al .**, 2005). Enfin, des propriétés antifongiques et anticancéreuses, dues à la présence de flavonoïdes, ont été mises en évidence par des tests *in vitro* (**Gouveia** ,2013).

VII.1.3 Effet insecticide

Une étude récente a été réalisée par **Pavela** (2009) où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*. Cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

VII.1.4 Propriétés allélopathiques

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage. Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acides phénoliques et d'autres composants polaires (**Kyeong et al.**, 2007).

VII.1.5 Activité hypoglycémiant

Sefi et *al.* (2012) ont récemment démontré que les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent des composés bioactifs tels que les polyphénols qui améliorent la réponse des cellules β du pancréas contre l'alloxane induisant le diabète chez le rat. En effet, en expérimentation animale, l'alloxane induit une hyperglycémie et une hypoinsulonémie importantes, accompagnées d'une perte de poids. L'administration de l'extrait aqueux a montré une baisse du taux de glucose sanguin suivie d'une élévation du taux d'insuline sérique. Le mécanisme probable par lequel agit l'extrait des feuilles d'*Artemisia campestris* sur l'alloxane est de moduler son effet antidiabétique en agissant sur les cellules β du pancréas qui sont encore fonctionnelles après le traitement, réduisant ainsi la production de glucose dans le foie et/ou augmentant sa consommation par les tissus.

VII.1.6 Effet antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, d'éthanol, de méthanol et du dichlorométhane des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour leurs capacités de neutralisation du venin de scorpion et de vipère ; les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait au dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (**Memmi** et *al.*, 2007).

CHAPITRE II: LES COMPOSES PHENOLIQUES

I. GENERALITES

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et, de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale. A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10 g de ces composés par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le **tableau 03**.

Tableau n° 03: Les différents acides phénoliques (Collin et Crouzet .2011).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides Hydroxycinnamiques Phenylpropenes Coumarines Isocoumarines Chromones	Acide caféique, Acide férulique Myristicin, Eugénol Scopolétine Myristicine, Eugénol Eugenine	Pomme de terre, Pomme, citrus
C6-C4	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
C6-C2-C6	Stilbènes Anthraquinones	Resvératrol Anthraquinones	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, Daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C6-C3)2	Lignanes Neolignanes	Pinorésinol Eusiderine	Pin
(C6-C3-C6)2	Biflavonoides	Amentoflavone	
(C6-C3)n	Lignines	Bois	fruits à noyaux, raisin, kaki
(C6-C3-C6)n	Tanins condensés		

Les composé phénoliques et flavonoïdes présents dans les plantes sont des antioxydants naturels, ils ont aussi des propriétés antimutagènes, anti cancérigènes, cardioprotectrices, anti inflammatoires et anti microbiennes (**Riahi** et *al.*, 2013) (**figure 02**).

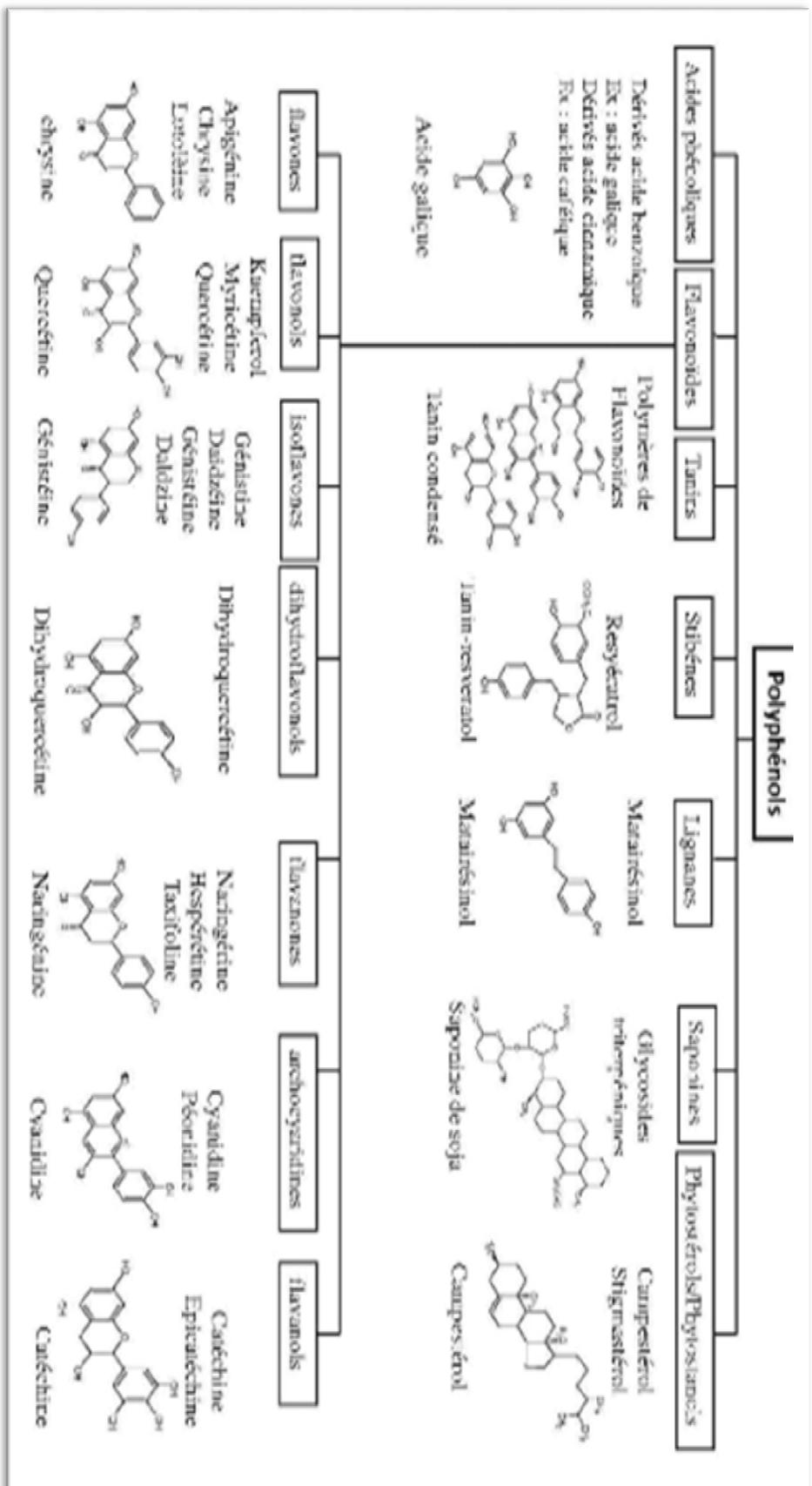


Figure n° 02: Les principales classes des polyphénols (Brunneton, 1999).

Par ailleurs, les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction telle que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton**, 1999 ; **Lugasi** et *al.*, 2003).

En effet, les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (**Lugasi** et *al.*, 2003).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King** et **Young**, 1999 ; **Tapiero** et *al.*, 2002). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot** et **Charpentier**, 2006).

Il est à noter que les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments ; certains d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines (avec lesquelles les tanins se combinent), ...etc. Les décès dus aux infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont associés aux taux élevés du cholestérol de type LDL (Low Density Lipoprotéines) circulant dans le sang. Des études ont démontré qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques (vitamine E, quercétine...) pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose, en diminuant l'oxydation des LDL (**Frankel** et *al.*, 1995).

Ainsi, les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumons, peau, vessie,...etc) à tout les stades de la cancérogénèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agent bloquant en empêchant l'activation du pro carcinogène. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agent suppresseur de tumeurs. Les mécanismes impliqués peuvent, là encore, être très variés: prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose et inhibition de l'angiogénèse.

Comme ils pourraient aussi exercer des effets protecteurs contre les maladies hormonodépendantes telle que l'ostéoporose en modulant la réponse aux oestrogènes

endogènes (**Scalbert et Williamson, 2000**). Enfin, les composés phénoliques et en particulier, l'acide salicylique (acide hydroxybenzoïque) ont également des propriétés antiseptiques (**Ribereau, 1964**). Cependant, les preuves de leurs effets chez l'homme restent encore insuffisantes.

II. LES ACIDES PHENOLIQUES

II.1 Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (**figure 03**).

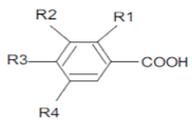
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure n° 03: Les principaux acides hydroxybenzoïques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Le principal composé est l'acide gallique dont la teneur est comprise entre **100** et **230** mg/kg.

Les acides hydroxycinnamiques : L'acide cinnamique est un composé C6-C3 produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine amonia-lyase, l'acide paracoumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique. L'acide cinnamique et les acides hydroxycinnamiques sont aussi désignés sous le terme de phénylpropanoïdes. Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique. Les acides hydroxycinnamiques communs sont les acides caféique, p-coumarique, férulique et sinapique. Ils sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation et ils s'accumulent souvent sous forme d'esters d'acide tartrique.

II.2 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure en C6-C2-C6 ; deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène. Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales ; ce qui a été démontré pour le trans- resvératrol. Le resvératrol est synthétisé par la condensation du 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la stilbéne synthase ; les produits impliqués étant les mêmes que pour la synthèse des flavonoïdes, la seule différence concerne l'enzyme catalysant la réaction. Le resvératrol se trouve sous forme cis et trans, et est présent dans les tissus végétaux principalement sous forme de trans-resveratrol-3-O-glucosides.

Il existe des formes oligomères des stilbènes, identifiées dans le raisin, telles que le pallidol et les viniférines.

II.3 Acides hydroxycinnamiques

- Dérivent de l'acide cinnamique ;
- Ont une structure générale de base de type (C6-C3) ;
- Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques ;
- Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, **la figure 04** représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

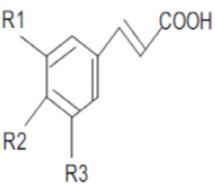
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure n° 04: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

III. LES FLAVONOÏDES

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al.**, 2006). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (**Ghestem et al.**, 2001).

Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules ; en effet, plus de 6400 structures ont été identifiées (**Harborne et Williams.**, 2000).

III.1 Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrane (**Skerget et al.**, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Dacosta**, 2003) (**figure 05**).

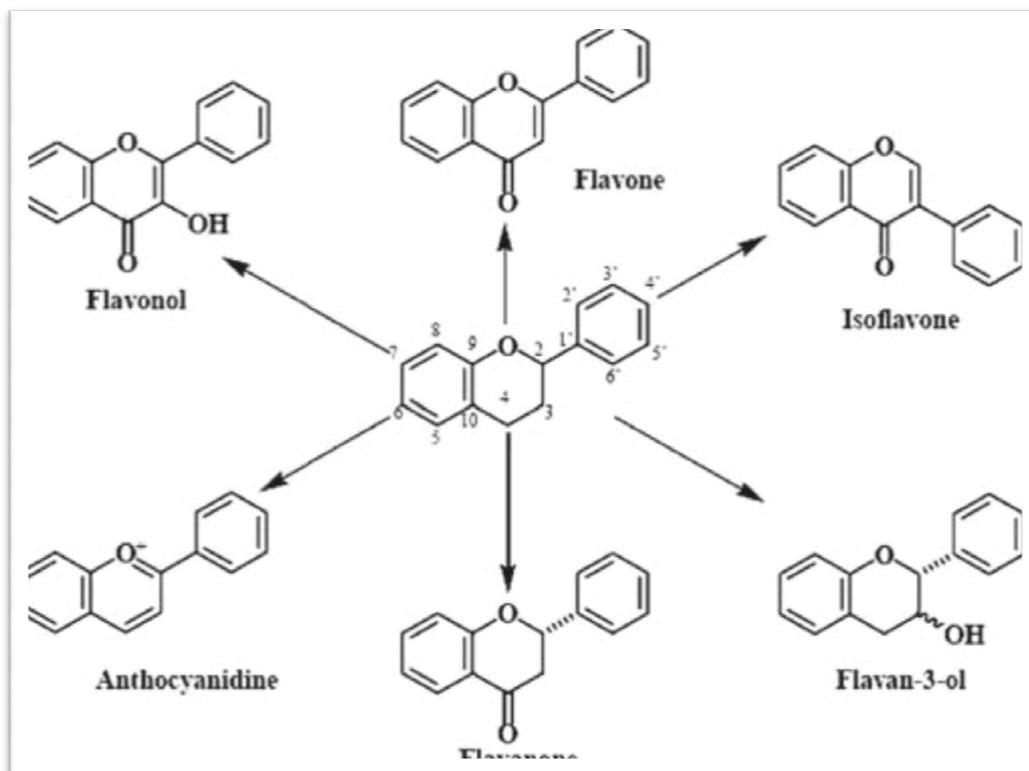


Figure n° 05: Structure de base des différents flavonoïdes (**Chira et al.**, 2008).

De façon générale, les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (**Dacosta**, 2003).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Effendi et al.**, 2008).

III.2 Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (**Medic et al.**, 2003).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (**Bruneton**, 1999).

IV. LES PRINCIPALES CLASSES DE FLAVONOIDES

IV.1 Les favones et les flavonols

Les favones et les flavonols représentent la majorité des flavonoïdes connus, dans plus de 90% des cas. Chez ces molécules le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C-4', peut être disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

Les principales flavones sont l'apégénine et la lutéoline, alors que les principaux flavonols sont la quercétine, kaempférol et la myricétine (**Bruneton, 1999**) (**figure 06**).

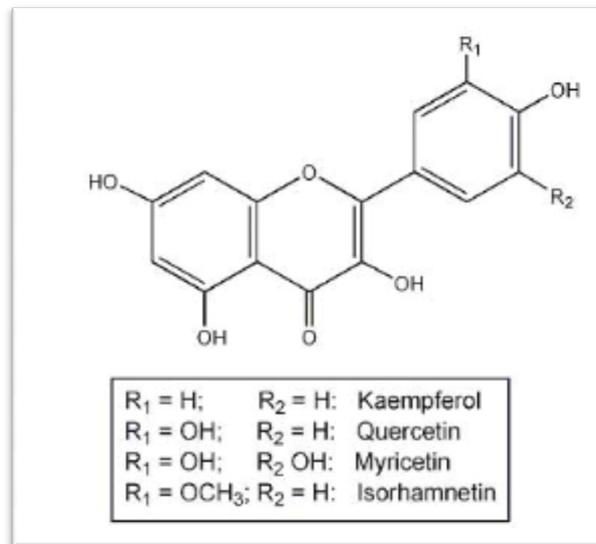


Figure n°06: Structure chimique de quelques flavonols (**Bruneton, 1999**).

IV.2 Les flavanones et les dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues insaturés rassemblant les flavones et flavonols. La principale flavanone est la naringénine alors que la dihydroflavonol la plus rencontrée est la catéchine (**Bruneton, 1999**).

IV.3 Les chalcones

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarbon cétonique. Si les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Pour ce type de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes. Les chalcones les plus importants sont: la butéine et la phlorétine (**Bruneton, 1999**).

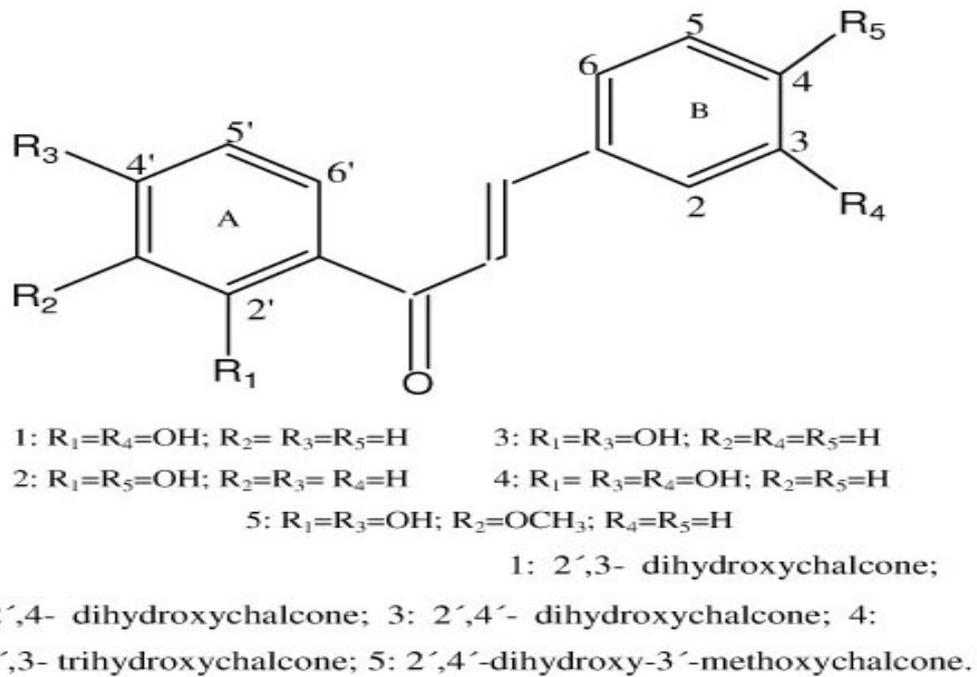


Figure n° 07: Structure des chalcones (Bruneton, 1999).

IV.4 Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylés en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. Les anthocyanidines les plus abondants sont: la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine (**figure 08, tableau 04**).

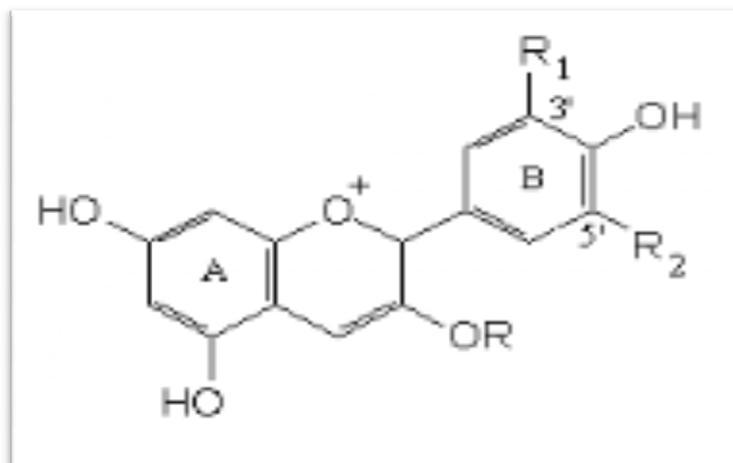


Figure n° 08: Structure chimique des anthocyanidines (Bruneton, 1999).

Tableau n° 04: Les différents groupes des anthocyanidines (**Giulia et al.**, 1999)

Anthocyanidines R=H	R₁	R₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

V. BIOSYNTHESE DES POLYPHENOLS

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales.

V.1 La voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphates et la glycolyse, respectivement.

Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (**Haslam**, 1998; **Dewick**, 1995).

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique (**figure 09**).

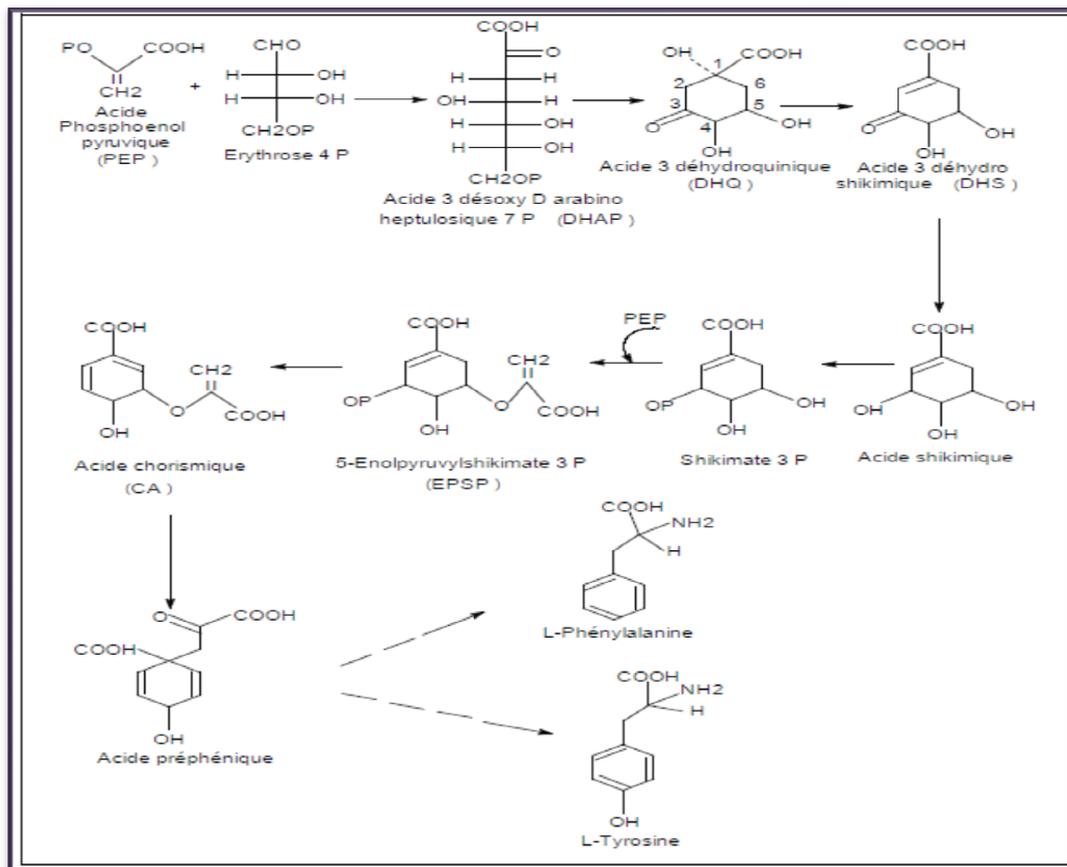


Figure n° 09: La voie de shikimate (Floss, 1997)

V.2 La voie du phénylpropanoïde

La voie du phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (figure 10).

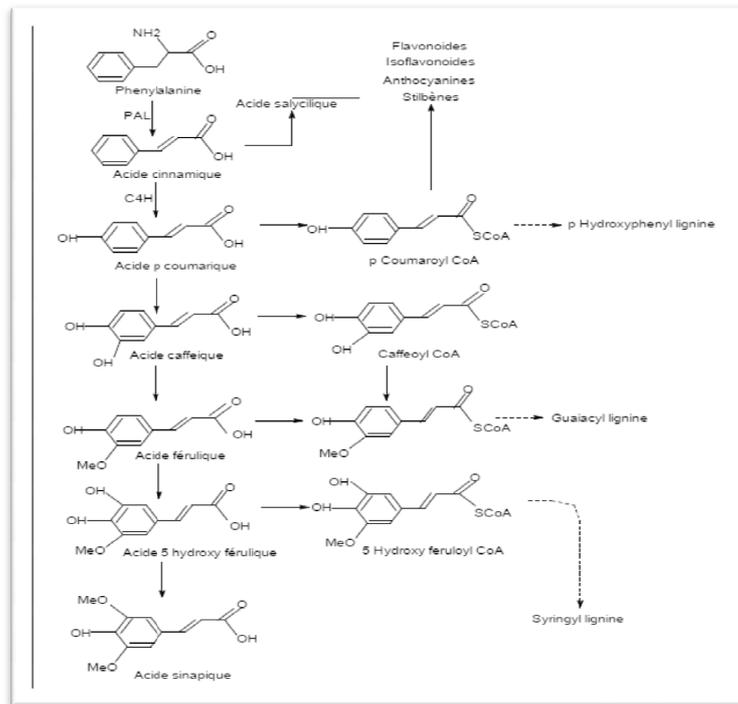


Figure n° 10: La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann et al., 2004)

VI. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES

VI.1 Activité antibactérienne

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes possèdent une activité antimicrobienne (Tim et al., 2005).

Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés comme de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams, 2000).

De nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes. (Haraguchi et al., 1998). De même, les propriétés détectées chez la propolis, sont attribuées à leur teneur élevée en flavonoïdes, en particulier, le galangin et le pinocembrin (Tim et al., 2005).

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie ; une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité du flavonoïde glycoside, sur des souches fongiques (**Galeotti et al.**,2008).

Un nouveau flavanone prénylé isolé à partir de l'arbuste *Eysenhardtia texana* et un flavane 7-hydroxy-3,4- méthylendioxy, flavane isolé à partir des fruits de *Terminalia bellerica*, montrent une activité contre le microbe pathogène opportuniste : *Candida albicans* (**Wachter et al.**, 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés ont exhibé une activité contre *Aspergillus flavus* (**Zheng et al.**, 1996). Le Galangin est un flavonol, qui se trouve généralement dans des échantillons de propolis, il a montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (**Afolayan et Meyer**, 1997).

Récemment des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte.

Le mécanisme d'action de polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses avancées:

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.

Le **tableau 05** donne quelques activités biologiques des composés polyphénoliques.

Tableau n° 05: Activités biologiques des composés polyphénoliques (Frankel et al., 1996).

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	(Ravn et al., 1984) (Hayase et Kato, 1984)
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses	(Mabry et Ulubelen, 1980)
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	(Stavric et Matula, 1992) (Bidet et al., 1987) (Bruneton, 1993) (Aruoma et al., 1995)
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	(Bruneton, 1993)
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	(Masquelier et al., 1979) (Bahorun et al., 1996) (DE Oliveira et al., 1972) (Brownlee et al., 1992) (Kreofsky et al., 1992)
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants	(Okuda et al., 1983), (Okamura et al., 1993)

VI.2 Activité antioxydante

Il est connu que les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques ; ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. (Fuhrman et al., 1995).

L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (FL-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (Jovanovic et al., 1994).

VI.3 Flavonoïdes et NO

L'activité des flavonoïdes comme piègeurs de radicaux libres étant bien établie, des études récentes suggèrent qu'ils seraient également de puissants piègeurs du radical NO.

Celui-ci étant élaboré par plusieurs types de cellules, notamment les cellules endothéliales et les macrophages. Aussi, la libération de NO, due à l'activité NO synthase, est importante dans le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins.

Certains flavonoïdes ont la propriété d'inhiber la cyclooxygénase, cela pourrait expliquer l'effet de la quercétine dans le blocage de la vasodilatation due à la relaxation.

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



VI.4 Propriétés antihépatotoxiques

Des flavonoïdes issus de *Silybum marianum* (chardon marie) ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. Testée sur un modèle expérimental animal, la silymarine a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement, agissant sur la membrane cellulaire, prévenant l'entrée des substances toxiques, et qu'elle stimule la capacité régénérative des cellules hépatiques après hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, principale flavolignane rencontrée dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des

doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est révélé hépatoprotecteur, mais le mécanisme d'action de cette protection n'est pas encore bien élucidé.

Par ailleurs, la quercétine, issue d'*Artemisia scoparia*, a été décrite comme possédant une activité protectrice vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris.

VI.5 Propriétés anticancéreuses

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformations pouvant se dérouler pendant plusieurs années. Il est établi, donc, que la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (**Pincemail et al.**, 1999).

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation. Dans ce sens, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment, des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (**Decloitre**, 1993; **Hertog**, 1996).

Des études montrent que certains flavonoïdes, particulièrement, la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses alors que d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de la prostate ; ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (Fatty Acid Synthase) (**Brusselmans et al.**, 2005).

Les travaux réalisés par **Mahmoud et al.** (2000) in **Depeint et al.** (2002), montrent que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité d'inhiber la phase de métastase. Toutefois, **Depeint et al.** (2002) signalaient que

l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

Ainsi, l'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes :

- Piégeage des radicaux libres ;
- Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique ;
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog**, 1996) ;
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes ;
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ;
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses ;
- Induction de l'apoptose ;
- Inhibition des processus d'angiogénèse (**Ren et al.**, 2003).

VI.6 Activité anti-inflammatoire

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action de la cyclo-oxygénase et de la lipoxycgénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxycgénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène. L'héspéridine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive *per os*), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'oedème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran.

VI.7 Effets antiallergiques

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes AMP-cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante ; ces deux dernières sont responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Di Carlo (1999) a étudié les effets antiallergiques de la quercétine, il a trouvé que ce flavonoïde exerce ses effets en inactivant l'enzyme ATPase Ca^{2+} dépendante, de même que l'action de la quercétine est supérieure à celle du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament antihistaminique.

VI.8 Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité

Certains flavonoïdes sont supposés apporter un intérêt dans le métabolisme lipidique en diminuant la lipidémie. L'effet de quelques flavanones (la naringénine, la naringine, l'hespéridine et l'hespéridine) sur la conversion des préadipocytes en adipocytes, sur une lignée cellulaire AML-I, a été étudié (**Morikawa** et *al.*, 2008). Les deux flavonoïdes, sous forme aglycone, à savoir la naringénine et l'hespéridine, ont induit un arrêt de la croissance des cellules entraîné par une apoptose. L'impact de la naringénine, sur différentes protéines impliquées dans l'apoptose, a été déterminé. Le résultat est que dans les cellules traitées avec ce flavonoïde, les taux de protéines antiapoptotiques (p-Akt, NF- κ B, et Bcl-2) étaient diminués et ceux de Bad (protéines pro-apoptotiques) augmentés.

L'exposition des cellules à la naringénine ou à l'hespéridine durant de courtes périodes a augmenté la taille des gouttes lipidiques dans le cytoplasme. De plus, l'expression de la fatty acid synthase (intervenant dans la synthèse des acides gras) et des PPAR- γ a été augmentée dans les cellules traitées à la naringénine. Ces résultats suggèrent que l'apoptose induite par les flavanones n'intervient pas sur la conversion des pré-adipocytes en adipocytes. De ce fait, les adipocytes sembleraient ne pas être une cible directe pour les activités hypolipémiantes des flavanones (**Morikawa** et *al.* 2008).

VI.9 Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire

Le stress oxydant induit par les rayons ultraviolets (UV) joue un rôle important dans la progression de la cataracte. Certains flavonoïdes, comme la fisétine, ont été examinés pour leur effet protecteur contre le stress oxydant induit par les UV dans des cellules épithéliales de la lentille (SRA01/04). (**Boudjouef**, 2011)

Les cellules ont été exposées à différentes intensités d'UVB, et ont été cultivées avec des concentrations croissantes de fisétine. La viabilité des cellules ainsi que le stress oxydant (cytométrie de flux) ont alors été mesurés. Aussi, la translocation du NF-kappaB, impliquée dans les mécanismes inflammatoires a été suivie par immunocytochimie. Enfin, l'expression des protéines NF-kappa B/P65, IkappaB et MAPK (mitogen activated protein kinase) a été mesurée (**Yao** et *al.*, 2008).

En somme, le traitement des cellules avec les flavonoïdes testés a permis d'inhiber la mort cellulaire induite par les UVB, ainsi que la génération d'espèces oxygénées réactives.

VI.10 Autres activités des flavonoïdes

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin. En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémisants et hypotriglycéridémisants chez les animaux diabétiques. L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire. À doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés.

L'activité immuno-modulatrice des flavonoïdes dépend, d'une part, de leur capacité à inhiber la formation des eicosanoïdes et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libres, d'autre part (**Frenot et Vering, 1997 ; Beta et al., 2005**)

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence (**Gabor et al., 1988**). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (**Ghedira, 2005**).

VII. LES TANINS

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau ; cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da.

VII.1 Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées (**Ghestem et al., 2001**). Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (**Khanbabae et Ree, 2001**).

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

CHAPITRE III: LE STRESS OXYDANT

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libres, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène? (**Koechlin-Ramonatxo**, 2006).

I. LES RADICAUX LIBRES

I.1 Généralités

Pour le spécialiste, cette expression désigne une molécule ou un groupe d'atomes portant un électron célibataire sur sa périphérie et pouvant se former par la perte ou le gain d'un électron lors de la rupture d'une liaison. Les mouvements électroniques suivent des règles désormais bien connues qui régissent leur positionnement à distance du noyau. La plupart du temps, les deux électrons qui forment la liaison chimique se retrouvent, lors de la rupture, sur le même fragment de molécule, ce qui donne des ions, particules bien plus stables que les radicaux dont les électrons non appariés ne demandent qu'à réagir (**Halliwell** et *al.*, 1999)

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\bullet ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO (**Fang** et *al.*, 2002).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène (ERO)** (**Favier**, 2003).

I.2 Nature des radicaux libres

I.2.1 Les espèces réactives dérivées de l'oxygène

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons radicalaires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme. Les mitochondries utilisent la plus grosse part de l'oxygène inspiré pour la production d'énergie. Cependant, 3 à 5% de cet oxygène, utilisé par les mitochondries lors de l'activité métabolique normale, sont inévitablement à l'origine des radicaux libres oxygénés, hautement toxiques (Favier, 2003).

I.2.1.1 Ion superoxyde : $O_2^{\bullet-}$

L'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial. Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

I.2.1.2 Radical libre hydroxyle : OH^{\bullet}

Le radical libre hydroxyle (OH^{\bullet}) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 6-10 secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde, il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :

- la réaction d'Haber-Weiss : $O_2^{\bullet-} + H^+ + H_2O_2 + Fe^{3+} \longrightarrow HO^{\bullet} + H_2O + Fe^{2+}$
- la réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \longrightarrow Fe^{3+} + H_2O + HO^{\bullet}$

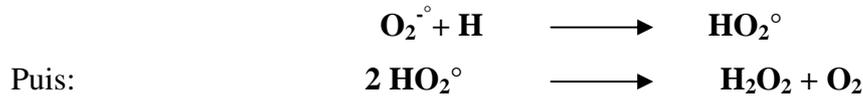
I.2.1.3 L'oxygène singulet : $1 O_2$

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



I.2.1.4 Le radical peroxyde: H_2O_2

Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ROS) même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



I.2.2 Les espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ROS. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ROS générant des molécules réactives et nocives (Shawkat et al., 2013).

I.3 Production de radicaux libres

Selon Lehucher-Michel (2006), la production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d' O_2 pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés.

Les autres sources sont classées en deux catégories :

- **Les sources endogènes** : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme,
- **Les sources exogènes** : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme (**figure 11**).

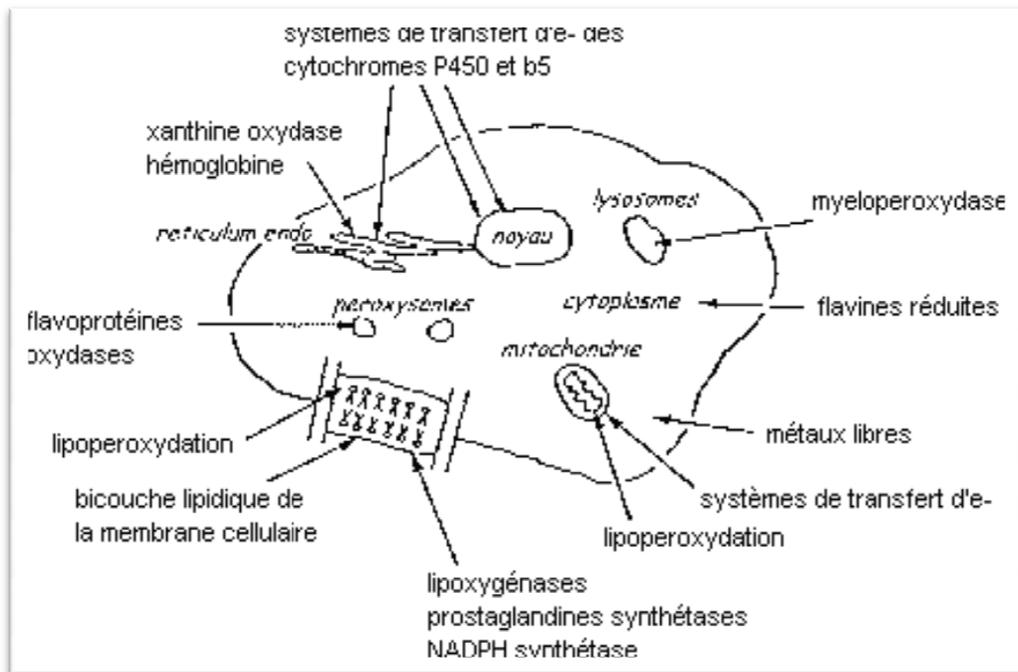


Figure n°11: Origine des radicaux libres dans la cellule

On peut citer :

- a. La mitochondrie est la source de production majeure d' $O_2^{\bullet-}$ dans la cellule intacte. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par là même à l'intensité d'oxygénation. Cette production peut également s'intensifier lorsqu'interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone).
- b. L'inflammation est, par ailleurs, une source importante de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées (Sreelatha et al., 2009). Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. De plus, les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF- α qui est capable de faire produire des radicaux libres par la mitochondrie des cellules cible.

Plusieurs autres systèmes enzymatiques produisent des radicaux libres au cours des réactions biochimiques (xanthine oxydase, hème oxygénase, cytochrome P450...). Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote (ou NO^{\bullet}) est elle aussi produite par des systèmes enzymatiques que sont les différentes NO Synthases (ou NOS) à des fins de médiation cellulaire. Rappelons que la production concomitante dans un même site de

NO et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au radical peroxydinitrite (**Halliwell** et *al.*, 1999)

- c. Une autre source importante de radicaux est les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ces différentes molécules endogènes ou exogènes (ascorbate, glutathion réduit, adrénaline, flavines) réagissent spontanément avec l'O₂ et sont ainsi oxydées conduisant à la formation d'O₂^{°-}. Ce mécanisme est souvent mis en cause pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette ou de certains médicaments (chloroquine, adriamycine, acetaminophène) mais il existe aussi pour des composés endogènes comme le lévulinate et surtout les catécholamines. Ce dernier mécanisme amplifié par les métaux fait l'objet de recherches actuelles sur l'origine de la maladie de Parkinson. Les O₂^{°-} sont également produits lors de la formation de méthémoglobine à partir d'oxyhémoglobine.
- d. Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libre (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) des radicaux hydroxyles très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées telles que l'amiante et/ou la silice sont aussi des sources de radicaux par la phagocytose exacerbée qu'elles déclenchent et aussi parce qu'elles sont recouvertes de sels de fer en surface.
- e. Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants

I.4 Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme

I.4.1 Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

I.4.1.1 Rôle dans la phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries. Après sa phagocytose par un macrophage, une bactérie se retrouve dans une vésicule appelée phagosome. Celui-ci va fusionner avec un lysosome pour donner un

phago-lysosome. Alors, une succession de réactions appelées « explosion respiratoire » a lieu. Son but est de générer des oxydants bactéricides (H_2O_2 , $O_2^{\circ-}$, $^{\circ}OH$, NO)

1.4.1.2 Rôle dans la communication cellulaire

Les ROS peuvent agir en tant que « molécule-signal » et ainsi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire.

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés.

En résumé :

- ✓ Les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes.
- ✓ La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants.
- ✓ Les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire.
- ✓ Les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messenger intracellulaire. La fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse de ROS (**Riché**, 1999).

Les antioxydants pourraient intervenir dans ces mécanismes et moduler la transmission du signal et l'expression des gènes. Par exemple, en piégeant les radicaux libres, ils coupent court à toute la chaîne de réactions qui conduisait à l'activation de gènes. Or, les messages cellulaires faisant intervenir les ROS sont impliqués, en particulier, dans les phénomènes de croissance cellulaire, d'apoptose et, éventuellement, dans les phénomènes de cancérogénèse. Les antioxydants, en bloquant ces types de messages, pourraient influencer la multiplication cellulaire. De plus amples recherches sont nécessaires avant de savoir si l'utilisation des antioxydants peut être bénéfique (**Bursal et al.**, 2011).

De plus, ce type de communication cellulaire semble faire intervenir des mécanismes spécifiques. N'importe quel antioxydant n'est donc pas capable de modifier ces réactions.

C'est pourquoi il faut déjà bien comprendre les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les ROS, pour voir s'il est, à la fois, possible et bénéfique de les modifier avec des antioxydants.

1.4.1.3 La réaction des radicaux libres sur les cellules

Quels effets exercent les radicaux libres dans nos cellules ? Leur omnipotence se traduit par une multitude d'effets qui ne sont pas tous néfastes, même si le public retient surtout leur responsabilité dans l'apparition du cancer, des blessures musculaires et tendineuses ou encore de la destruction de certains globules rouges ; ces derniers phénomènes concernant davantage les sportifs.

Parmi les actions bénéfiques, signalons que certains processus de défense immunitaire, mettant en jeu des neutrophiles et des macrophages, conduisent à la neutralisation d'hôtes indésirables grâce à des réactions radicalaires. Toutefois, celles-ci peuvent s'exercer en dehors de leur contexte habituel : lors de certains processus inflammatoires plusieurs catégories de cellules (dont les leucocytes) libèrent des radicaux libres, ce qui va déclencher des réactions en chaîne. L'attaque peut s'exercer, par exemple, contre les cellules gliales et l'acide hyaluronique du cartilage, et par l'intermédiaire de certains dérivés des prostaglandines ou d'acides gras essentiels des membranes.

Les bonnes graisses (les acides gras essentiels) localisées dans nos membranes constituent l'une des cibles privilégiées des radicaux libres. Ces nutriments perdent alors leur activité biologique et deviennent nocifs. La vitamine E protège activement ces lipides.

Le fort pouvoir réactif de ces dérivés leur permet également d'intervenir dans l'élimination de certains toxiques (drogues, médicaments) (**Singh** et *al.*, 2010). Enfin, parmi les conséquences bénéfiques de leur action, les scientifiques suspectent que l'attaque de l'ADN mitochondrial et des enzymes qui s'y trouvent favorise la formation de nouvelles mitochondries, ce qui participerait à terme aux processus d'adaptation à l'entraînement.

Cette hypothèse soulève un intéressant problème : quelle dose de radicaux libres s'avère nécessaire et suffisante pour déclencher cette adaptation, sans occasionner non plus trop de lésions, auquel cas se produirait une régression sensible des aptitudes ? Cette interrogation renvoie à des observations empiriques, selon lesquelles un excès de travail dans des conditions d'acidose poussée (propice à une accumulation de radicaux libres), provoque une chute spectaculaire de l'endurance.

La responsabilité de cette régression incomberait à une destruction des enzymes mitochondriaux sous le feu des RLO, ce qui abaisserait les capacités d'utilisation de l'oxygène par les tissus. Une anomalie de ce type surviendrait également dans les états de surentraînement. Mais nous n'en sommes qu'au stade des spéculations... (**Pincemail** et *al.*, 1999).

II. LE STRESS OXYDATIF

Le rôle des *radicaux libres* dans le *vieillessement* des cellules est une hypothèse définie en 1954 par le professeur américain Denham Harman, sous le nom de "*stress oxydatif*". Cette hypothèse pose, comme postulat de départ que le vieillissement des cellules, du corps et les *maladies dégénératives* associées, sont liés à l'action de sape des radicaux libres qui attaquent les cellules du corps.

Le stress oxydatif résultant des espèces réactifs de l'oxygène ROS et des espèces réactifs du Nitrogène RNS est associé à un déficit dans la balance antioxydant/ oxydant dans la cellule, qui conduit à une cascade de réaction dans la cellule affectant l'intégrité et la fonction de la membrane cellulaire (**Makeno** et *al.*, 2007).

II.1 Détermination des dommages biologiques

Les EOA peuvent interagir avec des protéines, de l'ADN, des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés pour former des dérivés oxydés pouvant être décelés dans des échantillons biologiques comme le plasma, le sérum ou l'urine.

II.1.1 Peroxydation lipidique

Aujourd'hui, il est universellement admis que la lipoperoxydation des lipides insaturés (acides gras et cholestérol) est à l'origine de la plupart des maladies. Elle provient en grande partie de notre alimentation (**figure 12**). En effet, par le stockage et le mode de préparation (friture, grillade, rôtisserie) de certains aliments (viandes ou poissons), nous apportons chaque jour à notre organisme un cocktail de radicaux libres, de lipoperoxydes et de divers métabolites issus de la lipoperoxydation, particulièrement nocif pour notre santé. Il s'agit d'une alimentation dite oxydative. Fort heureusement, il est cependant possible de neutraliser les effets nocifs de ces aliments par une alimentation dite « antioxydative » reposant sur la consommation des fruits et des légumes.

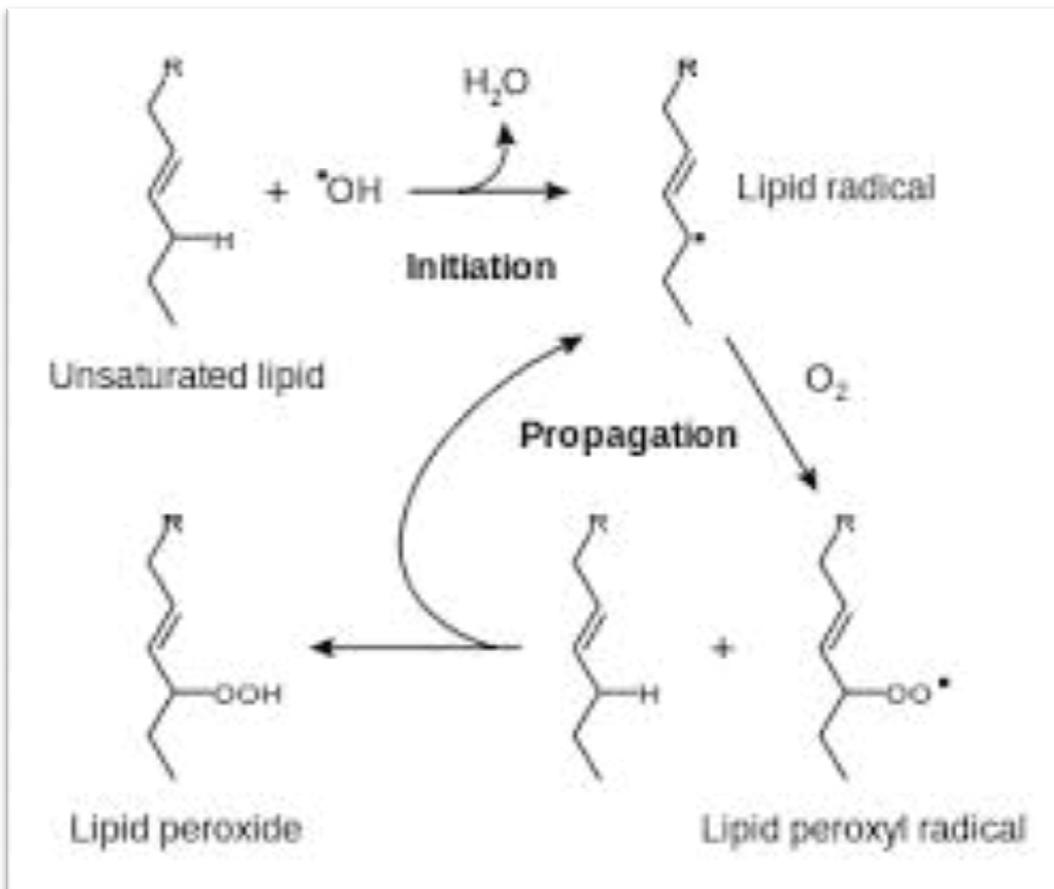


Figure n° 12: Mécanisme de la lipoperoxydation lipidique (Cillard et al., 2006)

L'équilibre biochimique oxydants/antioxydants est un élément capital qui conditionne notre état physiologique. Nous possédons un système naturel de défense antioxydant, enzymatique et non enzymatique contre les oxygènes dits « actifs » tels que les radicaux libres : anion superoxyde O_2^- , radicaux hydroxyle OH° , et peroxy ROO° , oxygène singulet $^1\text{O}_2$ ou des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2 ou le radical ROOH hydroperoxyde organique (Morelle- Lauzanne, 2006).

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH) qui peuvent être aisément mesurés avec des kits commercialisés.

Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits que sont les aldéhydes et les hydrocarbures.

La détection spectrophotométrique de la malonedialdéhyde (MDA) par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) est la méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique. Cette méthode est toutefois sujette à de très nombreux artefacts dans la mesure où la présence d'hémoglobine dans l'échantillon sanguin ou de fer dans les produits d'analyse interfère avec le test et donne en conséquence des résultats tout-à-fait erronés et peu fiables. L'utilisation de la méthode au TBA est de plus en plus abandonnée au profit d'une méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui dose la MDA sous sa forme libre. Néanmoins, la MDA reste un indice peu représentatif de la présence d'une peroxydation lipidique puisqu'elle ne représente qu'un pourcent des produits de décomposition des peroxydes lipidiques. Plus sensible et beaucoup plus fiable est la mesure d'un autre aldéhyde, le 4-hydroxynonéal (HNE) provenant de la dégradation des peroxydes d'acides gras de la famille ω -6. Il se mesure en routine au laboratoire par une méthode HPLC. En clinique, une élévation importante du taux sanguin en HNE a été observé dans l'hépatite d'origine ischémique (Cillard et al., 2006 ; Rashid et al., 2010).

II.1.2 Oxydation des lipoprotéines

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faible densité (*low density lipoproteins* ou LDL) qui sont riches en acides gras polyinsaturés. La peroxydation induite dans les LDL par les EOA provoque *in situ* la formation d'aldéhydes (MDA et HNE) qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses (*foam cells*). En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose.

Au début des années 90, des anticorps monoclonaux ont été mis au point dans les laboratoires de recherche pour mettre en évidence la présence de MDA et d'HNE dans les lipoprotéines oxydées. Avec cette technique, de nombreux chercheurs ont pu mettre en évidence une relation étroite entre un taux sanguin élevé d'anticorps dirigé contre des LDL oxydées et la progression de l'athérosclérose carotidienne (Gardes-Albert, 2004).

II.1.3 Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les EOA sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés.

En présence de dinitrophénylhydrazone (DNPH), ces dérivés carbonylés peuvent être mis en évidence dans des échantillons biologiques par spectrophotométrie, par la technique HPLC ou via des anticorps mono- et polyclonaux. Avec l'une de ces méthodes, des taux élevés de protéines oxydées ont été observés dans le liquide synovial de patients présentant une arthrite rhumatoïde ou dans le plasma de patients développant un syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (SDRA) lors de leur séjour en unité de soins intensifs.

Une méthode ELISA quantitative, sensible et applicable en routine dont les résultats se corrèlent parfaitement avec ceux obtenus par la méthode spectrophotométrique, a été mise au point. Avec cette méthode, une valeur moyenne plasmatique en protéines oxydées égale à 0,75nmol/mg a été observée chez 23 patients en soins intensifs contre une valeur de 0,06nmol/mg chez des sujets en bonne santé (**Favier**, 2003 ; **Valko et al.**, 2007).

II.1.4 Oxydation de l'ADN

Les EOA peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2 déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer. Utilisant des méthodes HPLC assez sophistiquées, il a été montré que le taux de ces dérivés d'ADN augmentait avec l'âge dans le cerveau humain. Ces analyses exigent toutefois énormément de précautions lors de la préparation de l'échantillon et demandent beaucoup de temps de sorte qu'elles ne peuvent se pratiquer que dans le cadre d'un laboratoire de recherche (**Valko et al.**, 2007).

II.2 Les systèmes antioxydants

Les antioxydants sont définis par **Halliwell** (1999), comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

II.2.1 Modes d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents.

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories (**figure 13**)

- **Système de défense primaire** : ex : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- **Système de défense secondaire** : ex : les tocophérols. Ces molécules sont dites «chain-breaking». Elles réagissent avec les ROO° et/ou les R°, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O₂⁻) à très réactives (OH°).

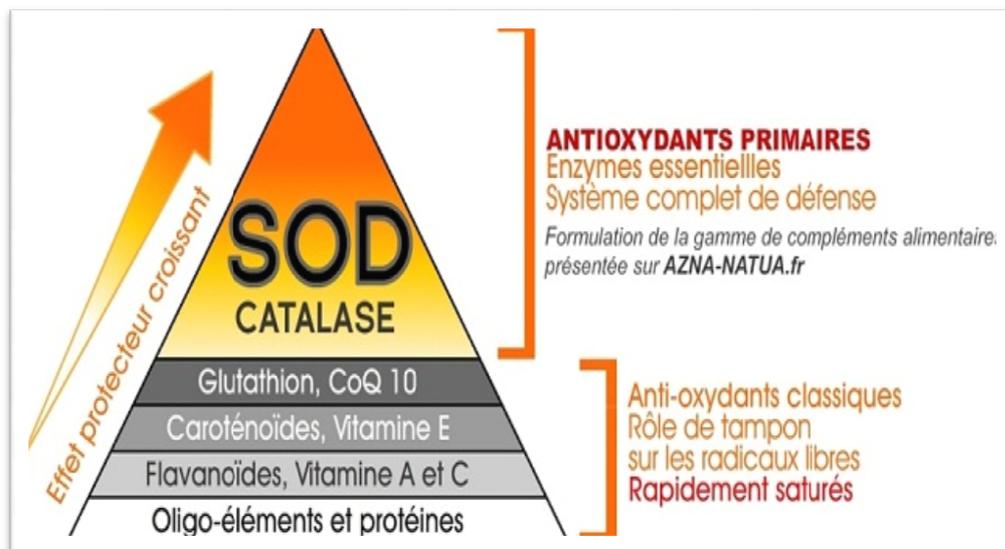


Figure n° 13: Les systèmes d'antioxydants cellulaires.

II.2.2 Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement.

II.2.3 Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories avec :

- Les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
- Les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules (**figure 14**).

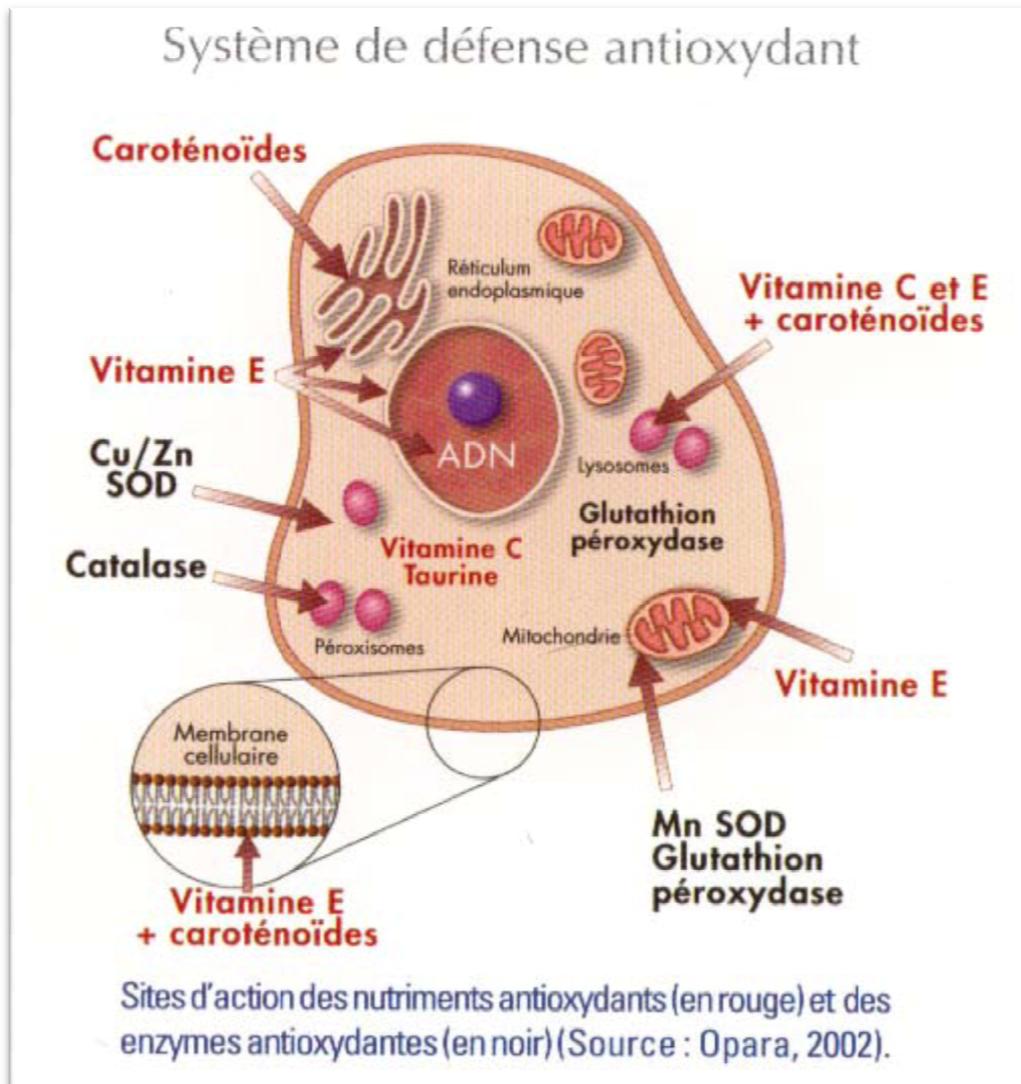


Figure n°14: Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir).

II.3 Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux capacités antioxydantes de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture. Les défenses exogènes semblent les plus faciles à

conforter puisqu'elles pourraient être renforcées par des apports de compléments alimentaires. Cela pourrait être très intéressant de les utiliser, par exemple, chez l'individu vieillissant.

En effet, avec l'âge, les individus sont plus sensibles au stress oxydant. Leur capacité d'absorption intestinale de molécules antioxydantes d'origine alimentaire est moins efficace. Les mécanismes de défenses endogènes de l'organisme s'essouffant avec l'âge, les espèces radicalaires se multiplient (**Suhartono et al.**, 2012)

II.3.1 La défense contre les radicaux libres oxygénés

Divers phénomènes contribuent heureusement à minimiser l'impact des radicaux libres oxygénés sur nos tissus.

La première barrière est physiologique ; la propagation de ces réactions se voit limitée par le franchissement des membranes des différents compartiments où de multiples composés viennent piéger ces molécules instables (**Kalegari**, 2013). Parmi ces défenseurs figurent la vitamine E, antioxydant lipophile situé dans les membranes et dans la mitochondrie, autrement dit au coeur du réacteur ; la vitamine C, le glutathion (peptide fixé sur une enzyme et neutralisant certains radicaux), le sélénium, l'acide lipoïque ou le coenzyme Q10, constituant mitochondrial, le seul de cette série à ne pas figurer de façon naturelle dans notre ration. Il peut par ailleurs exercer à des doses plus élevées un rôle pro-oxydant, ce qui en rend à la fois délicate et prématurée la préconisation aux athlètes désireux de se protéger contre les radicaux libres oxygénés.

II.3.2 Systèmes antioxydants de protection

Dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispose de systèmes efficaces de protection qui lui permettent de lutter contre ces espèces radicalaires. Ces systèmes de défenses sont constitués d'un dispositif endogène de nature enzymatique représenté par :

- Les superoxydes dismutases (SOD), capables d'éliminer l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera les superoxydes dismutases à manganèse (mitochondriale), les superoxydes dismutases à cuivre et zinc (cytosolique), face externe de la membrane des cellules endothéliales (plasma sanguin).

- Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer et les glutathion peroxydases à cofacteur sélénium (GPx). De nombreux autres systèmes enzymatiques existent comme les glutathion transférases, les thioredoxines réductases ou la thyroïde peroxydase (**Gardes-Albert, 2004**).

II.3.3 Les antioxydants

Selon (**Riché, 1999**), les différents antioxydants nutritionnels sont :

a. La vitamine E

- La vitamine E interrompt la phase de propagation de la réaction de peroxydation lipidique,

La peroxydation lipidique des phospholipides membranaires est un facteur de désorganisation et de dysfonctionnement cellulaire qui modifie la perméabilité et la fluidité de la membrane. Principal antioxydant liposoluble, la vitamine E a une action privilégiée pour limiter ce type de réactions (**figure 15**), elle intervient en interrompant la phase de propagation radicalaire des acides gras insaturés (AGI). Les tocophérols, dont la vitamine E, sont oxydés par RO^\bullet , ROO^\bullet , O_2^\bullet en quinones et semi-quinones.

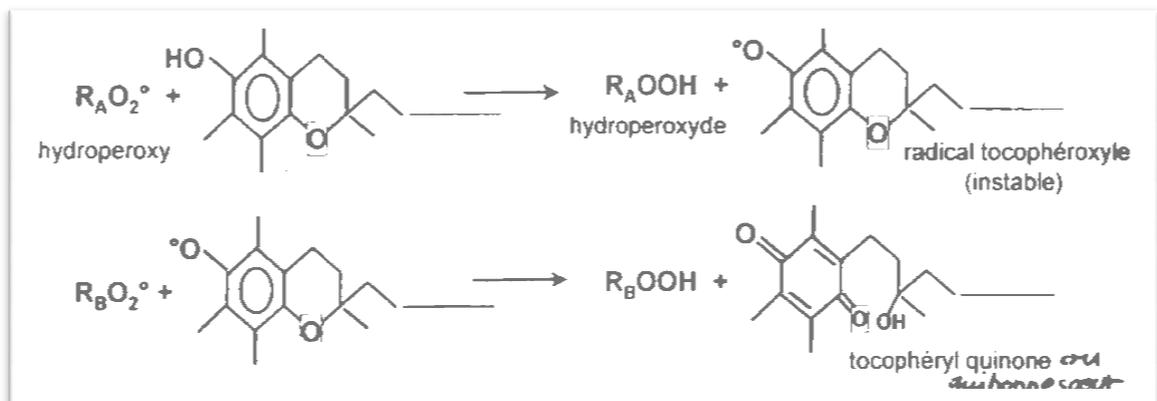


Figure n°15: Action antioxydante de la vitamine E: interruption de la phase de propagation.

- **Les tocophérols piègent l'oxygène singulet**

Les tocophérols inhibent les oxydations induites par l'oxygène singulet. L' α -tocophérol a une meilleure efficacité que le bêta et le delta. 40 à 120 molécules d'oxygène singulet peuvent être neutralisées, avant que ce tocophérol ne soit détruit.

Cette activité est cependant 50 fois moindre que si elle était réalisée par les caroténoïdes.

b. La vitamine C

Son mécanisme d'action est mal connu. Il fait intervenir des réactions d'oxydo-réduction entre la forme réduite de la vitamine C (l'acide ascorbique) et sa forme oxydée (déhydroascorbate). L'ascorbate capte les anions superoxydes, hypochlorite, hydroxyl et l'oxygène singulet.

Ses principaux rôles sont les suivants :

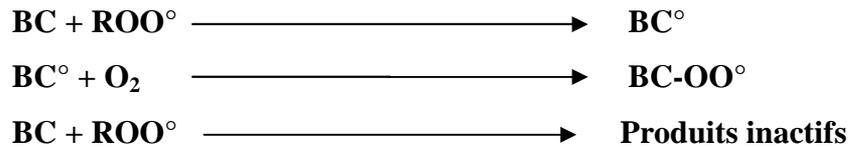
- *In vitro*, il inhibe la peroxydation lipidique avant la vitamine E.
- Il protège les membranes vis à vis de l'attaque peroxydative, en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO° dans la phase aqueuse, avant qu'ils puissent initialiser les peroxydations
- Il est capable de neutraliser l'oxygène singulet.
- On la tient pour un antioxydant efficace, en raison de sa capacité à régénérer la vitamine E sous sa forme active. La vitamine C ne peut cependant la remplacer; elle ne corrige pas la chute d'endurance et l'hémolyse consécutives à la carence en vitamine E.

Notons que la vitamine C peut présenter une action paradoxale. En effet, son administration médicamenteuse à doses faibles, en favorisant l'assimilation du fer sous sa forme la plus réactive, contribue à la genèse de RLO. Pour cela, quand on a recours à des préparations pharmaceutiques à base de fer, il faudrait fournir au moins 150 mg de vitamine C simultanément.

c. Le bêta-carotène (provitamine A)

Son rôle antioxydant a d'abord été mis en exergue indirectement, les données épidémiologiques suggérant que son apport réduisait l'incidence de certaines formes de cancer, et qu'inversement son déficit contribuait à un risque accru (Yakub et al., 2008).

Il est capable de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



Il empêche aussi l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet.

Dans le domaine de la nutrition de l'effort, deux travaux indépendants publiés en 1993 soulignent que la prise de ce nutriment limitait l'ampleur des atteintes des graisses des membranes, processus désigné par peroxydation.

Elle intervient isolément ainsi qu'en combinaison avec les vitamines C et E, sous forme de préparation antioxydante.

d. Le sélénium

Coenzyme d'une enzyme impliquée dans le recyclage des RLO, ses apports ne couvrent pas toujours nos besoins. La quantité de sélénium présente dans l'organisme est faible, environ 10 à 20mg. Son rôle essentiel a été établi en 1957 en raison de sa capacité à prévenir chez l'animal diverses maladies d'origine nutritionnelle : dystrophie musculaire, atrophie du pancréas, nécrose du foie, troubles de la reproduction et déficits immunitaires. Chez l'homme, la carence en sélénium est impliquée dans la maladie de Keshan (cardiomyopathie sévère) et dans des dystrophies musculaires.

Par ailleurs, le sélénium est nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes telles que les glutathion peroxydases (Gpx). Ces enzymes permettent de détoxifier les hydroperoxydes et les peroxydes organiques.

e. Le zinc

Coenzyme d'une enzyme antioxydante importante, les besoins en cet oligo-élément sont rarement couverts totalement.

L'importance du zinc dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale : le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes, précurseurs de la chaîne des RL. Mais son action essentielle semble plutôt se situer au niveau de la génération du radical hydroxyl en tant qu'antagoniste du fer. Les implications du zinc dans la biosynthèse des acides gras et

des prostaglandines soulignent également son importance dans la réaction inflammatoire.

En raison d'un apport alimentaire usuel situé souvent à la limite des besoins nutritionnels et de l'intervention de nombreux facteurs physiologiques ou pathologiques susceptibles d'influencer la résorption ou l'élimination du zinc. Les A.N.C sont estimés à 12mg/j.

f. Le manganèse

Il s'agit du cofacteur exclusif de la seule enzyme antioxydante des mitochondries. Bien que ses carences soient exceptionnelles en raison de son ubiquité, on veillera à ne pas négliger les céréales, les laitages et les légumes secs.

g. Le cuivre

Son rôle est controversé ; d'une part il intervient comme coenzyme d'un système épurateur (la superoxyde dismutase) ; d'autre part, il favorise fortement la formation de RLO (comme le fer). On ne fait actuellement aucune recommandation particulière à son sujet en rapport avec la lutte contre les radicaux, car les données sont trop parcellaires pour pouvoir adopter une position tranchée à son sujet.

h. L'acide lipoïque

Connu pour son rôle métabolique, il peut exister sous deux formes. Il peut s'agir tantôt d'un antioxydant (en synergie avec le coenzyme Q10), tantôt d'un dérivé pro-oxydant, ce qui doit inciter à l'utiliser avec prudence. Sous sa forme normale, il neutralise le radical hypochloride et protège certains acides aminés de l'attaque radicalaire. Il abonde dans la viande, mais les données relatives à sa teneur dans les aliments faisant défaut, son apport sous forme de supplémentation a été envisagé à l'étranger.

i. Métabolisme de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'acide arachidonique ressemble à une peroxydation lipidique et enzymatique contrôlée. Les radicaux libres augmentent l'activité de la phospholipase A2 membranaire et la libération de l'acide carotène à partir des lipides membranaires. Celui-ci est à l'origine de la production de prostaglandines et de leucotriènes. Ces molécules interviennent ensuite dans les réactions inflammatoires, par exemple. En

bloquant ce type de réaction, la vitamine E permettrait de limiter l'emballement de la réaction immunitaire et aurait des effets immunomodulateurs.

j. Le glutathion

Isolé et caractérisé dès la fin du XIX^{ème} siècle, on en a établi la formule en 1935. Il se forme à partir de trois acides aminés, le glutamate, la glycine et la cystéine, cette dernière lui apportant le groupe soufré caractéristique de cette molécule. Grâce à cela, il intervient comme agent détoxiquant et participe à la neutralisation de certains radicaux libres, notamment comme cofacteur de l'enzyme glutathion-peroxydase.

Par ailleurs, il participe à la synthèse d'ADN, des protéines et intervient dans des processus de transport cellulaires. Sa contribution majeure demeure cependant son rôle d'antioxydant, qui dépend d'un apport protéique correct, notamment en acides aminés soufrés. Certains travaux ont proposé d'accroître la fourniture de cystéine dans le but de favoriser la fabrication du glutathion. Mais cet acide aminé présente une toxicité réelle pour des doses relativement faibles, qui doivent dissuader d'entreprendre une telle procédure. L'activité physique en accroît l'utilisation et le renouvellement alors qu'il s'agit d'un élément clé de la lutte anti radicaux libres, son efficacité semble relativement indépendante, dans l'état actuel de nos connaissances, du contenu de la ration hormis évidemment toute situation de franche carence protéique.

k. Le coenzyme Q10

Il s'agit du seul des antioxydants qui ne figure pas dans notre ration. Maillon des réactions mitochondriales, il aide à recycler la vitamine E et pourrait également jouer un rôle antioxydant par lui même.

On l'a, à une époque, suspecté de favoriser la formation de radicaux libres et cette affirmation a été largement relayée depuis, notamment dans l'ouvrage de Fred Brouns où la bibliographie mentionnée, paradoxalement, n'autorise pas après relecture attentive une position aussi tranchée. D'autres travaux l'ont d'ailleurs en partie innocenté, mais quoiqu'il en soit, une attente prudente se justifie, faute d'informations suffisantes, même si on y a recours depuis plus de 20 ans chez des sujets atteints de pathologies cardiaques, ce qui jette un sérieux doute quant à son caractère pro-oxydant...

Les démarches nutritionnelles à mettre en œuvre dans la lutte antioxydante demeurent floues, le détail des composés impliqués, les doses utiles, les interactions, les éventuels effets prooxydants ou les surdosages possibles laissant en 1997 trop de zones d'ombre (**Favier**, 2003).

l. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes (thé, raisin, cacao, blé, orge, maïs, fruits et légumes...). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes.

En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Leonid et al.**, 1997).

m. Taurine

La taurine (acide 2-aminoethanesulfonique) est un acide aminé sulfoné. La majeure partie de cette molécule se trouve dissoute dans le cytosol soit liée aux membranes cellulaires. Son action dans l'organisme est mal connue. Elle serait capable d'inactiver des radicaux libres. A côté de son rôle dans les défenses antioxydantes, elle participerait aussi à la régulation de la pression osmotique cellulaire en modifiant les concentrations intracellulaires de calcium.

II.4 Evaluation du stress oxydatif

La plupart des études mettant en évidence le stress oxydatif comme l'un des facteurs étiologique de certaines pathologies ou d'exposition à un facteur environnemental (alcool, tabac, ...) ou évaluant l'efficacité de micronutriments dans la prévention de ce stress oxydatif ont utilisé les marqueurs biologiques suivants :

▪ **Les Marqueurs du statut** : L'évaluation d'un état nutritionnel peut être faite par l'analyse du statut plasmatique, érythrocytaire, leucocytaire (plus délicat) pour les micronutriments antioxydants (vitE, C, caroténoïdes, Zn, Se). Etant donné que certains micronutriments sont des facteurs coenzymatiques des enzymes appartenant aux

systèmes de défense, l'activité enzymatique de la GPx, de la SOD Cu-Zn, peuvent renseigner sur le statut antioxydant. La mesure du rapport GSH/GSSG est un bon reflet de l'état rédox. La mesure du pouvoir anti-oxydant total du plasma (TRAP : « total radical trapping parameter) peut se révéler un marqueur du stress oxydant.

Cependant cet essai doit être interprété avec précaution car des augmentations des concentrations plasmatiques de l'albumine, de l'acide urique et de la bilirubine pourraient masquer le déficit en d'autres antioxydants.

▪ **Les lésions dues au stress oxydatif** : peuvent être évaluées : tant au niveau des protéines par le dosage des groupements thiols (SH : marqueur d'une non oxydation) ou des groupements carbonyles (C=O ; marqueurs d'une oxydation) ; qu'au niveau des lipides par le dosage des produits de dégradation des lipides oxydés (HNE ; MDA ; TBARS, isoprostanes) ; qu'au niveau de l'ADN par le dosage des bases oxydées ou des cassures de brins (**Gardes-Albert, 2004**).

II.5 Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, athérosclérose, diabète... (**Atawodi, 2005**).

CHAPITRE IV: TOXICITÉ

I. GENERALITES

Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui-même et sur sa progéniture (**Sasseville**, 1980). Les substances toxiques peuvent atteindre les organismes vivants par la respiration, la pénétration au travers de la peau et par la voie trophique.

Les êtres vivants présentent des troubles physiologiques variés selon les quantités absorbées et la durée d'exposition à une substance toxique.

Les toxiques ne présentent pas tous le même degré de toxicité. Certains ont une faible toxicité, même si on les absorbe en grande quantité, par exemple le sel de table, tandis que d'autres ont une forte toxicité, même si on en absorbe de faibles quantités, notamment les dioxines. On peut en partie expliquer de telles variations par les différences qui existent entre la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement d'un organisme.

De plus, les caractéristiques physico-chimiques, par exemple la grosseur des poussières, la volatilité et la solubilité dans l'eau, interviennent également dans la réponse toxique. Ainsi, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des toxiques proprement dits se révèle importante pour en évaluer la toxicité (**La pointe**, 2004).

II. NOTIONS DE TOXICITE

II.1 Toxicité par administration unique: toxicité aiguë

Elle se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées.

C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le

médicament. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux et fournit pour autant que cela soit possible, l'indication de la DL_{50} avec ses limites de confiance (95%). L'étude sur l'animal de laboratoire doit être effectuée sur un nombre égal d'animaux mâles et femelles. La durée de l'observation des animaux est précisée par l'expérimentateur ; en général, elle n'est pas inférieure à une semaine.

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose qui tue 50% des animaux d'expérience (DL_{50}) ainsi que la dose maximale sans effet toxique (DME) c'est-à-dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin (Traore, 1999).

II.2 Toxicité par administration répétée : toxicité subaiguë et chronique

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active examinée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifères dont un non-rongeur. Une des deux épreuves durera 2 à 4 semaines, l'autre 3 à 6 mois. Le choix de la ou des voies d'administration doit tenir compte de la voie pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas codifiés strictement mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais. Il est utile de choisir la dose la plus élevée de façon à faire apparaître des effets nocifs, les doses inférieures permettent alors de situer la marge de tolérance du nouveau produit chez l'animal. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance, de la formule sanguine et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes extérieurs ainsi que la base des comptes rendus nécrosiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent.

III. DEFINITION ET PROPRIETES DES SOLVANTS

Selon Koller et *al.* (2002), les solvants sont des substances organiques liquides et souvent volatiles capables de dissoudre d'autres substances. Le processus de dissolution ne modifie ni le solvant ni les composés dissous. Les différentes propriétés chimiques telles que polarité, tension de vapeur, point d'ébullition et volatilité déterminent leur domaine d'application. Ils sont utilisés comme solvants à proprement parler, mais également en tant que matières de base dans l'industrie chimique et comme réfrigérants, antigels, propulseurs de

sprays, insecticides, carburants. L'éthanol est, par ailleurs, connu pour contribuer à l'agrément de certaines boissons.

IV. METABOLISME ET TOXICOLOGIE

Même s'ils sont chimiquement très semblables, les solvants peuvent être métabolisés par des voies totalement différentes et développer ainsi des toxicités variées. Il convient de noter que les effets toxiques ne sont parfois pas seulement imputables au solvant même mais à ses métabolites ou à des impuretés (**figure n° 16**).

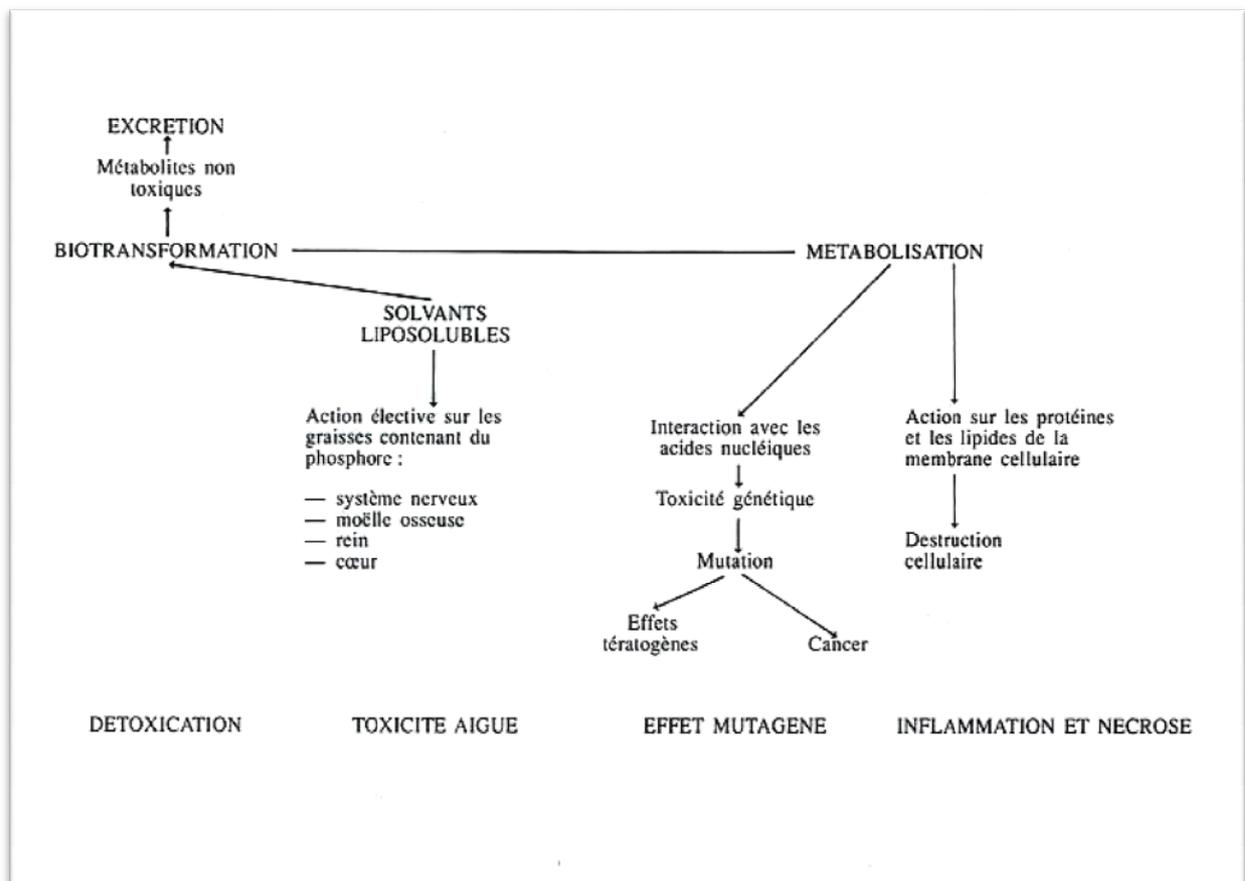


Figure n°16: Solvants et toxicité.

IV.1 Résorption

Selon **Garnier** (2008), les solvants peuvent pénétrer dans l'organisme par les voies respiratoires, digestives ou par la peau.

IV.1.1 Voies respiratoires

Les voies respiratoires constituent la principale voie d'absorption (par inhalation) des solvants au poste de travail. La résorption dépend de la concentration dans l'air, du volume

ventilatoire minute et de la solubilité dans le sang. Avec l'activité physique ou certaines affections respiratoires, l'augmentation du volume ventilatoire par minute peut multiplier la résorption (Maitre, 2003).

IV.1.2 Epiderme

De nombreux solvants sont également bien résorbés par la peau, avant tout par diffusion passive selon la loi de Fick. Plus une substance est lipophile, petite et fortement concentrée et plus elle sera facilement résorbée. Plusieurs autres facteurs tels que volatilité, point d'ébullition, vasodilatation, action d'additifs dans des crèmes favorisant la perméabilité, localisation et étendue de la peau exposée, température et degré d'hydratation de cette dernière, nombre de follicules pileux, combinaison avec d'autres nuisances chimiques, durée du contact, effet-retard ainsi que prédispositions individuelles jouent un rôle dans la résorption cutanée. La résorption cutanée de vapeurs de solvants est très faible.

La principale barrière protectrice de la peau est le *stratum corneum* (couche cornée), épais d'environ 20 µm. Une fois qu'elle a traversé cette couche supérieure de l'épiderme, la substance étrangère parvient assez facilement dans la circulation sanguine. Des lésions du *stratum corneum*, eczéma par exemple, favorisent de manière décisive la résorption, qui peut même être plus importante que la résorption par les poumons. D'infimes lésions cutanées peuvent déjà accroître de façon significative la charge de substances dangereuses.

IV.1.3 Tractus gastro-intestinal

La résorption gastro-intestinale est très rapide, mais ne survient presque exclusivement qu'en cas d'absorption accidentelle ou intentionnelle et ne joue pas un rôle prépondérant en médecine du travail.

IV.2 Biotransformation et élimination

De par leur caractère lipophile, les solvants absorbés sont acheminés par le flux sanguin vers les tissus riches en graisse, c'est-à-dire avant tout dans le système nerveux, la moelle osseuse, le foie et le pannicule adipeux. Au niveau du foie, les solvants sont métabolisés et éliminés par la voie urinaire, à l'exception de l'acide trichloracétique et le tétrachloréthylène, qui sont en majeure partie expirés tels quels. Selon la demi-vie de la biotransformation, le solvant peut rester plusieurs jours dans les tissus (body burden) et être ainsi redistribué

lentement dans le sang un certain temps après la résorption. En l'occurrence, des polymorphismes génétiques et l'inhibition ou l'induction d'enzymes métaboliques par le solvant jouent également un rôle. Pour les solvants éliminés avant tout par expiration, c'est le volume ventilatoire par minute qui influence la vitesse d'élimination.

Certains solvants se décomposent en métabolites plus toxiques que la substance mère. Tel est le cas du tétrachlorure de carbone, décomposé en radical trichlorométhyl, hépatotoxique ou du diméthylformamide qui présente également un métabolite hépatotoxique avec le monométhylformamide. Le n-hexane et le 2-hexanone possèdent, par exemple, des produits de décomposition neurotoxiques avec le métabolite 2,5-hexanedione alors que des produits de décomposition cancérigènes sont issus du trichloréthylène (di- et trichloracétate) et du benzène (métabolites phénoliques).

IV.3 Interactions

IV.3.1 Interactions pharmacocinétiques

Lors de mélanges de solvants, leurs effets peuvent se potentialiser ou se neutraliser par l'activation ou l'inhibition d'enzymes. En tant que produit d'agrément fréquemment utilisé, l'éthanol est ici d'une importance particulière. Il interagit avec les enzymes microsomales du cytochrome P450 et renforce ainsi la toxicité d'autres solvants tels que toluène, xylène, MEC ou trichloréthylène dont il inhibe l'élimination. A l'inverse, il peut également réduire l'effet toxique d'autres substances par induction enzymatique.

IV.3.2 Interactions biologiques

Pour les substances neurotoxiques, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité du tétrachlorure de carbone est renforcée par l'exposition simultanée à l'acétone ou à l'isopropanol. Il existe également des interactions dermiques dans le sens d'un effet de Carrier percutané: des solvants qui ne peuvent pas, en eux-mêmes, pénétrer la peau peuvent quand même la traverser s'ils sont dissous dans du DMSO ou des composés du glycol.

IV.4 Tableaux cliniques

Presque tous les solvants organiques présentent une neurotoxicité centrale et/ou périphérique; certains sont également hépto-, néphro-, hémato- ou cardiotoxiques. Des doses

élevées absorbées en peu de temps entraînent des intoxications aiguës. En revanche, de petites quantités incorporées au cours de périodes prolongées provoqueront des tableaux chroniques. La répétition d'intoxications aiguës peut aboutir au même résultat. L'évolution des intoxications dépend avant tout de la dose et en second lieu également de l'âge, du sexe et de la constitution de la personne concernée. Les lésions aiguës sont habituellement réversibles après la fin de l'exposition, alors que les effets chroniques peuvent persister au moins partiellement.

IV.4.1 Epiderme

Les solvants provoquent des irritations de la peau ainsi que des muqueuses et des conjonctives. En cas d'exposition intensive de la peau, un eczéma de contact toxique aigu avec lésion des cellules épidermiques peut se développer. Une irritation persistante souvent sous-liminaire peut également entraîner une dermatite d'usure (eczéma de contact irritatif chronique ou cumulatif subtoxique), où les lésions hyperkératosiques sont au premier plan. Les atteintes se limitent à la localisation de l'exposition, le plus souvent les mains. L'effet irritatif des solvants trouve vraisemblablement sa principale origine dans les propriétés dégraissantes des solvants. Les eczémas causés par les solvants représentent environ 20 % des dermatoses observées en médecine du travail et concernent avant tout les peintres, les imprimeurs et les mécaniciens. En revanche, les réactions allergiques de la peau aux solvants sont rares (**Annonyme**, 2002)

Les solvants ne provoquent généralement pas de tableaux pathognomoniques. Toutefois, outre des irritations non spécifiques, il existe des tableaux cliniques spécifiques tels que la chloracné, provoquée par certains types de dioxines et de polychlorobiphényles. Le sulfure de carbone (disulfure de carbone) est particulièrement irritant pour la peau.

IV.4.2 Voies respiratoires

Selon le degré d'exposition, les irritations des muqueuses de l'appareil respiratoire peuvent entraîner des troubles allant de la toux et dyspnée à une pneumonie chimique et un oedème pulmonaire. A cet égard, butanol, styrène, toluène, xylène et méthyléthylcétone sont particulièrement irritants pour les voies respiratoires, alors que l'acétate d'éthyle, l'isopropanol, le méthanol, l'acétone et l'éthanol ne le sont que dans une faible mesure. Une certaine habitude aux propriétés irritatives de nombreux solvants apparaît avec le temps.

IV.4.3 Système nerveux

Presque tous les solvants présentent des propriétés neurotoxiques, mais le degré et la localisation de l'atteinte varient fortement d'un produit à l'autre. Les symptômes sont en partie non spécifiques et apparaissent également lors d'autres affections telles que la dépendance à l'alcool ou la dépression ; ce qui doit être pris en compte en diagnostic différentiel.

En général, les intoxications aiguës aux solvants ont, au premier plan, les mêmes effets sur le système nerveux central que la prise d'alcool (qui est par ailleurs également un solvant). A un stade pré narcotique avec vertiges, obnubilation, paresthésies, excitation et ivresse succède la perte de connaissance ou même la paralysie respiratoire. Certaines substances comme l'éther éthylique, le trichloréthylène et le trichlorométhane étaient autrefois utilisées comme anesthésiques en raison de leurs propriétés narcotiques. L'effet sur le système nerveux central (SNC) dépend de la liposolubilité et, donc, de la concentration du solvant dans le cerveau. Pour apprécier le danger, la concentration dans le sang est mesurée. Si ce n'est pas en premier lieu le solvant qui est neurotoxique, mais son métabolite, la concentration dans le sang du solvant n'est pas particulièrement représentative; dans ce cas, le métabolite concerné est déterminé dans les urines. Tel est le cas pour le n-hexane et son produit de décomposition, la 2,5-hexanédione.

Outre le système nerveux central, le système nerveux végétatif est concerné, ce qui se traduit par des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements) et des troubles vasomoteurs (sensation de chaleur, battements de coeur, symptômes orthostatiques).

L'atteinte chronique du système nerveux provoque des troubles centraux et périphériques. Au niveau périphérique figure au premier plan la polynévrite toxique avec des troubles sensitivomoteurs symétriques marqués aux jambes et aux bras et remontant de distal vers proximal. Sur le plan anatomopathologique, on trouve une axonopathie distale et une démyélinisation. Au stade initial, les patients se plaignent de dysesthésies, d'hyperesthésie, de crampes dans les mollets et/ou les avant-bras et de faiblesse musculaire des membres. Apparaissent ensuite troubles de la sensibilité, parésie, dysrégulation orthostatique et perte de la puissance et de la libido. (**Chaze**, 2004).

Selon **Maitre** (2003), les lésions centrales correspondent à une encéphalopathie toxique qui se manifeste au début par un syndrome pseudo neurasthénique réversible avec abattement,

agitation, irritabilité, troubles du sommeil et de la concentration avant de réaliser un tableau de syndrome psycho-organique. Selon l'évolution clinique, on distingue les stades suivants:

- **Degré de gravité 1 «organic affective syndrome»** : Fatigabilité, troubles de l'attention et de la concentration, perte d'appétence. Pas de modifications dans les tests psychométriques. Réversible.
- **Degré de gravité 2a «mild chronic toxic encephalopathy»** : Modification marquée de la personnalité avec fatigue, labilité de l'affect, manque de contrôle des impulsions et perte de motivation. Mise en évidence de légères pertes cognitives dans les tests psychométriques. Réversibilité variable.
- **Degré de gravité 2a «mild chronic toxic encephalopathy»**: Egalement d'éventuelles atteintes neurologiques légères telles que tremor et troubles de la coordination. Tests psychométriques pathologiques. Généralement irréversible.
- **Degré de gravité 3 «severe chronic toxic encephalopathy»**: Démence associée à des modifications neurologiques. Mise en évidence de fortes restrictions dans les tests psychométriques. Symptômes généralement non réversibles même après la fin de l'exposition. Le degré de sévérité 3 peut apparaître après des années d'exposition à de fortes concentrations de solvants.

IV.4.4 Organes internes

a. Foie

Les atteintes organiques aiguës se manifestent généralement sous l'aspect d'une hépatopathie toxique qui ne se traduit souvent que par une élévation enzymatique. La répétition de poussées aiguës ou l'exposition chronique conduisent finalement à la cirrhose en passant par le stade de la stéatose hépatique. Le mécanisme de l'hépatotoxicité peut se montrer sous forme de réaction inflammatoire, de stress oxydant, de dysfonction du système des cytochromes P450 ou des mitochondries. L'ampleur de la lésion dépend de l'âge, de l'espèce, de l'état nutritionnel, de facteurs génétiques ou d'interactions avec des médicaments ou de l'alcool.

b. Reins

Les expositions à de fortes concentrations de tétrachlorure de carbone, d'éthylène et de diéthylène glycol ou de toluène peuvent conduire à une nécrose tubulaire aiguë et à

une insuffisance rénale. Les contacts de longue durée avec les solvants peuvent provoquer de légères atteintes tubulaires et glomérulaires. Certains éléments renvoient également à des glomérulonéphrites. L'acétone et l'isopropanol potentialisent non seulement l'effet hépatotoxique susmentionné, mais également l'effet néphrotoxique du tétrachlorure de carbone.

c. Coeur

Certains solvants tels que le trichloréthylène (et éventuellement d'autres hydrocarbures halogénés) influencent le métabolisme des catécholamines et peuvent ainsi déclencher des troubles du rythme et une fibrillation cardiaque. Le toluène peut également provoquer des arythmies. Le dichlorométhane est métabolisé en monoxyde de carbone par l'organisme, ce qui réduit l'approvisionnement en oxygène du myocarde. Des événements cardiovasculaires ont également été rapportés après action de disulfure de carbone favorisant une athéromatose.

V. CANCEROGENICITE DE SOLVANTS

Certains solvants sont cancérigènes. Ils sont rattachés aux catégories C1 à C3. La catégorie C1 se réfère aux substances que l'on sait être cancérigènes pour l'homme. La catégorie C2 renvoie à des substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme sur la base d'études à long terme sur l'animal et d'autres informations, La catégorie C3 désigne des substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles, mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante. A ces trois classes ont été rattachés le benzène (C1), le trichloréthylène et le trichlorométhane (C2) ainsi que le dichlorométhane et le tétrachloréthylène (C3) (**Bégin et al.**, 2006).

VI. LE TETRACHLORURE DE CARBONE CCl₄

Cette substance est hépatotoxique et a conduit à des tumeurs du foie lors d'expérimentations sur l'animal où il peut entraîner une nécrose tubulaire aiguë avec insuffisance rénale consécutive.

Le tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone est un composé chimique chloré de formule brute : CCl₄.

À pression et température ambiante, c'est un liquide incolore, très volatil dont les vapeurs sont nocives pour les êtres vivants et dangereux pour la couche d'ozone.

En chimie organique, le tétrachlorométhane est souvent employé en tant que solvant, même si son usage tend à diminuer en raison de sa forte toxicité. Il est ainsi souvent remplacé par le chloroforme ou le dichlorométhane.

Dans l'Union Européenne, compte tenu des mesures pour protéger la couche d'ozone, la production et l'importation sont interdites depuis 1995. Comme réfrigérant, le tétrachlorométhane porte le code R-10 (**Teschke et al.**, 1983 ; **Pichard**, 2005; **Zang et al.**, 2013).

VI.1 Propriétés physico-chimiques

Le tétrachlorure de carbone est un solvant volatil dont les vapeurs sont 5 fois plus lourdes que l'air ; il est très peu soluble dans l'eau mais est soluble dans de très nombreux solvants organiques. Stable dans les conditions normales d'emploi, à température ordinaire, il se décompose à la chaleur pour former de l'acide chlorhydrique, de l'anhydride carbonique et du phosgène.

VI.2 Propriétés cinétiques principales

L'absorption du tétrachlorure de carbone se fait par voie pulmonaire, digestive mais très peu à travers la peau (sauf quand celle-ci est lésée).

Après inhalation, il est distribué dans le tissu adipeux, le foie, la moelle osseuse. Après une série de transformations métaboliques faisant intervenir une enzyme microsomiale, le tétrachlorure de carbone donne comme métabolites du dichlorocarbonyle, du monoxyde de carbone et du dioxyde de carbone entre autres.

Une partie (environ 70 %) est éliminée sous forme inchangée dans l'air exhalé, le reste est éliminé rapidement dans les urines et les fèces (**Pichard**, 2005).

VI.3 Toxicité chez l'homme

Organes cibles : foie, reins, système nerveux central.

VI.3.1 Toxicité aiguë

En cas d'ingestion, le tétrachlorure de carbone entraîne des signes digestifs (nausées, vomissements), accompagnés d'une atteinte neurologique centrale souvent discrète. 24 heures à 48 heures plus tard, apparaissent les atteintes hépatique et rénale. L'atteinte hépatique est une cytolyse qui évolue rarement vers l'insuffisance hépatique, alors que l'atteinte rénale est une tubulopathie qui réalise une insuffisance rénale anurique souvent réversible après 3 à 15 jours. La survenue d'un OAP (Oedum aigu du poumon) est fréquente, dû à la fois à la tubulopathie et à une atteinte directe de la paroi alvéolaire.

En cas d'inhalation, le tétrachlorure de carbone peut induire de discrets troubles de conscience. Une hépatonéphrite peut survenir après un intervalle libre de 1 à 4 jours. A dose massive, des atteintes cardiaques, surrénaliennes, pancréatiques et testiculaires ont été décrites (**figure 17**).

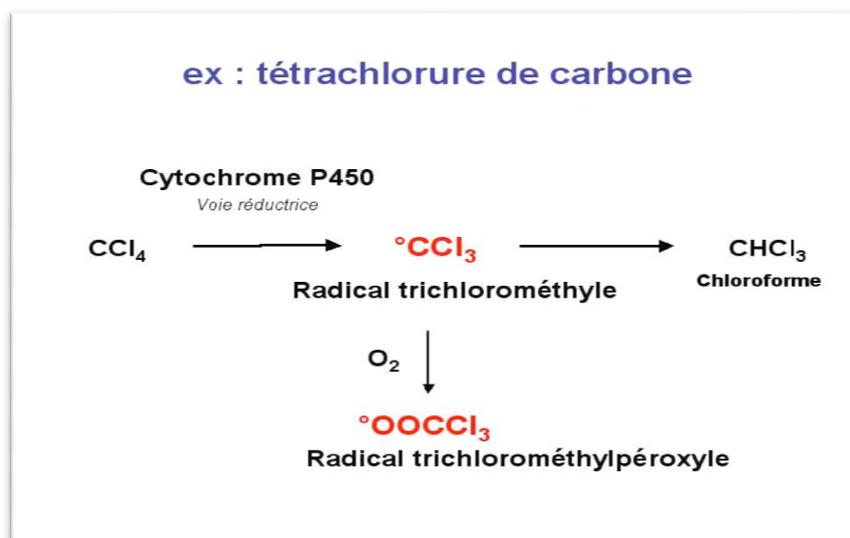


Figure n°17: Devenir toxique du CCl_4 dans l'organisme (Cillard et al., 2006).

VI.3.2 Toxicité chronique

Quelques cas de cirrhoses hépatiques et d'atteintes neurologiques centrales et périphériques ont été décrits. Comme tous les autres solvants chlorés, il est irritant au niveau cutané et de la sphère ORL.

Sur le plan de la cancérogénicité, il est classé dans la catégorie 3 par l'union européenne et 2B par le CIRC (Centre International De Recherche contre le Cancer) (Koller , 2002).

VI.4 Etudes chez l'animal

Chez la souris, la DL₅₀ est estimée à 7 176 ppm (45 998 mg/m³) ou 50 000 mg/m³ (7 800 ppm). **David et al.** (1981) ont montré que lors d'une exposition **par inhalation** pratiquée chez le rat aux concentrations de 50 ppm (320 mg/m³), 6 heures par jour pendant 4 jours, le tétrachlorure de carbone induisait une augmentation significative des activités enzymatiques sériques et des lésions hépatiques de type stéatose.

La DL₅₀ par **voie dermale** est estimée supérieure, 15 g/kg chez le lapin et le cobaye (**Roudabush et al.**, 1965).

Les différentes DL₅₀ par **voie orale** sont regroupées dans le **tableau 06**. Il apparait clairement que la toxicité aiguë du tétrachlorure de carbone est très faible.

Tableau n° 06: DL₅₀ (mg/kg) de quelques espèces utilisées en expérimentation animale

Espèce	DL ₅₀ (mg/kg)	Source
Souris	12100- 14100	Dybing et Dybing , 1946
Rat (femelle)	2821	Smyth et al. , 1970 ; Klaassen et Plaa , 1969
Rat (male)	10054	Kennedy et al. , 1986
Chien	2300	Klaassen et Plaa , 1967

VI.5 Effets cancérogènes

VI.5.1 Etudes principales

a. Etudes chez l'homme

Le risque de survenue de cancer suite à l'exposition au tétrachlorure de carbone a été évalué chez 5 populations professionnelles différentes (**Checkoway et al.**, 1984 ; **Wilcosky et al.**, 1984; **Ott et al.**, 1985 ; **Bond et al.**, 1986 ;**Blair et al.**, 1990 ; **Blair et al.**, 1998).

L'étude de **Ott et al.**,(1985) est une étude de mortalité menée sur 1 919 hommes employés pendant au moins 1 an entre 1940 et 1969 dans l'industrie chimique aux Etats-Unis. Au sein de cette population, 226 employés ont travaillé dans une unité de production de méthanes chlorés (chlorométhane, dichlorométhane, chloroforme et tétrachlorure de carbone), Les niveaux d'exposition ne sont pas rapportés. 42 décès ont été observés chez les 226 employés de l'unité et 9 cancers sont rapportés incluant 3 cancers du pancréas.

b. Etudes chez l'animal

Les auteurs des études expérimentales les plus anciennes ont cherché à mettre en évidence les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone par différentes voies d'exposition, aussi bien chez le rat que chez la souris. Les résultats de ces études montrent que le tétrachlorure de carbone induit chez différentes espèces de souris des tumeurs hépatiques, notamment des carcinomes hépatocellulaires. Chez le rat, différentes tumeurs hépatiques bénignes et malignes sont observées (**IARC**, 1999).

Des souris sont exposées par voie orale au tétrachlorure de carbone administré en solution dans de l'huile d'olive aux doses de 0,16, 0,32, 0,64, 1,28 et 2,5 g/kg de poids corporel . Une augmentation significative des hépatomes est observée chez les souris exposées au moins à la dose de 0,16 g/kg de poids corporel sur une période d'au moins 90 jours. Aucun hépatome n'est observé pour une exposition à la dose de 2,5 g/kg de poids corporel sur une période de 30 jours (**Eschenbrenner et Miller**, 1944).

Dans une autre étude, les souris sont exposées par gavage au tétrachlorure de carbone en solution . 2 à 5 % dans l'huile de maïs 5 fois par semaine aux doses de 1 250 et 2 500 mg/kg pendant 78 semaines. 92 semaines après le début du traitement, la quasi- totalité des souris ont développé un carcinome hépatocellulaire (**NCI**, 1976 ; **Weisburger**, 1977). Dans une étude similaire réalisée avec le même protocole opératoire chez le rat pour des expositions aux doses de 47 et 94 mg/kg de poids corporel chez le mâle et de 80 et 160 mg/kg de poids corporel chez la femelle, une faible augmentation des carcinomes hépatocellulaires est rapportée chez les mâles et les femelles. La présence de nodules hépatiques néoplasiques est observée chez les mâles et les femelles.

CHAPITRE I: MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL VEGETAL

I.1 Récolte des plantes

L'espèce *Artemisia campestris* a été récoltée au mois de Février au sud algérien dans la région de Tamanrasset.

I.2 Conservation

La plante fraîchement récoltée est laissée à sécher à l'air libre au laboratoire à la température ambiante.

II. PREPARATION DES EXTRAITS D'ARMOISE

II.1 Préparation de l'extrait éthanolique

L'extrait éthanolique a été obtenu en se référant à la méthode de Soxhlet qui permet d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité.

a. Principe

L'extraction par l'appareil Soxhlet est une méthode simple et convenable qui permet de répéter le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première d'où son efficacité élevée.

b. Mode opératoire

- L'ensemble feuilles, fleurs et rameaux séchés de l'espèce *Artemisia campestris* ont été broyés et réduits en poudre fine.
- Une prise de 20g de la poudre obtenue est placée dans une cartouche et mise dans le dispositif pour l'extraire avec 400 ml de solvant (éthanol pur) sous réfrigérant à reflux pendant 6 heures (**figure 18**)



Figure n° 18: Dispositif de l'extraction solide liquide.

- L'expérience est répétée jusqu'à ce que le solvant obtenu soit incolore. Après extraction, le solvant riche en substances extraites est récupéré dans un ballon, puis passé à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer le solvant (**figure 19**).



Figure n° 19: Evaporation du solvant (éthanol) à l'évaporateur rotatif.

- L'extrait ainsi obtenu est placé dans un dessiccateur, pesé et conservé à 4-6°C jusqu'à utilisation.

II.2 Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de l'espèce étudiée est obtenu par une macération à chaud en suivant les étapes suivantes (Soro, 2009) :

- 50 g de poudre de matière végétale sèche est infusée dans 500 ml d'eau distillée chauffée à 100 °C.
- Le mélange matière végétale – eau distillée est agité pendant 24 heures par un agitateur magnétique ; la solution obtenue subit deux filtrations successives à l'aide d'un Büchner sur du papier filtre moyen et on obtient le filtrat (**figure 20**).



Figure n° 20: Filtration du macéré aqueux à l'aide d'un Büchner.

- Le filtrat obtenu est lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de type Telstar à une température de (-47°C) à (-48°C) (**figure 21**). Le lyophilisat obtenu est une poudre de couleur verdâtre ; il est conservé à +4 °C dans un flacon hermétiquement fermé jusqu'à utilisation.



Figure n° 21: Lyophilisation de l'extrait aqueux de l'armoise.

- **Le Rendement d'extraction:** exprime le rapport entre le poids du résidu sec de l'extrait aqueux et le poids du produit à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = [\text{masse du résidu extrait} / \text{masse de la prise traitée}] * 100$$

III. ETUDE CHIMIQUE

III.1 Détermination de la teneur en eau

Elle est déterminée par la méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve à 130°C dans des capsules pendant 3h.

Le pourcentage de la matière sèche (MS) est donné par la formule suivante selon la norme **AFNOR (V- 03- 707 ISO 712, 1989)** :

$$MS (\%) = \frac{\text{Poids après dessiccation} - \text{poids de la capsule vide}}{\text{Poids avant dessiccation} - \text{poids de la capsule vide}} \times 100$$

III.2 Détermination du taux de cendres

La teneur en cendres est obtenue par incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle à 550°C jusqu'à combustion complète de la matière organique ; le résidu obtenu est ensuite pesé.

Le pourcentage des cendres est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendre} = \frac{M2 - M0}{M1 - M0} * 100$$

M0 : Masse en gramme de la capsule vide d'incinération ;

M1 : Masse en gramme de la capsule d'incinération chargée de la prise d'essai ;

M2 : Masse en gramme de la capsule d'incinération chargée des cendres.

III.3 Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par **Wolfe et al.**(2003) (**figure 22**)

a. Principe

La méthode fait appel à un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3 PW_{12} O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3 PMo_{12} O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène ($W_8 O_{23}$) (**Ribereau-Gayon et al.**,1976).La coloration bleue obtenue possède une absorption maximale à 760 nm ; cette coloration est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

b. Mode opératoire

Mettre une aliquote (0,25 ml) de l'échantillon à doser dans un tube à essai ;

Ajouter 1,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laisser réagir pendant 3 minutes ;

Ajouter 1 ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5%.

Figure n° 22: Dosage des polyphénols.

Les différentes solutions préparées à partir des différentes dilutions, sont laissées à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est ensuite mesurée à 765 nm au spectrophotomètre.

La manipulation est réalisée en triplicatas pour chaque échantillon.

c. Expression des résultats

Pour interpréter les résultats, une courbe étalon est réalisée en présence d'acide gallique à des concentrations allant de 0 µg /ml à 160 µg/ml, permettant d'obtenir une réponse linéaire en absorbance.

Ainsi, la teneur en polyphénols totaux est déterminée par extrapolation sur la courbe d'étalonnage obtenue. Le contenu phénolique total est exprimé en mg Equivalent d'Acide Gallique par g de matière sèche (mg Eq AG /gMS).

III.4 Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) citée par **Hazzit** et *al.* (2009) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes des extraits.

a. Principe

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans l'éthanol) avec les dilutions appropriées est ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ à (2% dans l'éthanol).

Le mélange est vigoureusement agité et l'absorbance, à 420 nm, est lue après 1heure d'incubation.

b. Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes est faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (0-160 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg Eq Q/mg).

III.5 Evaluation de l'activité antioxydante

Dans cette étude, l'activité antioxydante des extraits végétaux étudiés est évaluée *in vitro* par deux méthodes de référence : le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

Le pouvoir antioxydant de ces extraits est estimé par comparaison à un antioxydant de synthèse, le BHT.

III.5.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

a. Principe

Le DPPH• (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl)(C₁₈H₁₂N₅O₆) est un radical libre stable utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse à des stress internes ou externes. En présence d'un antioxydant, la couleur violette caractéristique du DPPH vire au jaune et l'absorbance mesurée à 517 nm s'abaisse. L'ajout de différentes dilutions des extraits à la solution de DPPH permet de déterminer celle qui diminue le plus l'absorbance.

Les absorbances mesurées servent par la suite à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**figure 23**) (Sintaheyu *et al.*,2012).

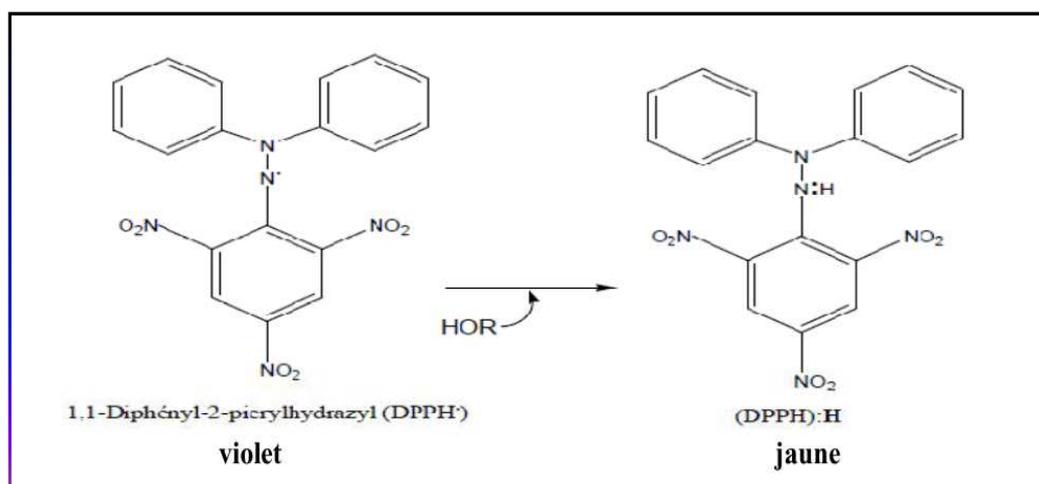


Figure n° 23: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

b. Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Selon le protocole décrit par **Mansouri et al.** (2005), L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré comme suit :(**figure 24**)

25 µl de chaque dilution d'extrait végétal sont mélangés à 975 µl d'une solution éthanolique de DPPH (0.004%) fraîchement préparée.



Après incubation du mélange obtenu pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Figure n° 24: Piégeage du radical DPPH (**Mansouri et al.**, 2005).

L'inhibition du radical libre DPPH par le BHT est également analysée aux mêmes concentrations pour la comparaison.

c. Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon **Sharififar et al.**, (2007), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}} * 100$$

- A_{blanc} : Absorbance de l'essai à blanc.
- $A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du composé d'essai.

La cinétique des réactions des extraits végétaux avec le DPPH est inscrite à chaque concentration examinée. Un graphique des concentrations, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, est tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50% (**Sharififar et al.**, 2007).

III.5.2 Mesure du pouvoir réducteur

a. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu** (1986) (figure 25).

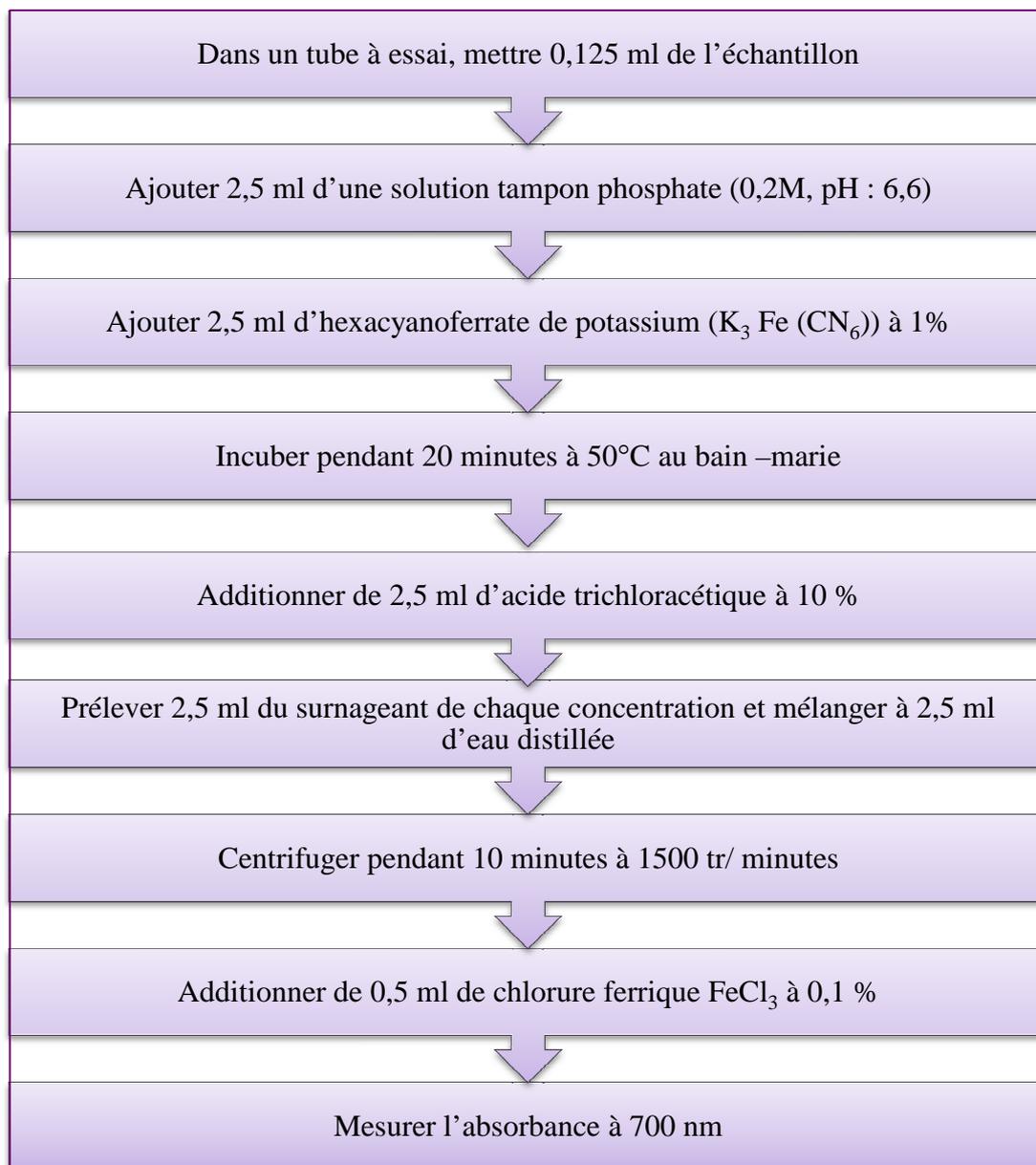


Figure n° 25: Détermination du pouvoir réducteur (**Oyaizu**, 1986).

b. Expression des résultats

Pour exploiter les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

IV. ETUDE TOXICOLOGIQUE

IV.1 Expérimentation animale

L'extrait aqueux de l'armoise rouge (*Artemisia campestris*), utilisé pour l'administration aux animaux, est préparé à raison de 1g d'extrait / kg de poids corporel.

Il est à noter que l'extrait aqueux a été retenu pour éviter toute toxicité qui pourrait provenir de l'éthanol.

IV.2 Echantillonnage

L'étude a été réalisée sur des rats WISTAR, albinos, mâles, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, dont le poids varie entre 150 et 250 g. Les animaux sont répartis en 4 lots (**figure 26**) de 6 rats chacun, ayant libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est à $25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, l'hygrométrie de 60% et une photopériode de 12 H/24H. Les animaux destinés à l'expérimentation ont subi une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie.



Figure n° 26: Répartition des rats en 4 lots

IV.3 Protocole expérimental

- L'expérimentation a porté sur 4 lots de 6 rats chacun.
- Les rats sont répartis dans les lots de façon à avoir une moyenne de poids identique pour chaque lot expérimental.
- Les sacrifices ont lieu tous les 10 jours sur une période s'étalant sur un mois.
- Les lots sont répartis comme suit :
 - **Lot témoin** : 6 rats ont reçu une dose de 1ml de paraffine quotidiennement et par gavage (**figure 27**).
 - **Lot 01** : 6 rats ont reçu une dose de 100 mg d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* /kg de poids corporel dilué dans 1ml de paraffine chaque jour par gavage.
 - **Lot 02** : 6 rats ont reçu une dose de 1ml de paraffine quotidiennement et par gavage. Les rats qui doivent être sacrifiés, isolés 24 h au préalable, reçoivent une dose de 2mg/kg de poids corporel de CCl₄
 - **Lot 03** : 6 rats ont reçu une dose quotidienne de 100 mg d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* /kg de poids corporel dilué dans 1ml de paraffine par gavage. Les rats qui doivent être sacrifiés, isolés 24 h au préalable, reçoivent une dose de 2mg/kg de poids corporel de CCl₄.



Figure n° 27: Gavage quotidien des rats.

La conduite de l'expérimentation est récapitulée dans le **tableau 07**.

Tableau n° 07: Récapitulatif de la conduite de l'expérimentation animale

	Lot témoin	Lot 01	Lot 02	Lot03
Supplémentation	Paraffine	Extrait aqueux	Paraffine + CCl ₄	Extrait aqueux + CCl ₄
1 ^{er} Sacrifice 01(J10)	2/6	2/6	2/6	2/6
2 ^e Sacrifice 02 (J20)	2/4	2/4	2/4	2/4
3 ^e Sacrifice 03 (J30)	2/2	2/2	2/2	2/2

L'expérimentation a durée 30 jours, les sacrifices ont eu lieu tous les 10 jours à raison de 2 rats de chaque lot (**figure 28**). Les rats sont sacrifiés par décapitation, le sang est récolté et mis dans des tubes secs étiquetés et sont centrifugés à 4000trs/min. Le plasma récolté est conservé dans des tubes ependorff jusqu'à analyse.



Figure n° 28: Dissection d'un rat.

Les organes sont prélevés rapidement, pesés, lavés avec une solution de KCl à 9‰ et conservés au congélateur (-20°C) (**figure 29**).



Figure n° 29: Photo des organes étudiés (le cœur, les reins et le foie)

IV.4 Calcul de l'indice hépato-somatique

L'indice hépato somatique est défini comme étant le pourcentage du rapport entre le poids du foie (g) et celui de la souris (g). Il est calculé selon la formule suivante décrite par **Lopez-Varela et.al. (2002)**.

$$\text{IHS} = \text{poids du foie (g)} / \text{poids de l'animal (g)} \times 100$$

IV.5 Calcul de la prise de poids

Les rats sont pesés au début et à la fin de l'expérimentation ; les rats qui doivent être sacrifiés sont pesés avant sacrifice pour calculer la différence de poids entre le début et la fin de l'expérimentation.

IV.6 Dosages des paramètres biologiques: Dosages biochimiques *in vitro*

Certaines enzymes sont libérées normalement dans le sang à partir des cellules cardiaques et hépatiques à de faibles taux. Toutefois, l'augmentation anormale de leur niveau peut être un indicateur fiable de lésions ou d'altérations cardiaques et/ou hépatiques.

IV.6.1 Dosage des transaminases (ASAT, ALAT)

IV.6.1.1 Alanine aminotransférase (L -alanine : 2 -oxoglutarate aminotransférase, EC 2.6.1.2, ALAT)

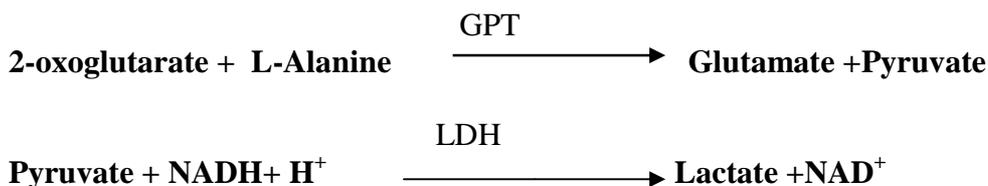
Cette enzyme est souvent déterminée dans les laboratoires cliniques. L'ALAT est principalement localisée dans le foie et avec des quantités moindres dans les reins, les muscles squelettiques et cardiaques. Sa prédominance dans le foie et sa localisation dans le cytoplasme compte pour sa spécificité par rapport au diagnostic des troubles hépatiques.

L'enzyme est normalement présente dans le sérum humain (ou le plasma), sa concentration augmente dans les cas de blessures hépatiques. Lors de la phase symptomatique de courte durée de l'hépatite virale, L'ALAT est la première enzyme dont la concentration augmente dans le plasma. Dans l'hépatite chronique, la concentration sérique de l'ALAT augmente et est corrélée avec la progression de la maladie, la concentration est dans ce cas inférieure à par rapport à une hépatite aiguë. L'ALAT peut être élevée chez les personnes alcooliques les personnes atteintes de cirrhose biliaire primitive et dans les cas de maladies non - hépato-biliaires, par exemple, infection mononucléose et parasitoses. L'ALAT est également très souvent déterminée avec l'Aspartate aminotransférase pour révéler les effets toxiques des médicaments sur le foie dans les essais cliniques et / ou au cours de la thérapie médicamenteuse.

- **Principe**

Le principe du dosage de l'ALAT est basé sur la détermination de la cinétique de l'activité de l'enzyme Alanine amino transférase.

La réaction est initiée par addition de l'échantillon du sérum sanguin au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine transférase dans l'échantillon.

L'analyse a été réalisée suivant les instructions du kit réactionnel GPT-ALAT ; méthode cinétique (IFCC) sans phosphate de pyridoxal, fournies par le laboratoire **Biomaghreb**.

L'absorbance est lue à 340nm et à une température de 25 °C.

Le calcul du taux d'ALAT se fait à 340nm selon l'équation suivante :

$$\Delta DO/\text{min} * 1750 = \text{UI/l}$$

Remarque : 1750 est le facteur de conversion, il est spécifique à chaque kit de dosage d'enzyme.

IV.6.1.2 L'Aspartate aminotransférase (ASAT ou SGOT)

Aspartate aminotransférase (AST), anciennement appelé sérum glutamate-oxaloacétate transaminase (SGOT), l'enzyme est un phosphate de pyridoxal (PLP) dépendant, que catalyse la conversion de l'aspartate et de l' α -cétoglutarate en oxaloacétate et glutamate.

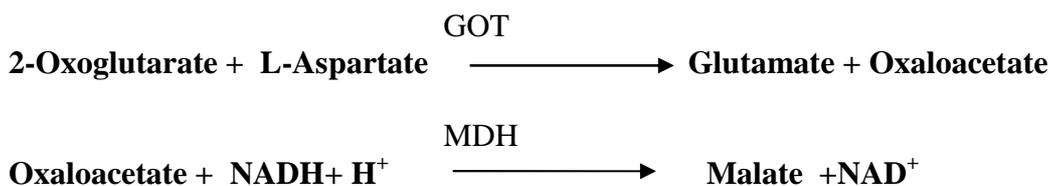
Au même titre que l'Alanine aminotransférase (ALAT), l'ASAT est dans le sang, et est couramment utilisée en tant que marqueur de la fonction hépatique.

Cependant, l'ASAT a une distribution tissulaire plus large que l'ALAT et les perturbations dans les niveaux d'ASAT peuvent se produire comme réponses à des maladies ou à des blessures dans de nombreux tissus y compris squelettiques et cardiaques.

• Principe

Le principe du dosage de l'ASAT est basé sur la détermination de la cinétique de l'activité de l'enzyme Aspartate amino transférase.

La réaction est initiée par addition de l'échantillon du sérum sanguin au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :



Cette enzyme catalyse le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l' α -cétoglutarate pour former une molécule d'oxaloacétate et de glutamate.

En présence de NADH et de malate déshydrogénase (MDH), l'oxaloacétate est réduit en L-malate. Au cours de cette réaction, le NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution de l'absorbance est lue à 340nm et à une température de 25 °C.

L'analyse a été réalisée suivant les instructions du kit réactionnel GOT-ASAT ; méthode cinétique (IFCC) sans phosphate de pyridoxal, fournies par le laboratoire **Biomaghreb**.

Le calcul du taux d'ASAT se fait selon l'équation suivante :

$$\Delta DO/\text{min} * 1750 = \text{UI/l}$$

IV.6.2 La phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline (ou PAL) (EC3.1.3.1) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate pour donner un ion phosphate et un groupement hydroxyle libre. Les phosphatases alcalines ont une spécificité de substrat faible et sont capables de retirer des groupements phosphates de nombreuses molécules, comme des nucléotides, des protéines ou autres. Ce processus est appelé déphosphorylation. Comme son nom l'indique, la phosphatase alcaline a une activité plus importante en milieu alcalin (pH > 7).

La PAL est présente chez de nombreux organismes des bactéries à l'homme, c'est aussi une enzyme fréquemment utilisée dans le domaine de la recherche.

- **Principe**

Le principe d'analyse est basé sur la méthode standardisée du test colorimétrique (**Tietz**, 1983). En présence d'ions Mg^{++} et Zn^{++} , le p-nitrophénylphosphate est scindé par les phosphatases alcalines en phosphate et p-nitrophénol selon la réaction suivante :



La concentration en P-nitrophénol libéré est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 409nm et en utilisant un facteur de conversion.

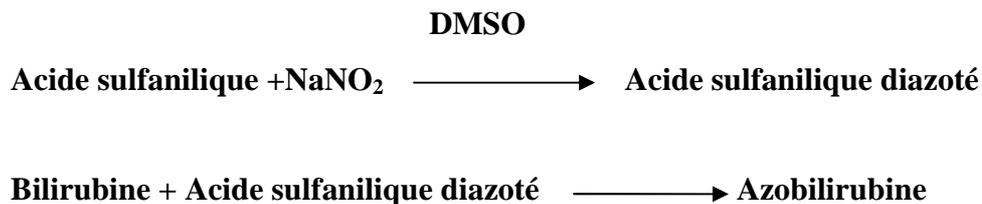
$$\Delta DO/\text{min} * 1750 = \text{UI/l}$$

IV.6.3 Dosage de la bilirubine

La bilirubine est un pigment présent dans la bile et à plus faible concentration dans le sang. On distingue deux fractions de la bilirubine : la bilirubine libre (totale) et la bilirubine directe (conjuguée) c'est-à-dire transformée par le foie, avant d'être éliminée dans les urines.

- **Principe**

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



L'absorbance est lue à 555nm à une température de 37°C.

Le calcul se fait comme suit :

$$\text{B.T ou B.D} = \frac{\text{Abs (A)échantillon}}{\text{Abs (A)étalon}} * (\text{conc.étalon})$$

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

Artemisia campestris est une plante médicinale de la famille des Astéracées (composées), elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter de nombreuses maladies tels que les troubles digestifs, inflammatoires ...etc.

De nombreuses études phytochimiques de cette espèce ont révélé la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins et des huiles essentielles; ce qui confère à cette plante une multitude de propriétés biologiques (Akrouf et al., 2011).

I. RENDEMENT D'EXTRACTION D'*Artemisia Campestris*

La préparation des extraits à partir des feuilles d'*Artemisia campestris* a été effectuée par des solvants à polarité différente, il s'agit de l'alcool éthylique et de l'eau. Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts: l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche. Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents.

Le tableau 8 donne le rendement en extraits éthanolique et aqueux d'*Artemisiacampestris* exprimé en pourcentage (g extrait / 100g matière végétale).

Tableau n° 08: Rendement d'extraction en %.

<i>Artemisia campestris</i>	Rendement (%)
Extrait aqueux	12.08
Extrait éthanolique	14.9

On remarque que le rendement en extrait éthanolique (14.9g/100g de MV) est légèrement supérieur à celui en extrait aqueux (12.08g/100g de MV), ceci est dû au fait que l'éthanol est meilleur extracteur que l'eau pour les composants actifs des plantes car il favorise leur disponibilité et donc leur extraction. Il est à noter que le rendement en extraits peut varier, au sein de la même espèce, en fonction de l'origine, de la période de récolte de la

plante et de la méthode d'extraction et des conditions d'extraction sous lesquelles cette dernière a été effectuée.

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants) ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid) affectent tout le contenu en phénols et en flavonoïdes, et par conséquent influe sur les activités biologiques dues aux métabolites (Lee et al., 2003)(Tableau 9).

Tableau n° 09: Rendement en extrait éthanolique de deux échantillons d'*Artemisia campestris*

Espèces	Provenance	Rendement (%)
<i>Artemisia campestris</i>	Tamanrasset ⁽¹⁾	14.9
<i>Artemisia campestris</i>	M'sila ⁽²⁾	0.49

⁽¹⁾Echantillon étudié, ⁽²⁾ Boudjouref (2011).

D'après le **tableau n°09**, il apparaît que le rendement d'extraction obtenu à partir de l'échantillon étudié est supérieur à celui obtenu à partir de la même espèce en provenance de la région de M'sila ; ceci pourrait être dû aux conditions météorologiques, à la nature du sol ou bien aux conditions et aux méthodes d'extraction.

II. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

II.1 Teneur en eau

Les végétaux sont très riches en eau. Les plantes fraîches en renferment 60 à 80 %. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 %. Le procédé utilisé pour déterminer la teneur en eau des feuilles sèches est la méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve à 130°C. Le **tableau n°10** représente la teneur en eau retrouvée au niveau des feuilles séchées de l'armoise.

Tableau n° 10:Teneur en eau de l'armoise rouge.

Plante	Teneur en eau
<i>Artemisia campestris</i>	10.05

Le taux d'humidité est estimé à 10%, ce qui signifie que la plante peut être conservée dans cet état pour une utilisation ultérieure.

II.2 Teneur en cendres

La teneur en cendres d'*Artemisia campestris* est donnée dans le **tableau n° 11**.

Tableau n° 11:Teneur en cendres de l'armoise rouge.

Plante	Teneur en cendre %
<i>Artemisia campestris</i>	5.12

La teneur en cendres d'*Artemisia campestris* est estimée à **5.12%**. Dans le même contexte, **Bekkouche** et **Benachour** (2012) ont déterminé la teneur en cendres de l'espèce *Myrtus nivelli* appartenant à la famille des Myrtacées récoltée également dans la région de Tamanrasset, où elles ont enregistré une teneur de **6.6 %**. Donc, la teneur en cendres varie d'une espèce à une autre, cette différence de teneur est due à la composition minérale de la plante.

Les travaux d'**Akrout** et *al.* (2011), réalisés sur l'espèce *Artemisia campestris* originaire de Tunisie, ont noté une prédominance du sodium : **80.5 ± 6.0 mg/l** et du potassium : **416 ± 22 mg/l** dans la composition minérale de la plante.

Les connaissances concernant la composition minérale des espèces des zones arides restent « fragmentaires », la différence pourrait être due aux conditions de croissance, aux facteurs génétiques, aux variations géographiques et aux méthodes d'analyse (**Akrout** et *al.*, 2011).

II.3 Teneur en phénols totaux

La teneur en composés phénoliques des extraits éthanolique et aqueux *d'Artemisia campestris* a été déterminée par extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure n° 30**). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

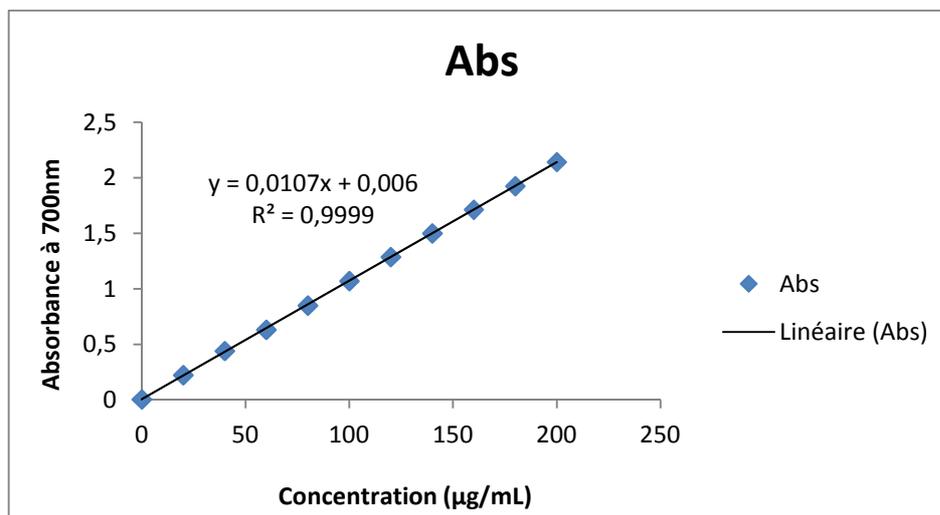


Figure n° 30: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La quantité des composés phénoliques des extraits des plantes étudiées dépend essentiellement: de leur origine, de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant et du matériel végétal (Ebrahimzadeh et al., 2008).

D'après la **figure n°31**, il apparait clairement que la teneur en polyphénols est nettement plus importante dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait aqueux et ceci est dû au fait que l'éthanol est meilleur extracteur des composés phénolique que l'eau.

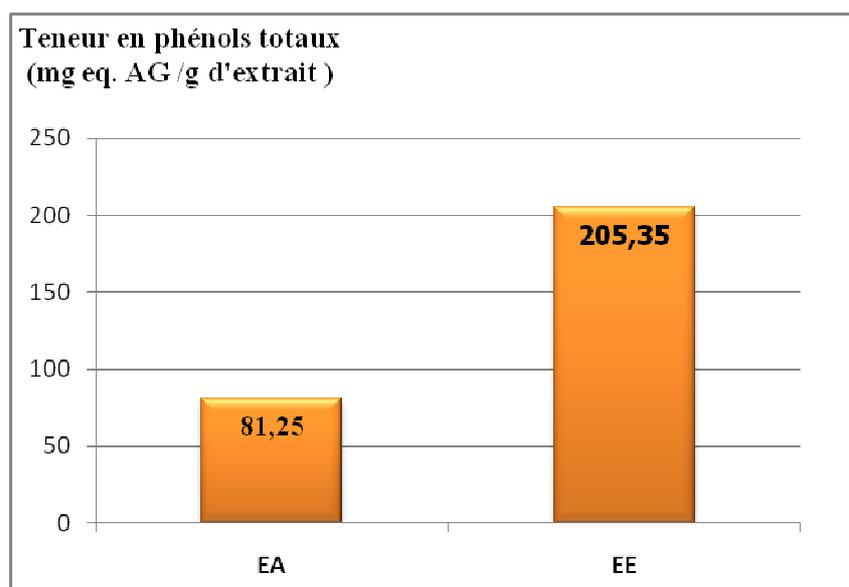


Figure n° 31: Teneur en phénols totaux des extraits aqueux et éthanologique d'*Artemisia campestris*.

Les tableaux **12 et 13** résument les teneurs en phénols totaux des extraits aqueux, éthanologique et méthanolique de quelques travaux effectués sur les espèces appartenant au genre *Artemisia* originaires de pays différents.

Tableau n° 12: Teneur en phénols totaux de l'extrait aqueux de quelques espèces d'armoise.

Extrait aqueux	Teneur en phénols totaux (mg Eq.AG/g d'extract)
<i>Artemisia campestris</i> ⁽¹⁾	81.25
<i>Artemisia campestris</i> ⁽²⁾	306.7
<i>Artemisia absinthium L.</i> ⁽³⁾	6.15

⁽¹⁾ Echantillon étudié ; ⁽²⁾ Tunisie : **Akrou** et *al.*(2011) , ⁽³⁾Chine : **Amat** et *al.*(2010).

Tableau n° 13: Teneur en phénols totaux de l'extrait éthanolique et méthanolique de quelques espèces d'armoise.

Extrait éthanolique	Teneur en phénols totaux (mg eq.AG*/g d'extrait)
<i>Artemisia campestris</i> ⁽¹⁾	205.35
<i>Artemisia absinthium L.</i> ⁽²⁾	278.5
<i>Artemisia annua L.</i> ⁽³⁾	384.1
<i>Artemisia campestris</i> ⁽⁴⁾	201.4
<i>Artemisia persica</i> ⁽⁵⁾	407
<i>Artemisia arborescens</i> ⁽⁶⁾	100.8
<i>Artemisia herba-alba</i> ⁽⁷⁾	123.95

* mg Eq.AG : milligramme equivalent acide gallique.

⁽¹⁾Echantillon étudié

⁽²⁾Tunisie : **Riahi** et al.(2013)

⁽³⁾ Brésil : **Gouveia** et al. (2013)

⁽⁴⁾⁽⁶⁾ Turquie : **Bayakan Erel** et al.(2010)

⁽⁵⁾ Pakistan : **Rashidi** et al.(2010)

⁽⁷⁾Tunisie : **Khelifi** et al.(2013)

On remarque que la teneur en phénols totaux varie d'une espèce à une autre au sein du même genre, et au sein de l'espèce elle-même. Ceci s'explique par la nature du solvant utilisé où on note une différence entre l'extraction par l'alcool éthylique (échantillon étudié, *Artemisia herba-helba*, *Artemisia campestris* et *Artemisia arborescens*) et l'extraction par l'alcool méthylique (*Arthemisia absinthium*, *Artemisia annua L.*, *Artemisia persica*).

Par ailleurs, la teneur en phénols totaux varie aussi selon l'origine de la plante ; la plante qui est exposée à un bon ensoleillement affiche une bonne concentration en polyphénols. Ceci revient au fait que des métabolites, tel que l'Artemesinine, sont synthétisés durant la phase de la photosynthèse (**Paul et Shakya**. 2013).

II.4 Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits de plantes étudiées est déterminée par la méthode colorimétrique en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue par la quercétine (mg équivalent quercétine/g d'extrait) représentée par la **figure n° 32**.

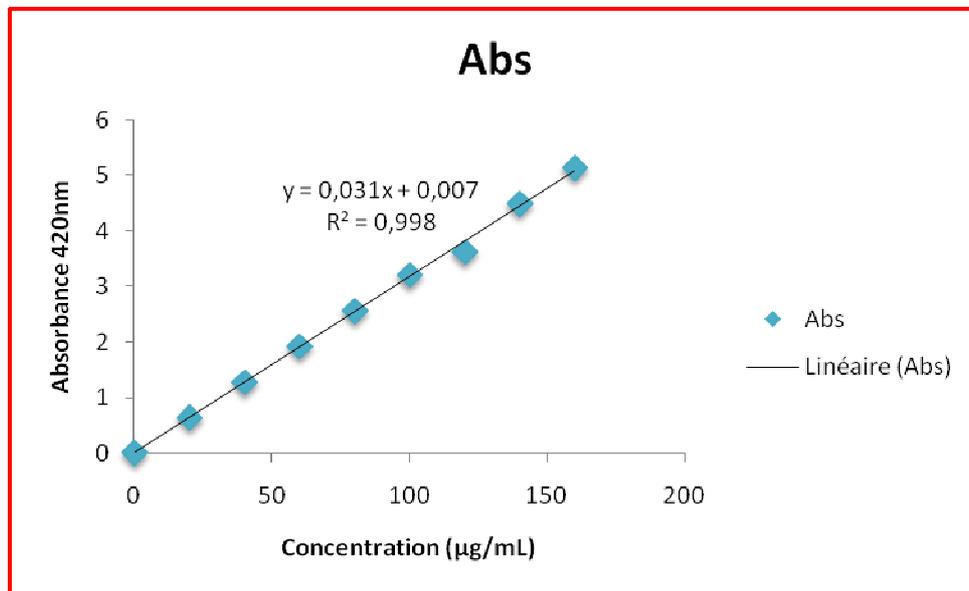


Figure n° 32: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La **figure n°33** et les tableaux **n°14** et **15** et illustrent les différentes teneurs de flavonoïdes de quelques espèces d'*Artemisia*.

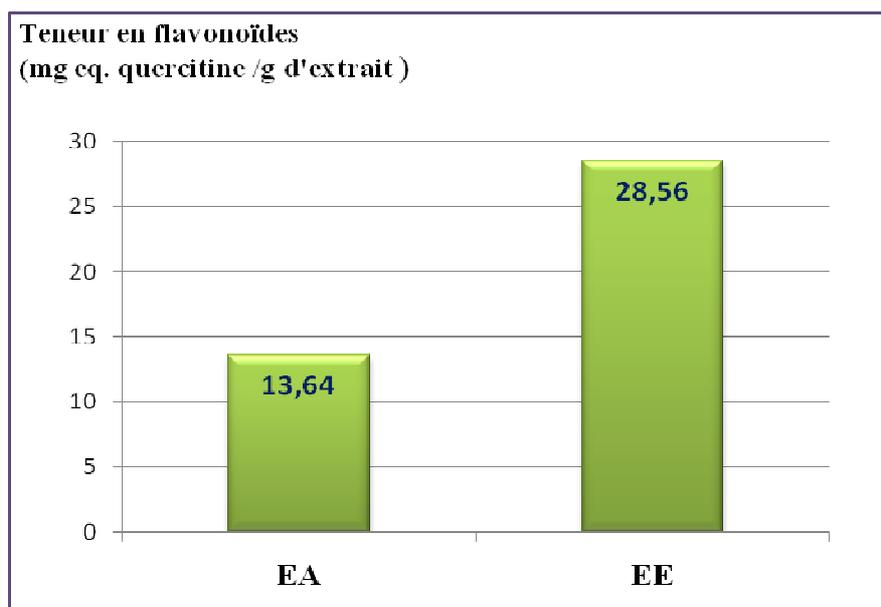


Figure n° 33: Teneur en flavonoïdes des extraits aqueux et éthanolique d'*Artemisia campestris*.

Tableau n° 14: Teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux de quelques espèces d'*Artemisia campestris*.

Extrait aqueux	Teneur en flavonoïdes (mg eq. quercétine /g d'extrait)
<i>Artemisia campestris</i> ⁽¹⁾	13.64
<i>Artemisia absinthium L.</i> ⁽²⁾	0.16

⁽¹⁾ Echantillon étudié,

⁽²⁾ Chine : **Amat** et al. (2010).

Tableau n° 15: Teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de quelques espèces d'armoise.

Extrait éthanolique	Teneur en phénols totaux (mg eq. quercétine /g d'extrait)
<i>Artemisia campestris</i> ⁽¹⁾	28.56
<i>Artemisia absinthium L.</i> ⁽²⁾	16.4
<i>Artemisia campestris</i> ⁽³⁾	93.86
<i>Artemisia arborescens</i> ⁽⁴⁾	71.41

⁽¹⁾ Echantillon étudié

⁽²⁾ Tunisie : **Riahi** et al. (2013)

⁽³⁾ ⁽⁴⁾ Turquie : **Bayakan Erel** et al. (2010).

La teneur en flavonoïdes varie en fonction de l'extrait étudié et de la partie de la plante considérée.

Les flavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques synthétisés par la plante avec des propriétés connues, incluant l'inhibition des radicaux libres, des enzymes hydrolytiques et oxydatives, des actions anti inflammatoires, réduction de la lipémie et de la glucosémie et augmentant l'immunité.

Ces composés interrompent la propagation de la chaîne de l'autoxydation en contribuant avec un atome hydrogène des groupements hydroxyles des polyphénols ; avec la formation de

radicaux libres relativement stables qui ne vont ni contribuer ni initier d'autres processus d'oxydation (Riahi et al.,2013).

De leur côté, **Khlifi** et al. (2013) rapportent que la composition en phénols totaux et en flavonoïdes des espèces appartenant à la famille des Astéracées est plus élevée que celle des autres familles.

III. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS D'*Artemisia Campestris*.

III.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits éthanolique et aqueux d'*Artemisia campestris* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires **Majhenic** et al.,(2007).

La figure 34 illustre la capacité antioxydante des deux extraits étudiés contre le radical DPPH comparés à celle d'un antioxydant de synthèse, le BHT.

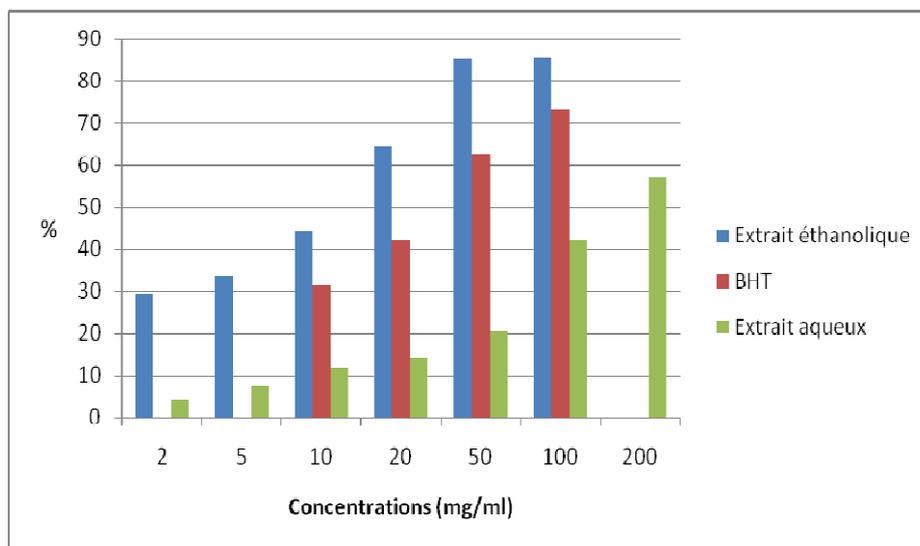


Figure n° 34:Activité de piégeage du radical libre DPPH des extraits d'*Artemisia campestris* comparée à celle du BHT.

D'après cette figure, l'extrait éthanolique possède une activité de piégeage du radical DPPH plus importante que celle de l'antioxydant de synthèse le BHT, alors que l'extrait aqueux a enregistré l'activité la plus faible par rapport aux deux autres.

Dans la **figure 35**, il apparait que l'extrait aqueux avec **191.68 mg/l** et le BHT avec **27.8 mg/l** possèdent les concentrations inhibitrices de 50% du radical libre DPPH les plus faibles par rapport à celle de l'extrait éthanolique.

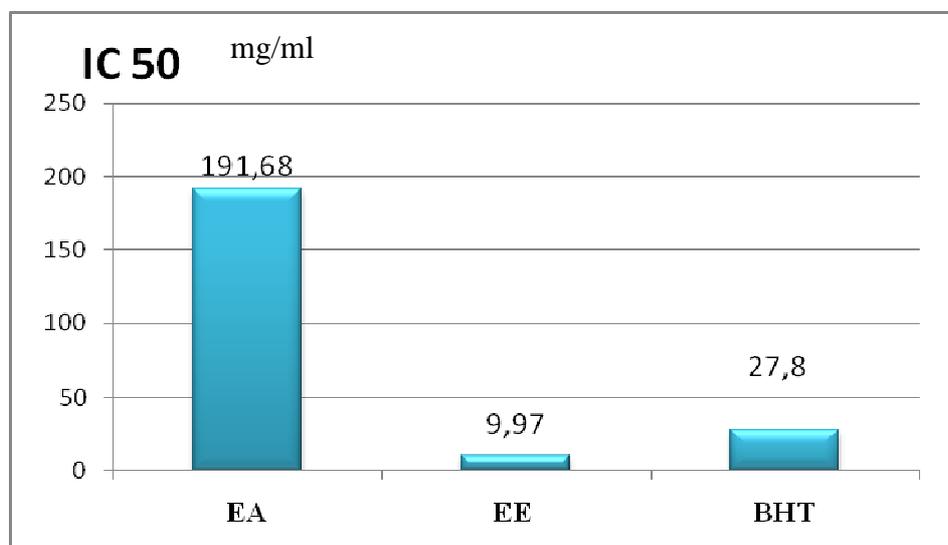


Figure n° 35: Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres de l'extrait éthanolique, de l'extrait aqueux de l'armoise rouge et du BHT.

La valeur de l'IC50 est négativement liée à l'activité antioxydante, une valeur de l'IC50 basse indique une activité antioxydante élevée de l'échantillon testé (Akrouf et al., 2011).

On peut dire que l'extrait éthanolique possède un meilleur pouvoir antioxydant que l'extrait aqueux.

Le radical DPPH est stable et libre, il est communément utilisé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes. Les antioxydants peuvent réduire le radical DPPH en lui conférant un hydrogène ce qui réduit l'absorption du DPPH à 517nm. La concentration de l'échantillon à laquelle le pourcentage d'inhibition est à 50%, ce pourcentage est défini comme l'IC50.

Dans son travail sur la composition, l'activité antioxydante et anti inflammatoire d'*Artemisia herba-alba*, **Khelifi** et al. (2013) a enregistré une valeur de l'IC50, sur l'extrait éthanolique, de **20.64mg/l** qui est supérieure à celle de l'échantillon étudié, soit **9.97mg/l**.

Il a été signalé que l'activité antiradicalaire est fortement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (**Chung et al.**, 2002). Cependant, des études approfondies doivent être performées pour isoler et identifier les différents composés actifs des extraits de plantes (**Bayakan Erel et al.**, 2010).

La composition en polyphénols est associée à l'activité antioxydante de la plante et des extraits, ce qui est dû à leur pouvoir réducteur, les autorisant à agir comme des agents réducteurs donneurs d'hydrogène, d'oxygène singulet et de radical hydroxyl, désactivateurs et chélateurs de métaux (**Kim et al.**, 2003 ; **Akrout et al.**, 2011 ; **Yang et al.**, 2013).

Par ailleurs, **Suhartono et al.** (2012), **Riahi et al.** (2013) affirment qu'une teneur élevée en phénols totaux et en flavonoïdes des espèces contribue à une activité antioxydante et antiradicalaire ; ces auteurs ont enregistré une corrélation significative entre la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits et l'activité antioxydante estimée par le radical DPPH.

III.2 Mesure du pouvoir réducteur

La figure n°36 illustre le pouvoir réducteur des extraits éthanolique et aqueux d'*Artemisia campestris* comparé à un antioxydant de référence qui est le Butyl HydroxyToluène (BHT).

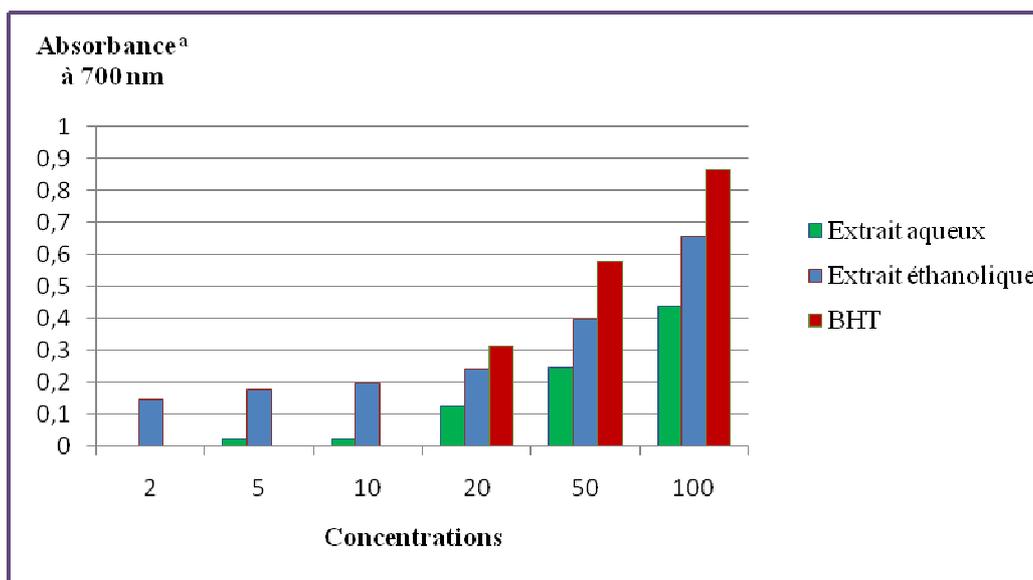


Figure n° 36: Pouvoir réducteur des différents extraits d'*Artemisia campestris* et du BHT

On remarque que le pouvoir réducteur du BHT est inexistant pour les concentrations comprises entre de 2 µg/ml et 10 µg/ml, celui de l'extrait aqueux est également quasi inexistant tandis que celui de l'extrait éthanologique est déjà déterminé à la concentration de 2 µg/ml. Cependant, à partir de la concentration de 20 µg/ml, on remarque que le BHT possède le pouvoir antioxydant le plus élevé par rapport aux extraits.

La figure 36 montre clairement qu'à partir de la concentration de 50 µg/ml, la capacité réductrice du BHT dépasse légèrement celle de l'extrait éthanologique et de loin celle de l'extrait aqueux.

Selon **Amarowics** et *al.*(2004), le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ permet la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols qui participent à la réaction d'oxydoréduction ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$).

On observe une corrélation entre la capacité réductrice des extraits avec leurs teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux.

Le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et des inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju** et **Becker**, 2007).

Cependant, **Gonçalves et al.** (2013), dans l'étude de la relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des infusions de plantes médicinales méditerranéennes, indiquent que tous les extraits aqueux des différentes plantes étudiées se comportent comme des donneurs d'électrons avec une activité croissante de manière dose-dépendante. Les extraits aqueux les plus puissants sont ceux de *Pistacia lentiscus* suivis par *Citrus albidus*, *Lavanda viridis* et *Myrtus communis*.

IV. EXPERIMENTATION ANIMALE

IV.1 Dosages des paramètres biologiques.

L'étude expérimentale a été réalisée sur des rats mâles de la souche WISTAR, albinos, dont le poids varie entre 150 et 250 g. les animaux sont répartis de façon aléatoire, en début d'expérimentation, en 4 lots de 6 rats chacun, on a procédé à une prise de poids au début de l'expérimentation et avant chaque sacrifice.

Le poids initial, le poids final et la prise de poids des rats des quatre lots expérimentaux sont rapportés par le tableau 16.

Tableau n° 16: Moyennes du gain de poids des rats.

Lots	Poids initial (g)	Poids final (g)	Gain de poids	% Gain
Lot témoin	207,46	233,62	0.14	14
Lot 01	224.50	236.27	0.098	9.89
Lot 02	202.20	234.87	0.1134	11.34
Lot 03	229,75	250,90	0.11	11

Au début de l'expérimentation, les rats avaient un poids qui varie entre **150** et **250** gr. Le poids moyen des rats pour chaque lot est : **207.46 g** pour le lot témoin, **224.50g** pour le lot 1, **202.20g** pour le lot 02 et **229.75g** pour le lot 03. A cet âge, les rats ont subi une croissance considérable. Notons qu'on a enregistré un pourcentage de gain de poids qui est relativement identique pour chaque lot.

Après chaque sacrifice, on a prélevé les organes des rats, lavé avec une solution de KCl et pesés, afin de déterminer L'indice hépatosomatique qui renseigne sur une éventuelle toxicité. La moyenne des résultats obtenus est résumée dans le **tableau 17**.

Tableau n° 17: Moyenne des poids des organes des rats.

Lots	Poids foie (g)	Poids reins(g)	Poids cœur(g)	IHS
Lot témoin	8,53	1,76	0,74	3.54
Lot 01	8.69	1.60	0.80	3.21
Lot 02	10.46	2.13	0.84	4.47
Lot 03	9.96	1.79	0.90	3.74

L'indice - hépato somatique (IHS) est calculé sur la base du poids du foie. Les indices hépato-somatiques du lot témoin et du lot 1 diffèrent de ceux des lot 02 et 03 ; ceci s'explique par le fait que les deux premiers lots n'ont pas reçu la dose de 2ml/ kg de poids corporel de CCl₄, tandis que les lots 2 et 03 ont reçu la dose de CCl₄ avant le sacrifice.

La dose de CCl₄ administrée serait responsable de cette différence d'IHS. En effet, en réponse à cette attaque les hépatocytes augmentent de taille en s'enrichissant de vacuoles (**Sanchez-Muniz et al.**, 1998 ; **Bitam**,2005)comme suit :

La distribution du tétrachlorure de carbone dépend de la voie d'administration, de sa concentration et de la durée de l'exposition. A cause de sa solubilité et de sa lipophilicité, il s'accumule dans les tissus riches en graisse comme les adipocytes et le foie. Lors de l'administration du tétrachlorure de carbone, ce dernier subit une métabolisation et une bioactivation, le radical trichlorométhyl initie alors la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique provoque des altérations importantes au niveau des membranes cellulaires modifiant ainsi le métabolisme normal des hépatocytes ; ce qui crée un déséquilibre entre les triglycérides synthétisés par les hépatocytes et leur évacuation dans le sang. Cette dernière se fait sous forme de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) qui sont une association de triglycérides et de protéines transporteuses. On observera alors une accumulation des triglycérides dans les vacuoles hépatocytaires qui augmentent alors de taille (**Yefsah-Idres**, 2007). Cette peroxydation lipidique peut être diminuée en ajoutant une quantité nécessaire d'antioxydants (**Rashid et al.**,2010).

IV.2 Dosage des activités enzymatiques des transaminases dans le sérum sanguin des rats

Les activités enzymatiques de l'Aspartate aminotransférase mesurées au niveau des sérums sanguins des quatre lots expérimentaux sont illustrées dans la **figure 37**.

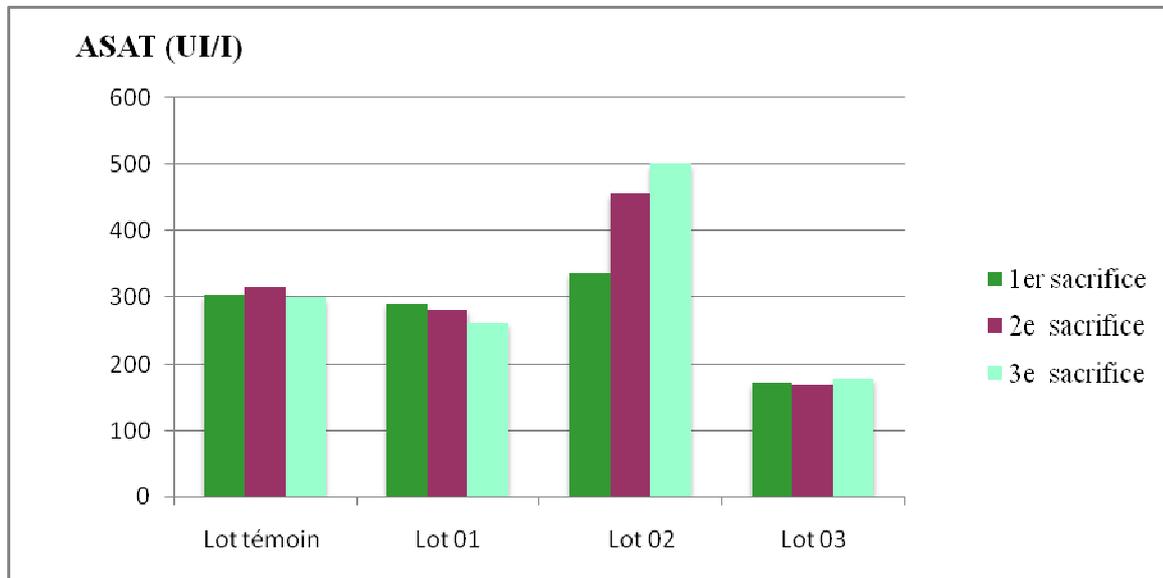


Figure n° 37: Dosage de l'Aspartate Aminotransférase sérique.

A partir de la figure ci-dessus, on remarque que les sérums sanguins du lot 02 sont ceux qui ont enregistré l'élévation la plus importante de l'ASAT (UI/l) ; rappelons que le lot 02 correspond aux rats ayant reçu une dose de paraffine pendant 10 jours et une dose orale de 2ml/kg de poids corporel de CCl_4 , 24H avant sacrifice. Les concentrations en ASAT varient entre **335.88** et **501** UI/l et s'illustrent, ainsi, comme les concentrations les plus importantes de l'essai. En seconde position, on retrouve les sérums du lot témoin qui ont reçu une dose quotidienne de paraffine, ils ont enregistré des concentrations allant de **299.01** à **314.58** UI/l. En 3ème position arrivent les sérums du lot 01 qui a reçu un traitement exclusif à base d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* pendant toute la durée de l'expérimentation, avec des concentrations en ASAT variant de **262.16** à **290.72** UI/l. Et en dernière position arrivent ceux du lot 03 qui ont reçu une dose orale et quotidienne d'1ml d'EA et une dose orale de 2ml/kg de poids corporel de CCl_4 avant sacrifice avec des concentrations de **168.5** à **179.34** UI/l soit deux à trois fois moins importantes que celles enregistrées pour le lot 02.

Les activités enzymatiques de l'ALAT mesurées au niveau du sérum sanguin des rats sont reportées dans la **figure 38**.

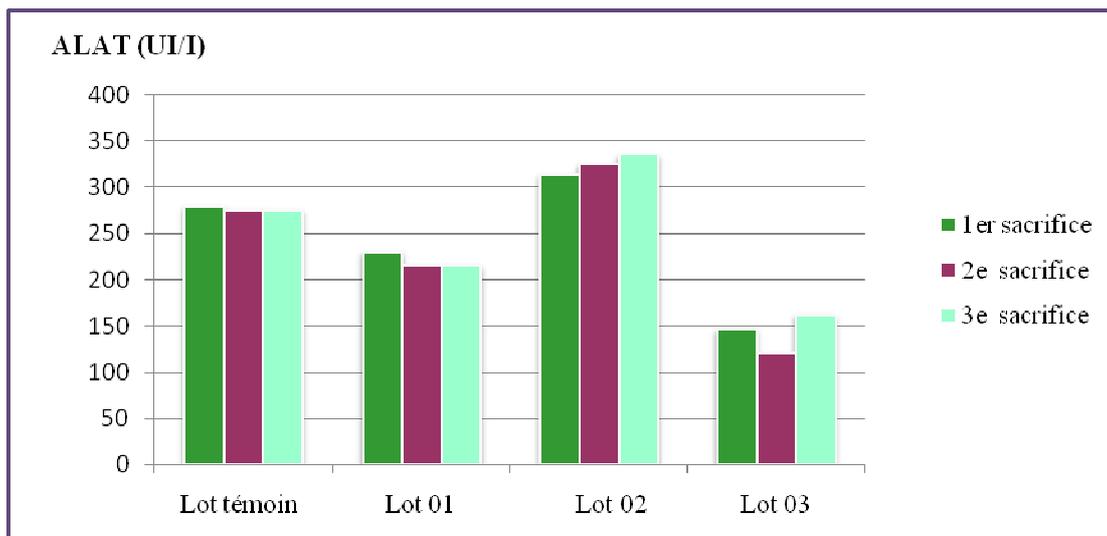


Figure n° 38: Dosage de l'Alanine Aminotransférase dans le sérum sanguin des rats.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que les taux de l'ALAT sont plus importants chez les rats du lot 02 comparés à ceux du lot 03. Les valeurs de l'ALAT, des premiers, varient, pour les trois sacrifices, de **314.57** à **335.88** UI/l soit 3 fois plus élevées que celles des secondes, qui varient de **120.35** à **162.45** UI/l. Les résultats des transaminases obtenus concordent avec ceux enregistrés par **Janbaz et Gilani** (1995) pour l'extrait aqueux d'*Artemisia maritima*, **Sreelatha et al.** (2009) pour l'extrait aqueux du *Coriandrum sativum* et **Ashoush et al.** (2013) pour l'écorce de grenadines. L'élévation du taux sérique de l'ASAT et de l'ALAT a été attribuée aux dommages structuraux du foie. Ces enzymes étant classées comme des enzymes intracellulaires sont relâchées dans la circulation à cause des dommages hépatocytaires ou des nécroses subis (**Domitrovic et al.**, 2009).

Le rapport ASAT/ALAT (**figure n°39**) est utile pour déterminer les causes des dommages hépatiques, on distingue trois possibilités :

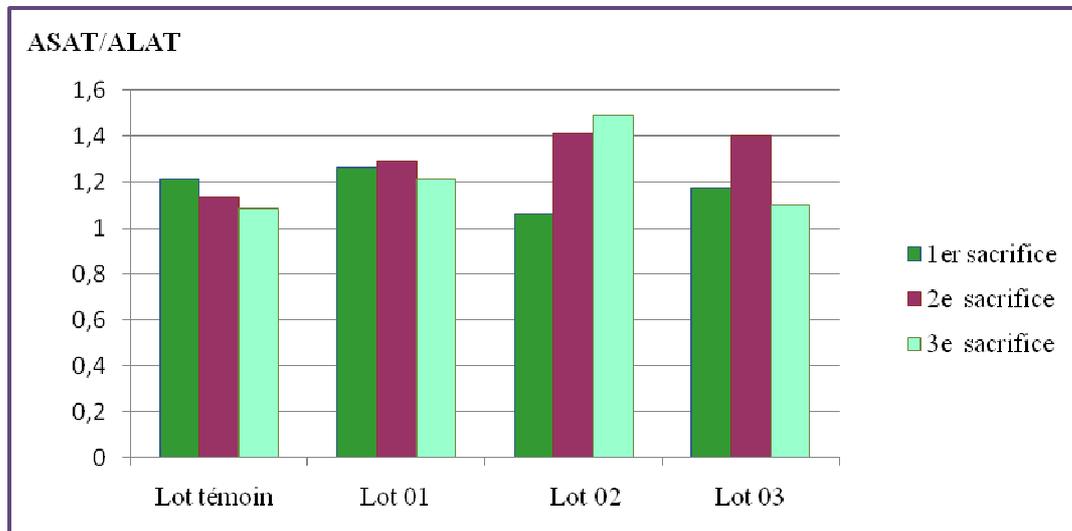


Figure n° 39:Le rapport ASAT/ALAT des sérums sanguins des rats.

ASAT/ALAT > 2 : Carcinome hépatocellulaire ;

1 < ASAT/ALAT < 2 : Cirrhose ;

ASAT/ALAT < 1 : hépatite virale.

Le rapport ASAT/ALAT pour les 4 lots étudiés est compris entre 1 et 2, donc dans le cas de cette étude, on peut dire qu'il s'agit d'une cirrhose. Cependant, aucun symptôme de cirrhose n'a été observé à l'œil nu au niveau des différents foies prélevés.

Lors de ce travail, nous avons évalué l'effet de l'extrait aqueux contre une attaque du foie par un agent chimique.

D'après la littérature, le foie apparait comme étant, grâce à sa fonction métabolique unique, la cible privilégiée des agents toxiques.

Dans la présente étude, la teneur en transaminases dans le sérum sanguin des rats intoxiqués par le CCl₄ (lot 02) et n'ayant pas reçu la dose préventive de l'extrait aqueux *d'Artemisia campestris* est plus élevée que celle des rats ayant reçu de la paraffine et l'extrait aqueux *d'A campestris* (lot témoin et lot 01) d'une part, et à celle du lot 03 ayant reçu une

dose préventive pendant 10 jours avant sacrifice d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*, d'autre part. Par ce fait, et pour le lot 3, on peut suggérer que l'extrait aqueux d'*A. campestris* exerce son activité antioxydante / inhibitrice de radicaux libres en prévenant la formation des radicaux libres carbonatés (CO°) ayant comme originele métabolisme du CCl_4 .

D'un autre côté, la teneur en transaminases du lot témoin, ayant reçu des doses quotidiennes d'huile de paraffine, est légèrement supérieure à celle du lot 01 ayant reçu une dose quotidienne d'extrait aqueux d'*Artemisia campestris*. Ce fait pourrait être dû à l'huile de paraffine elle-même qui est constituée de molécules d'hydrocarbures pouvant contenir un nombre important d'atomes de carbone.

S'il est vrai que l'huile de paraffine n'a aucune action irritante, n'apporte aucune calorie et constitue un lubrifiant facilitant le transit intestinal, son utilisation est discutable car on ignore précisément comment l'organisme en gère l'élimination. Pire, au niveau de la muqueuse intestinale, l'huile de paraffine se dépose sous la forme d'un film qui en perturbe la perméabilité. Un grand nombre de nutriments ne peuvent alors plus être véhiculés correctement par le sang jusqu'aux cellules ; l'assimilation de nutriments est fortement diminuée.

L'ingestion d'huile de paraffine en trop grande quantité peut donc entraîner une dévitalisation et une malnutrition... sans compter que la recherche médicale en étudie encore le risque cancérigène.

IV.3 Dosage des activités enzymatiques de la phosphatase alcaline

Les valeurs de la phosphatase alcaline varient de **139.82 UI/l** pour le lot 03 ayant reçu la dose préventive de l'extrait aqueux de l'armoise à **500.12 UI/l** pour le lot 02 et de **199 UI/l** pour le lot 01 à **216.12 UI/l** pour le lot témoin (**figure n° 40**).

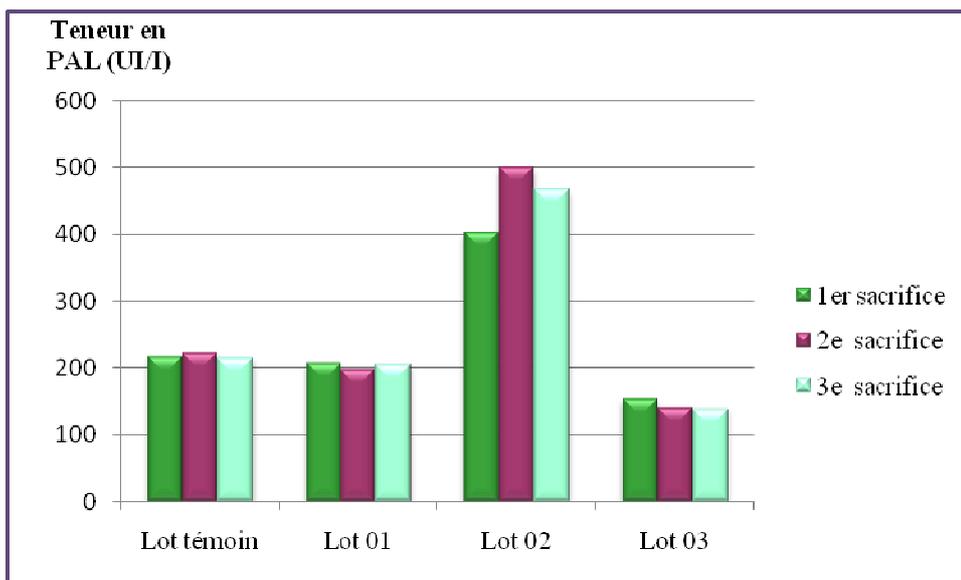


Figure n° 40: Dosage de la Phosphatase alcaline dans le sérum sanguin des rats.

La phosphatase alcaline, qui est un marqueur de la toxicité, exprime une éventuelle défaillance biliaire. Comme l'ampleur de la toxicité par le CCl_4 est en relation avec la dose ingérée, il semblerait que 2ml/kg de poids corporel n'est pas très toxique pour que cette enzyme en soit affectée (**Brensilver** et **Kaplan** .1975).

La PAL est retrouvée principalement dans le foie, les leucocytes, les reins, l'os et le placenta.

La PAL dosée au niveau du sérum augmente dans une certaine mesure dans la plupart des dommages hépatiques (**Aruna** et *al.*, 2002). Les acides biliaires expliquent cette augmentation car ils induisent la synthèse de la PAL en exerçant un effet détersif sur la membrane canaliculaire permettant la fuite de la PAL dans le sérum.

IV.4 Dosage des activités enzymatiques de la bilirubine totale et directe

Les concentrations en bilirubine mesurées au niveau des sérums sanguins des lots expérimentaux sont illustrées dans les figures 41 et 42.

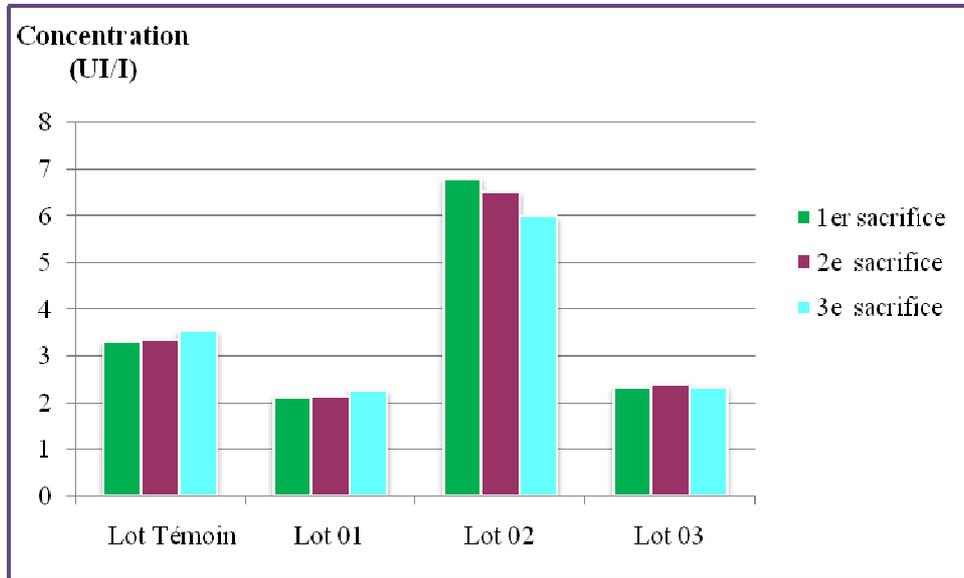


Figure n°41: Dosage de la bilirubine directe dans le sérum sanguin des rats.

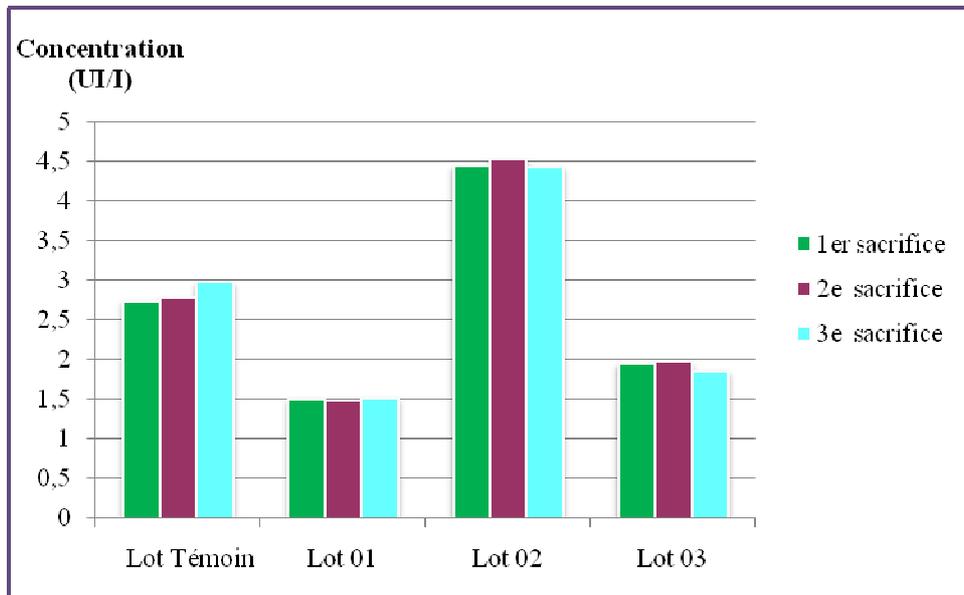


Figure n° 42: Dosage de la bilirubine totale dans le sérum sanguin des rats.

Les valeurs de la bilirubine totale varient de **1.49** UI/l pour le lot 01 traité par l'extrait aqueux d'*A. campestris* à **4.53** UI/l pour le lot 02 qui a reçu une dose quotidienne de 1ml de paraffine et une dose orale de 2ml/kg de poids corporel de CCl₄, 24h avant sacrifice, soit une dose 4 fois plus importante que la précédente. Quant à la bilirubine directe, les concentrations sont plus élevées que celles de la bilirubine totale et varient de **2.13** pour le lot 01 à **6.81UI/l** pour le lot02.

On remarque que la bilirubine directe est plus élevée que la bilirubine totale. De plus, la bilirubine est conjuguée, normalement, par les hépatocyte, mais dans le cas de cette étude, on note, a priori, qu'il ya obstacle à son excrétion biliaire sous forme de glucuronide.

Cette accumulation de bilirubine directe peut être considérée comme le signe d'un désordre hépatobiliaire que l'on peut expliquer par l'altération des mécanismes de biotransformation résultant des métabolites produits par le CCl₄ ou par une hémolyse.

Le degré d'augmentation de la bilirubine totale et de la bilirubine directe représente un indicateur peu sensible de la maladie hépatique mais il donne une idée du fonctionnement global du foie (**Yefsah-Idres**, 2007 ; **Han et al.**, 2013).

Dans le foie, le CCl₄ forme le trichloromethy-peroxy, un radical libre hautement réactif qui joue un rôle important dans les pathologies et la progression des maladies du foie : les antioxydants naturels ont été proposés comme des agents thérapeutiques prévenant le stress oxydant lié aux pathologies hépatiques.

Tous les radicaux libres peuvent se lier aux molécules cellulaires (ex : acide nucléique, protéines, lipides et carbohydrates) induisant ainsi des dommages au niveau de la membrane du foie, des cellules et des organites causant des nécroses des hépatocytes ; ce qui amène à une libération des enzymes cytosolique telles que : l'ASAT, l'ALAT et la PAL dans la circulation sanguine.

En conclusion , les résultats de cette étude montrent que l'administration du CCl₄ cause de sévères dommages hépatiques chez les rats, démontrés par une remarquable élévation du taux sérique de l'ASAT, L'ALAT, la PAL et la bilirubine chez les rats intoxiqués par le CCl₄ comparés à ceux ayant été intoxiqués mais qui ont reçu, au préalable, une dose quotidienne de l'extrait aqueux d'*A.campestris*. Les antioxydants naturels n'agissent pas seulement comme des donateurs d'hydrogène, ils exercent également un effet modulateur dans la cellule.

CONCLUSION

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir : médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. Ce regain d'intérêt vient, d'une part, du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part, les effets secondaires induits par les médicaments qui inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, il a porté sur une plante du Sahara algérien appartenant à la famille des Astéracées : *Artemisia campestris*.

L'objectif principal de cette étude était d'extraire, de caractériser les composés actifs de la plante et d'en étudier le pouvoir antioxydant *in vitro*, d'une part, et rechercher un éventuel potentiel protecteur de l'extrait aqueux contre le stress oxydant induit par l'injection orale d'un agent chimique qui est le CCl₄ chez des rats Wistar *in vivo*, d'autre part.

- Les principaux résultats obtenus sont :
 - ❖ L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, on a enregistré des valeurs de **12.08%** et **14.9%** en extrait aqueux et éthanolique, respectivement.
 - ❖ La teneur de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique en composés phénoliques et flavonoïdes est conséquente. Elle est de **81.25 mg eq AG/g d'extrait** et de **205.35 mg eq AG/g d'extrait**, respectivement, pour les polyphénols et de **13.64 mg eq quercétine/g d'extrait** et de **28.56 mg eq quercitrine/ g d'extrait**, respectivement, pour les flavonoïdes.
 - ❖ L'activité antioxydante des différents extraits d'*Artemisia campestris* a été évaluée par 2 tests *in vitro* différents : l'inhibition du radical DPPH et le pouvoir réducteur.
 - ❖ Les résultats du test de piégeage du radical DPPH révèlent une capacité inhibitrice élevée de l'extrait éthanolique par rapport à celle du BHT.

- ❖ Les valeurs de l'IC50 sont de **191.68 mg/l** pour l'extrait aqueux, **27.8mg/l** pour le BHT et de **9.97mg/l** pour l'extrait éthanolique, le classant ainsi en première position.
 - ❖ Les résultats du test du pouvoir réducteur indiquent que le BHT possède un meilleur pouvoir réducteur que les deux extraits végétaux.
- Pour les résultats de l'expérimentation *in vivo* :
- ❖ Les rats pesés au début et à la fin de l'expérimentation ont enregistré un gain de poids presque identique pour les quatre lots expérimentaux.
 - ❖ L'IHS des rats des lots 02 et 03, ayant reçu une dose orale de 2ml de CCl₄ par kg de poids corporel, est plus élevé que celui des rats des lots témoin et 01 n'ayant pas reçu la dose de CCl₄.
 - ❖ Le dosage des marqueurs biochimiques des activités enzymatiques du bilan hépatique (ASAT, ALAT, PAL et Bilirubines), chez les rats prétraités par l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* et intoxiqués par le CCl₄, a montré une réduction de ces derniers.

Les résultats de cette étude semblent suggérer que l'extrait aqueux d'*Artemisia campestris* est en mesure d'assurer un effet protecteur contre les affections hépatiques liées à une toxicité induite par le CCl₄, et ceci grâce à sa composition en polyphénols et en flavonoïdes responsables du potentiel antioxydant de cette plante.

Ce travail peut être considéré comme un point de départ pour d'autres travaux de recherches sur les effets bénéfiques des extraits d'*Artemisia campestris*.

Comme perspectives de ce travail, on propose :

- ✓ Adopter des techniques d'analyses plus poussées sur différents extraits de plantes pour une meilleure compréhension et détermination de la composition chimique de la plante ;
- ✓ Cibler les composés bioactifs les plus intéressants, tel l'Artemésinine, les extraire et étudier leur composition à part ;
- ✓ Des études récentes suggèrent que la biodisponibilité des antioxydants naturels dans des mixtures complexes à base de plantes est plus efficace que dans les composés purs et ceci dans la prévention des pathologies dues au stress oxydatif grâce aux interactions particulières et aux synergies de réaction (**Yang** et *al.*,2013).
- ✓ Analyser les enzymes hépatiques telles que la SOD, le glutathion et la catalase, ainsi que le cytochrome P450 ;
- ✓ Etablir des coupes histologiques afin de mieux évaluer l'effet toxique du CCl₄ et l'effet protecteur de l'extrait aqueux de la plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**A**

1. **Adele C., Geoffrey K.M., Brent K.R., Rachel W.L., Khosrow A., Andre G.T., 2004.** The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *Journal of Nutrition*, 134, p-p 1340–1346.
2. **Afolayan A.J., Meyer J.J.** 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7- trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysummaureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**:177–81.
3. **Akrout A., Chemli R.C., Chrief A., Hammami M., 2001.** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J. Flavour Fragr.* **16**: 337–339.
4. **Akrout A., Gonzalez L., Eljani H.,Madrid P.,2011.**Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsta* from Southern Tunisia, *Food and chemical Toxicology*,n°49,p-p 342-347.
5. **Amarowics R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddamc P., Barl B., Weil J.A., 2004.** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry.* Vol.84, p.p. 551–562.
6. **Amat N., Upur H., Blazckovic B., 2010.** *In vivo* Hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice, *Journal of ethnopharmacology*, n°131,p-p 478-484.
7. **Aniya Y., Shimabukuro M., Shimoji M., Kohatsu M., Gyamfi M.A., Miyagi C., 2000.** Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *J. Biol. Pharm. Bull.* vol 23 ,n°03 , p-p309–312.
8. **Anonyme, 2002.** Données de base sur la toxicité des principaux solvants industriels, séminaire sur les pathologies professionnelles, Hopital Cochin, France, 87p. treated rats, *Hepatol, Res*, vol.24, p-p 125-135.

9. **Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Butler J., Halliwell B., 1995.** Commentary reaction of plant derived and syntitic antioxidants whith tricoloromethylperoxy radicals. *Free rad. Res.* 22, 187-190 p.
10. **Ashoush I.S.,El-Batawy O., Gehan I., El-Shourbagy A., 2013.**Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats, *Annal of agricultural science*,vol.58 ,n°01,p-p 27-32.
11. **Atawodi S. E., 2005.** Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.*4 (2): 128-133.
12. **Augustin S., Gary W., 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130, p-p 2073–2085

B

13. **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. *Food and agricultural rsearch council.* Reduit. Mauritius.
14. **Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C., Graça Miguel M., 2013.** Antioxidant activities of eight Algerian plant extract and two essential oils, *Industrial Crops and Products*, vol46, p-p 85-96.
15. **Bara K., Sharma A., 2010.** Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion induced injury, *journal of Ethnopharmacology*, vol 129, p-p 403-409.
16. **Baykan Erel S., Reznicek G., Senol S., Karabay Yavasogulu N., Konyalioglu S., Zeybek A., 2010.** Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L.species from Western Anatolia, *TUBITAK*, p-p 75-84.
17. **Begin D., Gérin M., 2006.** Les grandes familles de solvants organiques : utilisation et aspects physico-chimiques, édition Masson, p-p 1-25.

18. **Bekkouche F., Benachour S., 2012.** Caractérisation phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles et des extraits du Myrte (*Myrtus nivelli*). Evaluation *in vivo* de la toxicité, mémoire Master, ENSA, El Harrach, 156p.
19. **Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., Aouni M., 2007.** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio*, vol45,n°, p-p 421–428.
20. **Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chem.*, 390-393 p.
21. **Bidet D., Gagnault J., Girard P., Trotin F., 1987.** Inflammation, allergie douleurs et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89-97 p.
22. **Bitam A., 2005.** Effets nutritionnels des huiles thermoxydées sur certains paramètres structuraux et fonctionnels chez le rat en croissance. Thèse Doc.INA. El Harrach, p-p 68-69.
23. **Blair A., Stewart P.A., Tolbert P.E., Grauman D., Moran F.X., Vaught J., Rayner J., 1990.** Cancer and other causes of death among a cohort of dry cleaners. *Br J Ind Med*, **47**, 162-168.
24. **Blair A., Hartge P., Stewart P.A., McAdams M., Lubin J., 1998.** Mortality and cancer incidence of workers at an aircraft maintenance facility exposed to trichlorethylene and other organic solvents and chemicals : Extended follow-up. *Occup Environ Med*, **55**, 161-171.
25. **Boizot N., Charpentier J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre. *Le cahier des techniques de l'Inra*. p-p 79-82.
26. **Bond G.G., Flores G.H., Shellenberger R.J., Cartmill J.B., Fishbeck W.A., Cook R.R., 1986.** Nested case-control study of lung cancer among chemical workers. *Am J Epidemiol*, **124**, 53-66.

27. **Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Delattre J., 2003.** Radicaux libres et antioxydant .in : **Delattre J., Durand G., Jardillier J.C.** Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Edition médecine–sciences. Paris, Flammarion, 59-81.
28. **Bonnefont-Rousselot D., 2012.** Micronutriments et risques cardiovasculaire. *Nutrition et métabolisme*, vol 26, p-p 14-21.
29. **Boudjouref M., 2011.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* Mem.Mag.Bio., Université de Sétif, 99p.
30. **Brensilver H.L., Kaplan M.M., 1975.** Significance of elevated liver alkaline Phosphatase in serum , *Gastroenterology*, vol.68, p-p 16-34.
31. **Brownlee H, Hedjer J., Scott I., 1992.** Effects of a rangs of procianidins on the cocoa pathogen *Crinipallis pernicioso*. *Phys. Mol. Plant pathol.* 40, 227-232 p.
32. **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie - plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. 278-279p.
33. **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. p-p: 227-310-312-313-314.494.
34. **Bursal E., Koksal E., 2011.** Evaluation of Reducing Power and Radical Scavenging Activities of Water and Ethanol Extracts From Sumac (*Rhus cariaria L.*). *Food Research International* 44,p-p 2217-2221.
35. **Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V.** 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry.*, **280** (7) : 5636-5645.



36. **Caratini R., 1971.** Bordas encyclopedie.Ed *Bodas*.Belgique,vol 23,p-p137-195
37. **Carvalho I., Cavaco T., Brodelius H., 2011.** Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, vol33,p-p 382-388.
38. **Chaze E.,2004.** Hépatopathies toxiques d'origine professionnelle, thèse Doc, faculté de medecine d'Amiens, France.159p.
39. **Checkoway H., Wilcosky T., Wolf P., Tyroler H., 1984 .** An evaluation of the associations of leukemia and rubber industry solvent exposures. *Am J Ind Med*, **5**, 239-249.
40. **Chira K., Suh JH., Saucier C., Teissédre PL., 2008.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* , vol .6,p-p 75-82.
41. **Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., Chou S-T. ; 2002.** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2454-2458.
42. **Cillard J., Cillard P., 2006.** Mécanisme de la peroxydation lipidique et des anti oxydations. Laboratoire de biologie cellulaire et végétale, Paris, vol n°13,8p.
43. **Collin S., Crouzet J., 2011.** Polyphénols Et Procédés, edition Tec & Doc, 337p.
44. **Costa A., Weber G., Bartoloni St Omer F., Campana G. 2008 .** Experimental cancer of carbon tetrachloride in the rat. *Arch De Vicchi Anat Pat*, **39**,303-310.
45. **Cotelle N. 2001.** Role of flavonoids in oxidative stress.*Curr.Top. Med. Chem.* **1**:569-590.

D

46. **David A., Frantik E., Holusa R., Novakova O., 1981.**Role of time and concentration on carbon tetrachloride toxicity in rats. *Int Arch Occup Environ Health*, **48**, 49-60.
47. **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactis. Paris, 317p.

48. **Decloitre F. 1993.** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique.*, **28(2)** : 85-95.
49. **De Oliveira M., Sampaio M., Simon F., Gibert B., Mors W., 1972.** Antitumor activity of condensed flavonols. *An.Acad. Brazil.* 41-44 p.
50. **Depeint F., Gee J. M., Williamson G. et Johson I. T. 2002.** Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the NutritionSociety.*,**61** : 97-103.
51. **Dewick P.M., 1995.** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* Vol.12, p.p. 579-607.
52. **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* **65 (4)**: 337-53.
53. **Dob T., Dahmane D., BerramdaneT., Chelghoum C., 2005.**Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.*vol 43, n°6 , p-p 512–514.
54. **Domitrovic R., Jakovac H., MilinC., Static B.,2009.** Dose and time dependent effects of luteolin on carbon tetrachloride –induced hepatotoxicity in mice, *Experimental and Toxicologic pathology*, n°61,p-p581-589.
55. **Donrop A.M., Day N.P., 2007.** The treatment of severe malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med.Hyg .vol* 101, p-p 633-634.
56. **Dybing F., Dybing O., 1946** .The toxic effect of tétrachlorométhane and tetrachlorethylene in oily solution. *Acta Pharmacol*, **2**, 223-226.

E

57. **Effendi L., Yajun Y. et al., 2008.** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylatedflavonols in *Escherichia coli* .*Metab.Eng.***8**: 172-181.
58. **Ebrahimzadeh M.A., Pourmmorad F., Hafezi S., 2008.** Antioxidant activities of Iranian corn silk.Turkish Journal of Biology, vol.32.p-p43-49.

- 59. Eschenbrenner A.B., Miller E., 1946.** Studies on hepatomas - Size and spacing of multiple doses in the induction of carbon tetrachloride hepatomas. *J Natl Cancer Inst*, 4, 385-388.

F

- 60. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., 2002.** Free radicals, antioxidants, and nutrition .*regulation of physiological systems by nutrients*, vol. 18, p-p 872-878.
- 61. Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp: 108-115.
- 62. Floss H. G., 1997.** Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*. 14: 433-434.
- 63. Frankel E.N., Meyer A.S., 2000.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol.80, 1925-1940.
- 64. Frankel, E. N., 1996** .Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality, *Food Chemistry* 57, 51-55.
- 65. Frenot M., Vering E., 1997.** Biochimie des aliments, diététique des sujets bien portent, Dion, 282 p.
- 66. Fuhrman .B., Lavy A., Aviram M. 1995.** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J.Clin. Nutr.***61**:549-554.

G

67. Gàbor M., Cody V., Middleton E.J., Harborne J.B., Beretz A., Liss A.R., 1988. Plants Flavonoids in biology and Medicine II; Biochemical, Cellular and Medicinal properties. New York, 1-15 p.
68. Gardés-Albert M., 2004. De La Physico Chimie A La Radiobiologie :Les Radicaux Libres .Les Nouvelles Orientations Et Radiobiologie Et Radiopathologie,18p.
69. Garnier R., 2008. Toxicité neurologique centrales des solvants organiques,47p.
70. Gedir JV., Sporns P., Hudson RJ., 2005.Extraction of condensed tannins from cervied feed and feces and quantification using a radial diffusion assay. *J. Chem. Ecol.*, 31(12): 2761- 73.
71. Ghaffari H., Nayako C., Ghassam B., Angaswamy N., Shekar S., 2013. Hepatoprotective action of Onthosiphon diffuses methanol active fraction through antioxidant mechanisms: and *in vivo* and *in vitro* evaluation. *Journal of ethnopharmacology*, 8p.
72. Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V. 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry. letters*.1: 44-48.
73. Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. 2001. Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed TEC&DOC. Paris. pp275.
74. Gianmaria F., Amato I., Ingenito A., De Natale A., Pollio A., 2009. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*, vol 80, p-p 255- 256.
75. Giulia D., Mascolo N, Angelo A., Capasso F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65 (4)**: 337-353.

76. **Goncalves S., Gomes D., Costa P, Romano A.,2013.**The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants, *Industrial Crops and Products*,vol.47, p-p 465-471.
77. **Gorger C, Scholz E, Rimpler H.,1994 .** Ellagitanins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Med*, 6: 384-5.
78. **Goussard JP., 1999.** Les radicaux libres et antioxydants .11p.
79. **Gouveia S., Castilho P., 2013.***Artemisia annua* L. essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*,p-p 170-181.
80. **Grünwald J.N., 2006.** Guide de la phytothérapie. 1 éd., Boulogne, Marabout, 416p



81. **Halliwell B., Guetteridge J.M.C., 1999.** In free Radicals in Biology and Medecine. *Oxford Science: Oxford*,36p.
82. **Halliwell B. 1994.** Free radicals and antioxidants.*Nutr.Rev.***52**:253-265.
83. **Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., MizutaniK., Kinoshito T. 1998.** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhi zainflata*. *Phytochemistry*. **48**: 125-129.
84. **Harborne J.B., Williams C.A. 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.
85. **Han J., Kim M., Choi M., Lee J., Lee J.S., Wang J., Park H., Son S., Hwaong S., 2013.** *Artemisia capillaries* extract protects against bile duct ligation – induced liver fibrosis in rats, *Experimental and Toxicologic pathology*, vol 65, p-p 837-844.
86. **Harbone J.B., Grayer R.J., 1988.** The flavonoids, Advances. In: research since 1980. Harboirne J B, Chapman and Hall, London, 1-20 p.

87. **Haslam E.T., 1998.** Bitterness and astringency. In: Practical polyphenolics (from structure to molecular recognition and physiological action) Cambridge University Press, pp. 178-225.
88. **Hayase F., Kato M., 1984.** Antioxydant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. vetaminol.* 30, 37-46 p.
89. **Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G.,2009.** Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils, *Food chemistry*,116, p-p 714-721.
90. **Hertog M. G.** 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids.*Proceeding of the nutrition society.*,55 (1B) : 385-397.
91. **Hoffman L., Besseau S., Geoffrey P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., 2004.** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme Ashikimate/quinatase hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*,16(6) ,p-p 1446-1465.
92. **Hou F., Zhang R., Zhang M., Su D., Wei Z., Deng Y., Zhang Y., Chi J., Tang X., 2013.**Hepatoprotective and antioxidant activity of anthocyanins in black rice bran on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice, *journal of functional food*, p-p 1-9.

I

93. **IARC .1999 .**Carbon Tetrachloride - Reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon,*International Agency for Research on Cancer*, vol 71, pp. 401-432.

J

94. **Janbaz KH,Gilani A.,1995.** Evaluation of the protective potential of *Artemisia maritime* extract on acetaminophen- and CCl4-induced liver damage,*Journal of Ehnopharmacology*, n°47, p-p 43-47.

95. Jerkovic J., Mastelic M. Milos., Juteau F., Masotti V., Viano J., 2003. Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia .*Flavour. Fragr. J.* vol 8, p-p436–440.
96. Joa O.M., Vasconcelos., Artur M.S.S ., Jose A.S.C., 1998. Chromones and flavones from *Artemisia campestris Subsp Maritima*. *Phytochemistry*, vol49, n°5, p-p1421-1424.
97. Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G. 1994. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4846-4851.
98. Juteau F., Masotti V., Bessière J-M., Viano J., 2002 .Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol. Vol 30*, p-p1065-1070.

K

99. Kalegari M., Gemin C., Araujo Silva G., De Brito N., Lopez J., Tazetto S., Almeida M., Miguel M., Miguel O., 2013. Chemical composition, antioxidant activity and Hepatoprotective potential of *Rourea induta* Planch. Against CCl₄ induced liver injury in female rats. *Nutrition*, 24p.
100. Kundan S., Anupam S. 2010. The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.* pp:1-9.
101. King A., Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J of the American dietetic association.* 99:213-218.
102. Khanbabae K., Ree T.R., 2001. Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry.* 18: 641-649.
103. Kennedy G.L., Ferez R.L. and Burgess B.A., 1986. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the DL50. *J Appl Toxicol*, 6.
104. Khlifi D., Sghaier R., Amouri S., Laouini D., Hamdi M., Bouajila J., 2013. Composition and antioxidant, anti cancer and inti inflammatory activities of

- Artemisia herba alba*, *Ruta Chalepensis* ,and *Peganum harmala* L., *Food and chemical toxicology*, vol 55, p-p 202-208.
- 105. Khlifi D., Sghaier R., Amouri S., Laouini D., Hamdi M., Bouajila J., 2013.** Composition and anti oxidant activities of *Artemisia herba -alba*, *Ruta chalepensis* L., and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical toxicology*, n°55, p-p 202-208.
- 106. Kim K., Lee S., Sil Lee Y., Jung S., Park Y., Shin K., 2003.** Antioxidant activities of extracts from the herbs of *Artemisia apiaceae*, *journal of ethnopharmacology*, n°85, p-p- 69-78.
- 107. Klaassen C.D., Plaa G.L., 1967.** Relative effects of various chlorinated hydrocarbons on liver and kidney function in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*, **10**, 119-131.
- 108. Klaassen C.D. and Plaa G.L., 1969.** Comparaison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochem Pharmacol*, **18**, 2019-2027.
- 109. Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique te métabolisme*, **20**, p-p 165.177.
- 110. Koller M., Pletcher C., Jost M., 2002.** Solvants, SUVA, 20p.
- 111. Kreofsky T., Scalager G., Vuk-Pavlovic Z., Abraham R., Rohrabach M., 1992.** Condensed tannins promote the release of arachidonic acid from rabbit residents alveolar macrophages. *Am J. Resir. Cell. Mol. Boil.* **7**. 172-181 p.
- 112. Kyeong W.Y., Anwar M., Jong H.K., 2007.** Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *Caudate* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology*. Vol 50, n°3, p-p 358-361.

L

- 113. La pointe G., 2004.** Notions de Toxicologie.2^{eme} edition .Quebec, editeur commercial ;p.8-40.

114. Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y. , 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. FoodChem.* **51**: 7292-7295.
115. Lehucher –Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *la presse médicale*, vol.30, p-p 1076-1081.
116. Lennie TA., 2006. Nutritional recommendations for patients with heart failure. *J Cardiovasc Nurs*, vol 21, n°04, p-p 261-268.
117. Leonid N., Newark H., Kitrossky N., Rahamim E., Chevion M., Rachmilewitz A., 1997. Protective Effects Of Tea Polyphénols Against Oxidative Damage To Red Blood Cells. *Biochemical Pharmacology*, vol 54, p-p 973-978.
118. Lombard A., Bajon R., 2000. *Artemisia campestris* L., 1753. In Museum national d'Histoire naturelle édition 2006. Conservatoire botanique national du Bassin parisien, site Web <http://www.mnhn.fr/cbncpy>.
119. Lugasi A, Hovari J, Sagi, K V et Biro L, 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientsis*.1-4, 119-125 p.
120. Lynnette, R., Ferguson, 2001. Role Of Plant Polyphenols In Genomic Stability. *Mutation Research* ,475, p-p 89–111.

M

121. Mabry T., Ulubelen A., 1980. Chemistry and utilization of phenilpropanoides including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28, 188-196 p.
122. Medic–Saric M., Jasprica I., Smolcic BubaloA., Momar A. 2003. Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids.*Croatica Chemica Acta* .77, 1-2:361-366.

123. **Mahmoud N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A.J. 2000.** Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir.Res.* 46(7): 1257-71.
124. **Maitre A., 2003.** Risques spécifiques et prévention liés à l'exposition aux solvants, faculté de Médecine de Grenoble, 14p.
125. **Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z., 2007.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry.* Vol.104, 1258–1268.
126. **Makeno P.S., Chung K.T., 2007.** Effect Of Various Plant Polyphénols On Bladder Carcinogen Benzidine Induced Mutagenicity. *Food And Chemical Toxicology*, vol45,p-p- 1899-1909.
127. **Mansouri, A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P., 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* Vol.89, p.p. 411-420.
128. **Masquelier J., Dumon M., Dumas J., 1979.** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique.* 1, 101-104 p.
129. **Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z., Fekhih A., 2007.** Use of medicinal plants against *scorpionic* and *ophidian* venoms. *Arch. Inst. Pasteur .Tunis.* Vol 84, p-p 49-55.
130. **Ménezo M., Entezami F., Lichtblau I., Cohen M., Bellac S., Brack M., 2012.** Stress oxydant et fertilité : fausses évidences et mauvaises recettes. *gynécologie obstétrique et fertilité*, vol 40, p-p 787-796.
131. **Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E., Sonboli. A., 2007.** Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. Oil Res.* Vol 19, p-p 326–329.
132. **Morelle-Lauzanne E., 2006.** L'alimentation, le stress oxydatif: source de lipoperoxydation , comment s'en protéger, *Phytothérapie*, n°05, p-p 75-82.
133. **Morikawa Y., Hisaoka T., Senba E., 2008.** Characterization of Foxp2-expressing cells in the developing spinal cord. *Neuroscience*, Volume 162, Issue 4, Pages 1150-1162.

- 134. Mucciarelli M., Maffei M., 2002.** *Artemisia*: Introduction to the Genus Vol. Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York, p-p 10-16.

N

- 135. Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y., 2010.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* vol 3, p-p79–84.
- 136. Nakase I., Lai H., Singh N.P., Sasaki T., 2008.** Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferin conjugation. *International journal of pharmaceutics*, vol.354,p-p 28-33.
- 137. NCI. 1976.** Report on carcinogenesis bioassay of chloroform. *National Cancer Institute*.Bethesda, MD.

O

- 138. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M. et Takahara Y., 1993.** Antioxydant activity of tannins and flavonoids in *Eucaliptus rostarata*. *Phytochimie*. 33, 557-561 p.
- 139. Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H., Arichi S., 1983.** Studies on the activitis of tannins and related compounds from medicinal and drugs. Inihibitory effects of lipid peroxydation in mitochandria and microsome of lever. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1625-1631 p.
- 140. Ott M.G., Carlo G.L., Steinberg S., Bond G.G., 1985.**Mortality among employees engaged in chemical manufacturing and related activities. *Am J Epidemiol*, 122, 311-322.

141. **Oyaizu M., 1986.** Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese J.Nutr.* Vol .44, p-p 307-315.

P

142. **Paris M ., Hurabielle A., 1981.** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed .Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.
143. **Paul S., Shakya K., 2013.** Arsenic, chromium and Nacl induced artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L: Available ant malarial plant, *Toxicology and environmental safety*, vol 98, p-p- 59-65.
144. **Pavela R., 2009.** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol Res.* vol105,p-p 887–892.
145. **Pichard A., 2005.** Tétrachlorure de carbone, INERIS ; fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, n°01,52p.
146. **Pincemail J., Degruneb F., Voussurec S., Malherbec C., Paquotd N., Defraigne J., 2007.** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques enantioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* 21, p-p 66–75.
147. **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., 1999.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu ; une réalité pour le médecin. *vaisseaux, cœur ,poumons*, vol 04,n°5,7p.

R

148. **Rashid A., Quershi Z., Raza S., William J., Arshad M., 2010.** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*, *ASS descendi publishing house*, vol 19, °01, p-p 23-30.
149. **Rashid S., Rather M., Shah W., Bhat B., 2013.** Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica Wild*, *Food chemistry*, n°138, p-p 693-700.
150. **Rayn H., Andary C., Kovacs G ., Molgaard P., 1984.** Cafféic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochimie. Syst. Ecol.* 17, 175-184 p.
151. **Ren K.M., Fischer R., Wollenweber E., 2003.** Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol. Vol* 31, p-p 487-498.
152. **Riahi L., Chograni H., Elferchichi M., Zaouali Y., Zoghlami N., Mliki A., 2013.** Variation In tunisian Wormwood Essential Oil Profiles And Phenolic Contents Between Leaves And Flowers And Their Effects On Antioxidant Activities. *Industrial Crops and Products* ,n°46, p-p 290-296.
153. **Ribereau G P., 1964.** Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. Veg.*, I.N.R.A.
154. **Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Riberau Gayon P., 1976.** Traité d'œnologie, science et technique du vin. Ed. Dunod. Paris.
155. **Riché D.,1999.** Guide nutritionnel des sports d'endurance, 75p
156. **Romero M.R., Efferth T., Serrano M.A., Castano B., Macias R.I., Briz O., Marin J., 2005.** Effect of artemisinin as inhibitors of hepatitis B virus production in an “*in vitro*” system. *Antivir Res.* vol 68, p-p 75-83.
157. **Roudabush R.L., Terhaar C.J., Fassett D.W., Dziuba S.P., 1965.** Comparative acute effects of some chemicals on the skin of rabbits and guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 7, 559-565.

- 158. Sanchez – Muniz F.J., Lopez-Varela S., Polonio G.M., Custa C., 1998.** Dietary effect on growth, liver peroxides and serum lipoprotein lipids in rats fed a thermoxidised and polymerized sunflower oil, *Journal science food agriculture*, vol 76, p-p 364-372.
- 159. Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Tec&Doc lavoisier, 398p.
- 160. Sasseville, J.L., 1980.** La problématique des substances toxiques dans l'environnement, tome 1 : L'agression toxique. Bureau sur les substances toxiques, Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec, 46 p.
- 161. Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., El Feki A., 2010.** Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* vol62, p-p 601-605.
- 162. Scalbert A., Williamson G., 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphénols J Nutr. 130, 2073-2085 p.
- 163. Sefi M., Bouaziz H., Soudani N., Boudouwara T., Zeghal N., 2011.** Fenthion induced oxidative stress in the liver of adult rats and their progeny alleviation by *Artemisia campestris*, *pesticide biochemistry and physiology*, vol 101, p-p 71-79.
- 164. Sefi M., Fetoui H., Soudani N., Chtourou Y., Makni M., Zeghal N., 2012.** *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. *Pathology –Research and Practice*, vol208, p-p 157-162.
- 165. Sengul M., Ercisli S., Yildiz H., Gungor N., Kavaz A., Celin B., 2011.** Antioxidant, Antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum*, and *Saponaria officinalis*. *Iranian journal of pharmaceutical research*, vol10, n°01, p-p 49-56.

166. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. 2006. Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. **67**: 2058–2070.
167. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. ; 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, **112**, 885-888.
168. Shawkat R., Rather M.A., Shah W.A., Bhat B.A., 2013. Chemical Composition, Antimicrobial, Cytotoxic And Antioxidant Activities Of The Essential Oil Of *Artemisia Indica* Wild. *Food Chemistry*, vol 138,p-p 693-700.
169. Siddhuraju P.et Becker K., 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cow pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. Vol.101, n.1, 10-19
170. Sinegh H., Kaur S., Mittal S., Batish D., Kahil R., 2010. *In vitro* screening of essential oil from young and mature leavec of *Artemisia scoparia* compared to its major constituents for free radical scavenging activity, *food and chemical toxicology*, vol 48,p-p 1040-1044.
171. Sintaheyu B., Bucar F., Veeresham C., Asres K., 2012. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of extracts and a major compounds isolated from the leaves on *Cineraria abyssinica*, Sch.Bip.exA.Rich, *pharmacognosy journal*, vol 4,n°29, 7p.
172. Skerget M., Kotnik P., Hadolin.M., Hras A.R., SimonicM., Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* **89**: 191-198.
173. Smyth H.F., Weil C.S., West J.S., Carpenter C.P., 1970. An exploration of joint toxic action: II. Equitoxic versus equivolume mixture. *Toxicol Appl Pharmacol*, **17**, 498-503.
174. Soro T. Y., 2009.. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 332, n. 4, p.p. 371-377.
175. Sreelatha S., Padma P.R., Umadevi M., 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, vol 47, p-p 702-708.
176. Stavric B., Matula T., 1992. Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. 274-294 p.

177. **Suhartono E., Viani E., Apriyansa Rahmadhan M., Syahuri Gultom I., Rakhman M.F., Indrawardhana D., 2012.** Total Flavonoid and Antioxidant Activity Of Some Selected Medicinal Plants In South Kalimantan Of Indonesian. *APCBEE Procedia* , vol 4, p-p 235-239.

T

178. **Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., Mathé G. 2002.** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* **56**: 200-207.
179. **Teiten M.H., Diedrich M., 2013.** Anticancer bioactivity of compounds from medecinal plants used in European Medieval traditions. *Biochemical Pharmacology*,32p.
180. **Temani, 2005.** In el Watan quotidien national du 10.07.2005.
181. **Teschke R., Vierke W., Goldermann L., 1983.** Carbon tetrachloride levels and serum activities Of liver enzymes following acute CCl₄ intoxication,*Elsevier*,n°17,p-p 175-180.
182. **Tietz N.W., 1983.** *J.Clin.Chem.Clin. Biochem*,21,p-p 731-748.
183. **Tim C.T.P., Andrew J. L. 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids.*Int. J.Antimicrob. Ag.* **26**:343–356.
184. **Traore D., 1999.** Médecine et Magie Africaine. Edit présence Africaine. Paris , 569 P.

V

185. **Valant-Vetschera K.M., Fischer R., Wollenweber E. 2003.** Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 487-498.
186. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *Biocell.* Vol 39, p-p 44-84.

W

187. Wachter G.A., Hoffmann.J.J.,Furbacher.T., Blake.M.E.,Timmermann.B.N. 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry*. **52**: 1469-1471.
188. Waterhouse S., Zhou GM., Michelly R., Wibisono S., Wodhawa S., 2011. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid, *food chemistry*, n°126, p-p 1049-1056.
189. Weisburger E.K., 1977. Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ Health Perspect*, 21, 7-16.
190. Wilcosky T.C., Checkoway H., Marshall E.G., Tyroler H.A., 1984. Cancer mortality and solvent exposures in the rubber industry. *Am Ind Hyg Assoc J*, **45**, 809-811.
191. Wolfe K., Wu X., Liu R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. Vol. 51, 609–14.

Y

192. Yakub H., Nayira A., Hala A., Faddah L.M., 2008. Hepatoprotective effect of N-acetyl cysteine and/or β Carotene on Monosodium glutamate – induced toxicity in Rats *research journal of medicine and medical sciences*, vol 3, n°2,p-p 206-215.
193. Yang C., Fang J., Hong T., Zhou Y., Lin T., 2013. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against CCl₄ induced liver injury, *International immunopharmacology*, n°15, p-p- 106-113.
194. Yao I., Akimoto S., 2008. An attendance changes the sugar composition of the honeydew of the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. *Oecologia*, 36-43 p.
195. Yefsah-Idres A.,2007. Biodisponibilité et incidence physiologique du Lycopène chez le rat. Thèse .Mag. INA.El Harrach.96p.

Z

- 196. Zhang S., Lu B., Han X., Xu L., Qi Y., Yin L., Xu Y., Zhao Y., Liu K., Peng J., 2013.** Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice, *Food and Chemical Toxicology* ,55, 60–69.
- 197. Zheng W.F., Tan R.X., Yang L., Liu Z.L.** 1996. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta.Med.* **62**: 160-162.
- 198. Zhang WY.** 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism *Int. Immunopharmacol.*, 5 (7-8): 1247-57.
- 199. Zimmer Z, Cordesse R. ,1996.** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Prod. Anim.* 9 (3): 167-79.

ANNEXES**Annexe n° 01:** Activité de piégeage du radical libre des extraits d'*Artemisia campestris* comparée à celle du BHT

Concentrations (mg/l)	Activité de piégeage du DPPH des extraits d' <i>Artemisia campestris</i> et du BHT (%)				
	Extrait éthanolique	Ecartype	Extrait aqueux	Ecartype	BHT
2	29.32	3.29	4.41	1,21	ND
5	33.58	2.55	7.56	0.49	ND
10	44.40	2.05	11.68	0.92	31.40±0.70
20	64.19	1.48	14.33	0.79	42.14±0.48
50	85.21	0.65	20.70	0.97	62.49±0.69
100	85.50	0.35	41.91	0.50	73.15±0.85
200	ND	ND	57.01	ND	ND

Annexe n° 02: Pouvoir réducteur des différents extraits d'*Artemisia campestris* comparé au pouvoir réducteur du BHT

Concentrations (µg/ml)	Absorbance ^a lue à 700 nm				
	Extraits d' <i>Artemisia campestris</i>				BHT
	Extrait éthanolique	Ecartype	Extrait aqueux	Ecartype	
2	0.143	0.026	0	0	ND
5	0.175	0.058	0.02	0.0058	ND
10	0.194	0.050	0.021	0.046	ND
20	0.239	0.015	0.122	0.098	0,311±0.006
50	0.397	0.075	0.243	0.020	0,576±0.001
100	0.655	0.0218	0.435	0.020	0,863±0.011

^a: valeurs en moyenne ± écart-type

Annexe n° 03: Dosage des activités enzymatiques des transaminases dans le sérum sanguin des rats.

Activités enzymatiques	Lot	Lot témoin	Lot 01	Lot 02	Lot 03
	Sacrifice				
ASAT (UI/l)	1 ^{er} sacrifice	302.73	290.72	335.88	171.84
	2 ^e sacrifice	314.58	281.11	455.9	168.5
	3 ^e sacrifice	299.01	262.16	501	179.34
ALAT (UI/l)	1 ^{er} sacrifice	280	230.54	314.57	146.81
	2 ^e sacrifice	276.23	216.32	325.35	120.35
	3 ^e sacrifice	276	215.63	335.88	162.46
ASAT/ALAT	1 ^{er} sacrifice	1.21	1.26	1.06	1.17
	2 ^e sacrifice	1.13	1.29	1.41	1.40
	3 ^e sacrifice	1.08	1.21	1.49	1.10

Annexe n° 04: Dosage de la Phosphatase alcaline et de la bilirubine dans le sérum sanguin des rats.

Activités enzymatiques	Lot	Lot témoin	Lot 01	Lot 02	Lot 03
	Sacrifice				
PAL (UI/l)	1 ^{er} sacrifice	218	208.36	403.32	154.3
	2 ^e sacrifice	222.59	199	500.12	142
	3 ^e sacrifice	216.12	206.05	468	139.82

Annexe n° 05 : Dosage de la bilirubine directe et de la bilirubine totale dans le sérum sanguin des rats.

Enzymes	Lot	Lot témoin	Lot 01	Lot 02	Lot 03
	Sacrifice				
Bilirubines Totale (UI/l)	1^{er} sacrifice	2.75	1.51	4.45	1.95
	2^e sacrifice	2.79	1.49	4.53	1.98
	3^e sacrifice	2.98	1.52	4.44	1.86
Bilirubines Directe (UI/l)	1^{er} sacrifice	3.32	2.13	6.81	2.34
	2^e sacrifice	3.36	2.14	6.51	2.39
	3^e sacrifice	3.54	2.26	5.99	2.35