



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire N série:.....

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

**Evaluation *in vivo* de l'activité hépatoprotectrice de
l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. face à une
hépatotoxicité induite par le CCl₄**

Présenté Par :

M^{elle} BARKA Dalel

M^{elle} BEN MOUSSA Radhia

Devant le jury composé de :

Président : Mr. DEROUICHE Samir

M.C.A, Université d'El Oued.

Examineur : Mr. TELILI Mohamed Elaid

M.A.B, Université d'El Oued.

Promotrice : M^{me}. MEDILA Ifriqya

M.C.A, Université d'El Oued.

Année Universitaire 2017/2018

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu « Allah » tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite

*À notre promotrice de mémoire, **M^{me} MEDILA Ifriqya**, maître de conférence A à la faculté des sciences de la nature et de la vie - Université d'El Oued, pour avoir accepté de nous encadrer, pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils.*

*À le président de jury, **Mr DEROUICHE Samir**, maître de conférence B à la faculté des sciences de la nature et de la vie - Université d'El Oued, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette mémoire. Hommage respectueux.*

*nous tenons à exprimer également notre profonde reconnaissance à **Mr TLILI Mohamed Elaid**, maître assistant B a la faculté des sciences de la nature et de la vie - Université d'El Oued, d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à lui exprimer notre grand respect.*

*Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail ont particulier **Mr Djahra A.B. & M^{me} Adaika A.***

*On adresse nos sincères remerciements à tout l'ensemble des membres du laboratoire département de la science de la nature et de la vie, Université **HAMMA LAKHDAR**, El Oued*

Dédicace

En ce jour inoubliable de ma vie

Je dédie ce travail du fond de mon cœur

*A Ma source de nostalgie ma mère **GHANEBZIA Nadjet***

*A Mon chère qui vive au fond du mon cœur mon père **Mostafa***

*A Ma grand-mère **DJABARIA***

*A Mon frère **Abd Allah** et sa femme **Zeinb***

*A Mon chère frère **Abd Elkarim***

*A Ma sœur **Aoitef**, son mari **Abd Elghani** et ses enfants*

Asma Oussama Mouhamed Elbachir Younis Maram

*A Ma sœur **Houria**, son mari **Bachir** et ses enfants*

Aya Meriem Ibrahim

*A Ma sœur **Hana** et son mari **Tayeb***

*A Ma sœur **Nacira**, son mari **Abd Elghani** et ses enfants*

Ali Fatima

*A Mes sœurs **Douaa Maroi Sabrin Safa***

*A ma ami **Dalal***



Radhi

Dédicace

A l'aide de **ALLAH** tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le Bonheur de ma vie ma mère **LABRAOU MANSOURA** qui ma apporté son appui durant toutes mes Années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné Confiance, courage et sécurité.

A mon cher père **SALAH** qui ma appris le sens de la persévérance tout Au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses Encouragements.

A ma chère grand-mère **BECHIRA**

A mon cher frère **MOURAD**

A mes chères sœurs **SABRINE, NOUR EL-IMAN et MASSOUDA**

A ma tante **DJABARIA** et ses enfants **WALID, RITADJ, SOUHAIB et SOUHA**

A ma tante **FAIROUZ, DJABARIA, RACHIDA**

A mes oncles **TIDJANI, OTHMANE** et sa femme **NAIMA** et ses enfants **ARBI, WIDJDANE, TAHA**

RACHID sa femme **NADIA** et ses filles **OUISSAL, DJANA**

IBRAHIM sa femme **YAMINA** et ses enfants **ARBI, MOADH**

MAHMOUD sa femme **KHADIJDA** et son fille **MAYSAM**

A ma tante **NADJET, HADJER, KHADRA** et **MERIEM**

A mes oncles **MA'ATOUG, AMMER, IBRAHIM, MOHAMED** et **KARIM**

A mes amis **ROUKAIA** et **RADHIA**

Dalel



Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer *in vivo* l'activité hépatoprotectrice de l'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. contre une intoxication induite par le tétrachlorure de carbone chez des rattes femelles de type *Wistar Albinos*.

In Vivo, Notre expérimentation a été réalisée chez 40 rattes *Wistar* femelles; divisées en 8 lots, un lot témoin, lot intoxiqué par le CCl₄ (3ml/Kg p.c), lot traité non intoxiqué, lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. (100mg/kg) puis intoxiqué par le CCl₄ (3ml/Kg p.c), lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. (200mg/kg) puis intoxiqué par le CCl₄ (3ml/Kg p.c), lot intoxiqué par le CCl₄ (3ml/Kg p.c) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. (200mg/kg), un lot intoxiqué par une dose létale (6 ml CCl₄ /Kg p.c.), et un lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. (100mg/kg) puis intoxiqué par une dose létale (6 ml CCl₄ /Kg p.c.)

L'expérimentation dure 9 jours et l'hépatotoxicité est induit le 7^{ème} jour.

Le screening phytochimique a montré la présence des flavonoïdes, des sucres réducteurs, tanins, stéroïdes et terpenoïdes. L'analyse quantitative a montré que l'extrait est riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

L'évaluation de l'effet antioxydant de ce extrait par le piégeage du radical libre DPPH a donné la valeur d'IC₅₀ de 0.638 mg/ml.

Nos résultats montrent que le CCl₄ augmente significativement le poids relatif de foie, les valeurs sériques de TGO, TGP, PAL, γ -GT, BT et BC, ainsi que le taux hépatique de paramètre de stress oxydative; MDA, activité de CAT ; Et diminue notablement le taux hépatique du GSH comparativement au groupe témoin. Ces résultats ont été confirmés par les lésions hépatiques observées dans les coupes histologiques. Le prétraitement par les dose 100 et 200 mg/kg et le traitement curative de dose 100 mg/kg d'extrait a réduit d'une manière significative du poids relatifs, les taux sériques de TGO, TGP, PAL, γ -GT, BT et BC, taux hépatique du MDA, l'activité de CAT et augmente le taux de GSH. De plus, l'architecture hépatique normale a été restaurée. Un traitement avec l'extrait aqueux, à des doses comprises 100 mg/kg, entraîne une baisse de la mortalité lors d'une hépatotoxicité létale.

Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. protège le foie à faible dose contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄, et donc possède un effet hépatoprotecteur.

Mots clés: Le foie, l'activité hépatoprotectrice, tétrachlorure de carbone, stress oxydative, *Daphne gnidium* L., rattes *Wistar Albinos*.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط حماية الكبد للمستخلص المائي لنبات *Daphne gnidium L.* ضد التسمم الناجم عن رباعي كلوريد الكربون (CCl_4) عند الجرذان الإناث من سلالة وستار البيضاء.

حيويا، أجريت تجربتنا على 40 جرذة من سلالة وستار مقسمة إلى 8 مجموعات ، مجموعة شاهدة، مجموعة مسممة بواسطة CCl_4 (3مغ/كغ من وزن الجسم)، مجموعة معالجة غير مسممة، مجموعة معالجة بمستخلص *Daphne gnidium L.* (100 مغ/كغ من وزن الجسم) ثم سممت بـ CCl_4 (3 مل/كغ)، مجموعة معالجة بمستخلص *Daphne gnidium L.* (200مغ/كغ من وزن الجسم) ثم سممت بـ CCl_4 (3مغ/كغ)، مجموعة سممت بـ CCl_4 (3 مل/كغ) ثم عولجت بمستخلص *D. gnidium L.* (100 مغ/كغ من وزن الجسم)، مجموعة سممت بجرعة قاتلة للـ CCl_4 (6 مل/كغ) ومجموعة عولجت بمستخلص *Daphne gnidium L.* (100 مغ/كغ من وزن الجسم) ثم سممت بجرعة قاتلة من CCl_4 (6 مل/كغ).

استمرت التجربة 9 أيام وتجرى السمية الكبدية في اليوم السابع.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود الفلافونويد ، السكريات المرجعة، التانينات، الستيرويدات والتيربينويدات كما أظهر التحليل الكمي أن المستخلص غني بمركبات البوليفينول والفلافونويد.

أعطى تقييم التأثير المضاد للأكسدة لهذا المستخلص فعالية في تثبيط جذر DPPH حيث قدرت قيمة (IC_{50}) 0.638 مغ/مل.

تظهر نتائجنا أن CCl_4 يزيد بشكل ملحوظ من وزن الكبد النسبي ، TGO ، TGP ، PAL ، γ -GT ، BT ، و BC في المصل ، وكذلك عوامل الإجهاد التأكسدي الكبدية. MDA، نشاط CAT؛ ويقال بشكل ملحوظ مستويات GSH الكبدية مقارنة بمجموعة الشاهدة. تم تأكيد هذه النتائج بواسطة المقطع النسيجي. المعالجة الوقائية بـ 100 و 200 مغ / كغ من الجرعة والعلاج بالجرعات العلاجية 100 مغ / كغ من المستخلص يقلل بشكل كبير الوزن النسبي ومستويات TGO ، TGP ، PAL ، γ -GT ، BT و BC في المصل و مستويات MDA ، GSH و CAT في الكبد. بالإضافة إلى ذلك ، تمت استعادة البنية الطبيعية للكبد. العلاج مع مستخلص مائي ، بجرعات 100 مغ / كغ ، يؤدي إلى انخفاض في معدل الوفيات أثناء التسمم الكبدية القاتل.

هذه النتائج تشير إلى أن المستخلص المائي لـ *Daphne gnidium L.* يحمي الكبد بجرعة منخفضة ضد السمية الكبدية التي يسببها CCl_4 ، وبالتالي له تأثير محافظ للكبد.

الكلمات المفتاحية: الكبد، النشاط الكبدية، رابع كلوريد الكربون، الإجهاد التأكسدي، *Daphne gnidium*، فتران وستار.

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	L'appareil digestif humain	05
Figure 02	face supérieure	06
Figure 03	Face Inférieure	07
Figure 04	Face Postérieure	08
Figure 05	Le lobule hépatique	10
Figure 06	les cellule de foie	11
Figure 07	Canaux biliaires	12
Figure 08	Activation métabolique du tétrachlorure de carbone à l'origine de son hépatotoxicité	16
Figure 09	L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM)	17
Figure 10	Cellules impliquées dans l'hépatotoxicité des médicaments	18
Figure 11	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	32
Figure 12	Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène	34
Figure 13	Cycle oxydo-réducteur du glutathion	35
Figure 14	Alpha-tocophérol	37
Figure 15	BHA faisant don de H [•] (à un radical) devenant lui-même un radical puis réarrangeant une structure stable (quinone)	39
Figure 16	<i>Daphne gnidium</i> L.	43
Figure 17	Structure de base de flavonoïde	44
Figure 18	2,5,7,4 tétrahydroxyisoflavonol (composé n ° 10)	44
Figure 19	Daphnorétine	45
Figure 20	Orientine	45
Figure 21	Structure de base de flavonones	45
Figure 22	Structure de base de flavonols	45
Figure 23	Structure générale des coumarines	45
Figure 24	Daphnorétine (composé n ° 15)	46
Figure 25	Phorbol	46
Figure 26	Ingenol	46
Figure 27	Les feuilles des <i>Daphne gnidium</i> L.	50
Figure 28	Protocole de préparation de l'extrait aqueux	52
Figure 29	réaction entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH [•]).	54
Figure 30	gavage de l'extrait aqueux de <i>Daphne gnidium</i> L.	56
Figure 31	Schéma récapitulatif du protocole expérimental de l'étude.	57
Figure 32	Pourcentage d'inhibition de DPPH par d'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L.	68
Figure 33	IC ₅₀ d'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. et l'acide ascorbique en mg/ml.	69
Figure 34	Variation du poids relatif de foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux pendant 9 jours.	70
Figure 35	Variations des enzymes TGO et TGP chez le groupe témoin et les différents groupes expérimentaux.	72

Figure 36	Variation de de l'activité de PAL, γ -GT, bilirubine totale et directe chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	72
Figure 37	Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) et glutathion réduit (GSH) et activité de catalase chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	74
Figure 38	Structure histologique du foie chez les rattes du lot témoin normal.	75
Figure 39	Structure histologique du foie des rattes témoin intoxiqué par le CCl ₄	75
Figure 40	Structure histologique du foie des rattes traitée par <i>Daphne gnidium</i> L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl ₄ 3ml/kg.	76
Figure 41	Structure histologique du foie des rattes traitée par <i>Daphne gnidium</i> L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl ₄ 6ml/kg.	76
Figure 42	Structure histologique du foie des rattes traitée par <i>Daphne gnidium</i> L. avec dose 100mg/kg.	76
Figure 43	Structure histologique du foie des rattes traitée par <i>Daphne gnidium</i> L. avec dose 200mg/kg puis intoxiqué par le CCl ₄ 3ml/kg (test préventive).	77
Figure 44	Structure histologique du foie des rattes intoxiqué par le CCl ₄ 3ml/kg puis traitée par <i>Daphne gnidium</i> L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué (test curative).	77

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Caractéristiques physiques et chimiques de tétrachlorure de carbone	23
Tableau 02	Caractéristiques de la molécule de tétrachlorure de carbone	25
Tableau 03	Les espèces végétales du genre <i>Daphne</i>	42
Tableau 04	Les flavonoïdes (1-9) du <i>D. gnidium</i>	44
Tableau 05	les coumarines (10-13) du <i>D. gnidium</i>	46
Tableau 06	Résultat des tests phytochimiques d'extrait aqueux de <i>Daphne gnidium L.</i>	67
Tableau 07	La teneur en polyphénol et flavonoïdes niveau des feuilles de la plante de <i>Daphne gnidium L.</i>	68
Tableau 08	Le taux de survie des animaux en fonction des traitements en cas d'intoxication d'ordre létale au CCl ₄	69
Tableau 09	Poids initiale des rattes, le poids de foie et poids relative de le foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALAT	Alanine amino transférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
BC	Bilirubine conjugaie
BHA	Hydroxyanisolebutylé
BHT	hydroxytoluène butylé
BT	bilirubine totale
CAT	Catalase
CCL ₄	tétrachlorure de carbone
ClO ⁻	L'anion hypochlorite
CMA	Consentration maximal acceptable
ERO	espèces radicalaires de l'oxygène
GGT	γ-glutamyl transférase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathionne-S-transférase
HO [•]	radical hydroxyle
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
MDA	Malondialdéhyde
NO [•]	monoxyde d'azote
NO	Oxydes nitrique
ONOO ⁻	peroxynitrite
ONOOH	nitroperoxyde
O ₂ ^{•-}	l'anion superoxyde
¹ O ₂	l'oxygène singulet
PAL	phosphatase alcaline
SOD	superoxyde dismutase
TGO	Glutamate oxalo acétate-transaminase
TGP	Transaminase glutamique pyruvique

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : Le foie	
1. Définition de foie	05
2. Formation du foie	05
3. Forme, couleur et consistance	05
4. Anatomie descriptive	06
4.1. La morphologie externe	06
4.1.1. La face supérieure	06
4.1.2. Face inférieure	07
4.1.3. Face postérieure	08
4.2. Vascularisation	08
4.3. Structure macroscopique	09
4.3.1. Lobes, segments:	09
4.4. Structure microscopique	09
4.4.1. Le lobule hépatique	09
4.4.2. L'acinus	10
4.4.3. Les sinusoides hépatiques	10
4.4.4. Les cellules du foie	11
4.4.4. 1. La cellule hépatique (hépatocyte)	11
4.5. Canaux biliaires	12
5. Fonctions du foie	12
5.1. Fonction sécrétoire exocrine : la bile	12
5.2. fonction antitoxique	13
5.3. fonction métabolique	13
6. Les atteintes hépatiques	13
6.1. Les hépatites	13
6.1.1. Définition	13

6.1.2. Les hépatites virales	14
6.1.2.1. L'infection aiguë	14
6.1.2.2. Hépatites virales chroniques	15
6.1.3. Les hépatites non virales	15
6.1.3.1. Les hépatites auto-immunes (HAI)	15
6.1.3.2. Hépatite toxique chimique	15
6.1.3.3. L'hépatotoxicité médicamenteuse	16
6.2. Les lésions hépatiques	18
6.2.1. Nécrose	18
6.2.2. Stéatose	19
6.2.3. La fibrose	19
6.2.3.1. Mécanismes de la fibrose hépatique	19
6.2.4. Cirrhose	19
6.2.5. Le carcinome hépatocellulaire	20
7. L'exploration de la fonction hépatique	20
7.1. L'exploration biologique hépatique	20
7.1.1. Les transaminases	20
7.1.2. La γ -glutamyl transférase (γ -GT)	21
7.1.3. La phosphatase alcaline (PAL)	21
7.1.4. Bilirubine	21
7.2. Etude histologique	22
8. Tétrachlorure de carbone CCl_4	22
8.1. Caractéristiques physiques et chimiques	23
8.2. Effets de tétrachlorure de carbone sur la santé	23
8.3. Les effets toxiques du tétrachlorure de carbone	24
CHAPITRE II : Stress oxydative	
1. Systèmes oxydant	27
1.1. Stress oxydatif	27
1.2. Les radicaux libres	27
1.2.1. Définition d'un radical libre	27
1.2.2. Types des radicaux libres	28
1.2.3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie cellulaire	30
1.2.4. Cibles biologiques des radicaux libres	31

2. Systèmes antioxydants	33
2.1. Système antioxydant enzymatique	33
2.2. système antioxydant non enzymatique	36
2.3. Antioxydants d'origine végétale	38
2.4. Les antioxydants Synthétisées	38
CHAPITRE III : <i>Daphne gnidium</i> L.	
1. Famille Thymelaeaceae	41
2. Genre Daphne	41
2.1. Distribution et description du genre Daphne	41
2.2. Les espèces végétales du genre Daphne	42
3. <i>Daphne gnidium</i> L.	42
3.1. Présentation et description botanique	43
3.2. Classification	43
3.3. Composition chimique	44
3.4. propriété pharmacologique	46
3.5. Utilisation de <i>Daphne gnidium</i> L.	47
DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE I : Matériels et Méthodes	
1. Matériels	50
1.1. Matériel végétal	50
1.2. Matériel animal	50
1.3. Matériels d'étude au laboratoire	51
2. Méthodes	51
2.1. Préparation de l'extrait aqueux	51
2.2. Calcule du rendement de l'extrait	51
2.3. Etude <i>In Vitvo</i>	51
2.3.1. L'analyse phytochimiques	51
2.3.2. Analyse quantitative des composés phénoliques	53
2.3.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	53
2.3.2.2. Dosage des flavonoïdes	54
2.3.2.3. Test du DPPH (diphenylpyryl-hydrazyl)	54
2.4. Etude <i>In Vivo</i>	55
2.4.1. Préparation de solution CCl ₄	55
2.4.2. Préparation de l'extrait végétal	55

2.4.2.1. Evaluation des doses d'administration expérimentale	55
2.4.2.2. Méthode d'administration de l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L.	55
2.4.3. Traitement des animaux	56
2.4.4. Evaluation du taux de survie après une intoxication d'ordre létale	58
2.4.5. Sacrifice et prélèvement de sang et de foie	58
2.4.6. Dosage des paramètres biochimique du sang	58
2.4.6.1. Dosage de l'aspartateaminotransférase (ASAT)	58
2.4.6.2. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)	59
2.4.6.3. Dosage de l'activité des phosphatases alcalines	59
2.4.6.4. Méthode de dosage de bilirubine total	59
2.4.6.5. Méthode de dosage de bilirubine direct	60
2.4.6.6. Dosage de gamma-glutamyl transférase (γ -GT)	60
2.5. Dosage des paramètres de stress oxydatif	60
2.5.1. Préparation des homogénats	60
2.5.2. Dosages des protéines tissulaires	61
2.5.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	61
2.5.4. Dosage de l'activité enzymatique du catalase	62
2.5.5. Dosage des glutathion réduit (GSH)	62
2.6. Etude histologique	63
2.6.1. Fixation des échantillons	63
2.6.2. Déshydratation	63
2.6.3. Inclusion	64
2.6.4. Confection des coupes histologiques	64
2.6.5. Coloration	64
2.7. Etude statistique	65
CHAPITRE II : Résultats	
1. Etude <i>In Vitro</i>	67
1.1. Rendement d'extrait aqueux	67
1.2. Analyses phytochimiques	67
1.3. Analyse quantitative des composés phénoliques	67
1.3.1. Dosage des polyphénols totaux	67
1.3.2. Dosage des Flavonoïdes	67
1.4. Test de DPPH	68

2. Etude <i>In Vivo</i>	69
2.1. Effet de traitement par l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. sur le taux de survie des animaux face à une intoxication massive létale au CCl ₄	69
2.2. Effet de traitement par l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. sur le poids relatif de foie	69
2.3. Effet de traitement par l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. sur les paramètres biochimiques	71
2.4. Effet du traitement par l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. sur les paramètres tissulaires du stress oxydatif chez les rattes	73
2.5. Étude histologique	74
CHAPITRE III : Discussions	
Discussions	79
Conclusion	86
Références bibliographiques	89
Annexe	106

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le foie est l'un des plus grands organes du corps humain et le site principal pour le métabolisme intense et l'excrétion. Il joue donc un rôle surprenant dans la maintenance, la performance et la régulation de l'homéostasie du corps. Il est impliqué dans presque toutes les voies biochimiques de la croissance, de la lutte contre les maladies, de l'apport de nutriments, de la fourniture d'énergie et de la reproduction (Rajib, 2009).

Toutes les substances introduites dans l'organisme et atteignant le torrent circulatoire, y transitent et y subissent des transformations plus ou moins complexes de leurs structures avant d'être excrétées. Le foie se trouve de ce fait exposé à diverses agressions qui ont parfois de graves répercussions sur tout l'organisme (Djahra, 2014).

Les lésions ou dysfonctions hépatiques sont reconnues comme un problème de santé mondial grave. Les médicaments synthétiques disponibles en clinique pour le traitement des maladies du foie, tels que l'interféron et les corticostéroïdes, sont coûteux, en particulier pour les patients dans les pays en développement. Ces médicaments peuvent également provoquer des réactions indésirables et d'autres dommages. Par conséquent, la médecine traditionnelle est importante dans le traitement des maladies du foie (Chengfang et *al.*, 2018).

L'hépatotoxicité est le fait que certaines substances dites hépatotoxiques ou hépatotoxines, sont capables d'induire la destruction des hépatocytes (cellules du foie) ou des hépatopathies (dysfonctionnements du foie). Il existe des hépatoprotecteurs qui ont pour rôle de protéger les hépatocytes. Le principal hépatoprotecteur est le citrate de bétaïne (Georges, 2006).

La plupart des hépatotoxines provoquent des dommages tissulaires par la production de radicaux libres excessifs le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est un composé pro-oxydant connu qui se transforme en un radical trichlorométhyl peroxy ($\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$) dans les tissus et cause ainsi des dommages aux lipides et aux protéines tissulaires (Shweta et *al.*, 2016).

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Meurisse et *al.*, 1999).

Les plantes médicinales sont largement utilisées pour la prévention et le traitement de diverses maladies, Ils sont aujourd'hui des sources de substances naturelles utilisées dans le traitement de nombreuses maladies (Abou et *al.*, 2015).

L'utilisation des plantes médicinales a connu un essor important dans ces derniers temps. Plusieurs facteurs justifient l'utilisation de la médecine traditionnelle et/ou alternative

par les populations dans les pays développés : la diminution du pouvoir d'achat, le coût élevé des médicaments conventionnels, la méfiance vis à vis des produits de synthèse, l'envie de consommer Bio «naturel» (Sangare, 2005).

Daphne gnidium, est une espèce qui en fait partie, connue pour son importance écologique. Elle est d'un grand intérêt dans le maintien de la biodiversité, dont sa richesse en principes actifs et en substances naturelles lui confèrent des vertus thérapeutiques, méritant d'être étudiée et valorisée et ce par la détermination de leurs caractéristiques phytochimiques, leur profil chimique et leur activités biologiques. A partir de là, on peut déduire son intérêt industriel, tout en proposant sa domestication et sa culture dans les champs des cultures industrielles (Dif, 2015).

Dans le cadre de cette étude, nous mettrons en place une contribution pour évaluer l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. par des essais *in vivo* chez les rat *Wistar*.

Ce travail est divisé en deux parties essentielles.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique et elle comporte trois chapitres :

- Le premier chapitre concernant le foie
- Le deuxième chapitre définit le stress oxydant.
- Le troisième chapitre est consacré à une description de la plante étudiée (*Daphne gnidium* L.)

La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale et est partagée en deux chapitres:

- Le premier chapitre résume les matériels et méthodes utilisées durant ce travail.
- Le deuxième chapitre est consacré aux résultats.
- Le troisième chapitre est discussion portant sur la présentation de nos résultats et leur interprétation en se basant sur ce qui était dit dans la bibliographie.

PREMIÈRE PARTIE
Synthèse bibliographique

Chapitre I
Le foie

1. Définition de foie

Le foie est l'organe viscéral le plus volumineux du corps humain. C'est une glande abdominale unique et asymétrique appartenant au système digestif de couleur rouge brun (Flament et *al.*, 1982). Le poids moyen du foie d'environ 1 500 g chez le cadavre est plus élevé chez le sujet vivant qu'il est gorgé de sang : de 2300 à 2600 g (Marc, 2012). Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, dans la zone appelée hypochondre droit, juste sous la cage thoracique et le diaphragme (Flament et *al.*, 1982) (Figure 1).

2. Formation du foie

Le foie se forme à partir du bourgeon hépatique qui prend naissance de la face antérieure du duodénum, puis se développe dans le mésogastre antérieure. La présence du foie dans le mésogastre antérieure divise celui-ci en trois parties: une partie moyenne formée par le péritoine hépatique qui enveloppe le foie; une partie antéro-supérieure qui fixe le foie au diaphragme, c'est le ligament suspenseur du foie; une partie postéro-inférieure unissant l'estomac au foie, qui constitue le petit épiploon. Il existe au-dessus du foie, un segment du mésogastre antérieure interposé entre le ligament supérieure et le petit épiploon, c'est le ligament coronaire unissant la face postérieure du foie au diaphragme (Mellal, 2010).

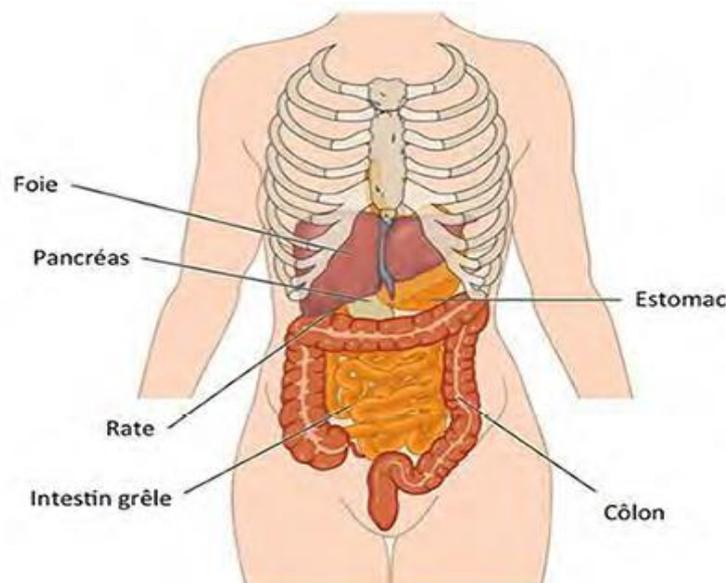


Figure 01 : L'appareil digestif humain (Oriana et *al.*, 2015).

3. Forme, couleur et consistance

La forme de foie est comparée à la moitié supérieure d'un ovoïde horizontal à grosse extrémité droite. Sa couleur est rouge brun, sa consistance est ferme, mais friable ; il est entouré d'une capsule fibreuse mince et résistante, la capsule de Glisson. Ses dimensions moyennes chez l'adulte sont de : 28 cm de longueur, 15 cm dans le sens antéro-postérieur et

8cm d'épaisseur maximale à droite. Ses dimensions sont relativement plus élevées chez le nouveau et l'enfant que chez l'adulte (Mellal, 2010).

4. Anatomie descriptive

4.1. La morphologie externe

Le foie présente à décrire 3 face: supérieure, inférieure et postérieure (Mellal, 2010).

4.1.1. La face supérieure

La Face supérieure est moulée sur le diaphragme. Large dans sa partie droite, progressivement effilée vers la gauche, elle présente à l'union de ses deux tiers droit et de son tiers gauche, l'insertion du ligament falciforme, repli péritonéal sagittal, pratiquement médian, tendu entre le foie et le diaphragme. En avant, ce ligament se prolonge entre le ligament rond et la paroi abdominale antérieure. En arrière, ses deux feuillets s'écartent progressivement pour entourer la veine cave inférieure sus-hépatique. Il sépare le foie en deux lobes : le droit volumineux et le gauche plus petit (Denis et *al.*, 2006).

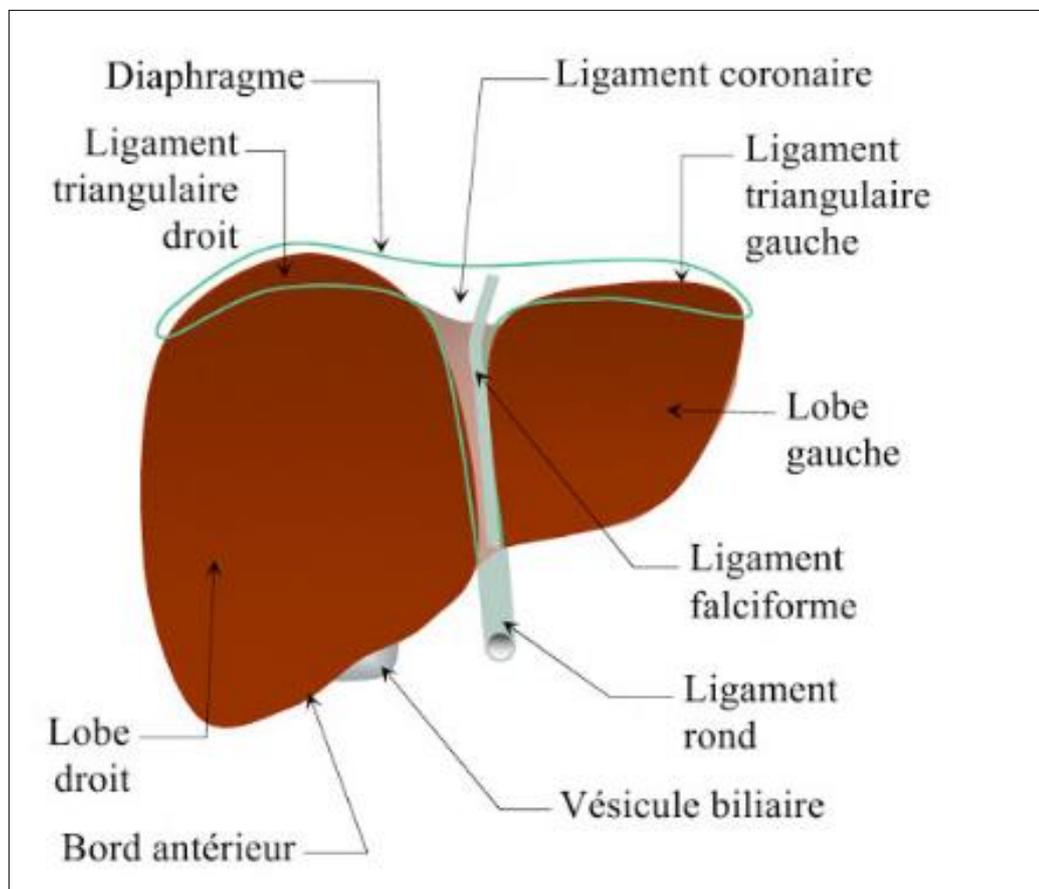


Figure 02 : face supérieure (Mellal, 2010).

4.1.2. Face inférieure

Elle est inclinée en bas et en avant, et marquée par la présence de 3 sillons: un sillon transversal et deux sillons antéro-postérieurs droit et gauche .

✓ un sillon transversal : il correspond au hile hépatique situé dans la partie moyenne; où se divisent les éléments du pédicule hépatique : veine porte; artère hépatique et voie biliaires .

✓ sillon antéro-postérieurs droit : il forme une gouttière qui s'élargit en avant où il constitue la fossette cystique ou lit de la vésicule biliaire .

✓ sillon antéro-postérieurs gauche : il est étroit et profond; et présente au niveau du bord antérieur du foie une échancrure où il se prolonge par le ligament rondou cordon fibreux de la veine ombilicale oblitérée . il se prolonge en arrière vers la face postérieure par le sillon Arantius.

ces sillons délimitent au niveau de la face inférieure 3 parties; une partie droite marquée par 3 empreintes: l'empreinte colique en avant, l'empreinte duodénale en dedans ; une partie gauche, concave, marquée par gastrique ; une partie moyenne, qui présente d'avant en arrière : le lobe carré, le hile du foie et le lobe de spigel.

Par ailleurs, la face inférieure du foie est tapissée entièrement par le péritoine viscéral sauf au niveau de la fossette cystique, où ce dernier passe en pont autour de la vésicule qui adhère directement au parenchyme hépatique. Le péritoine viscéral de la face inférieure se réfléchit au niveau di hile hépatique pour former les deux feuillets du petit épiploon (Mellal, 2010).

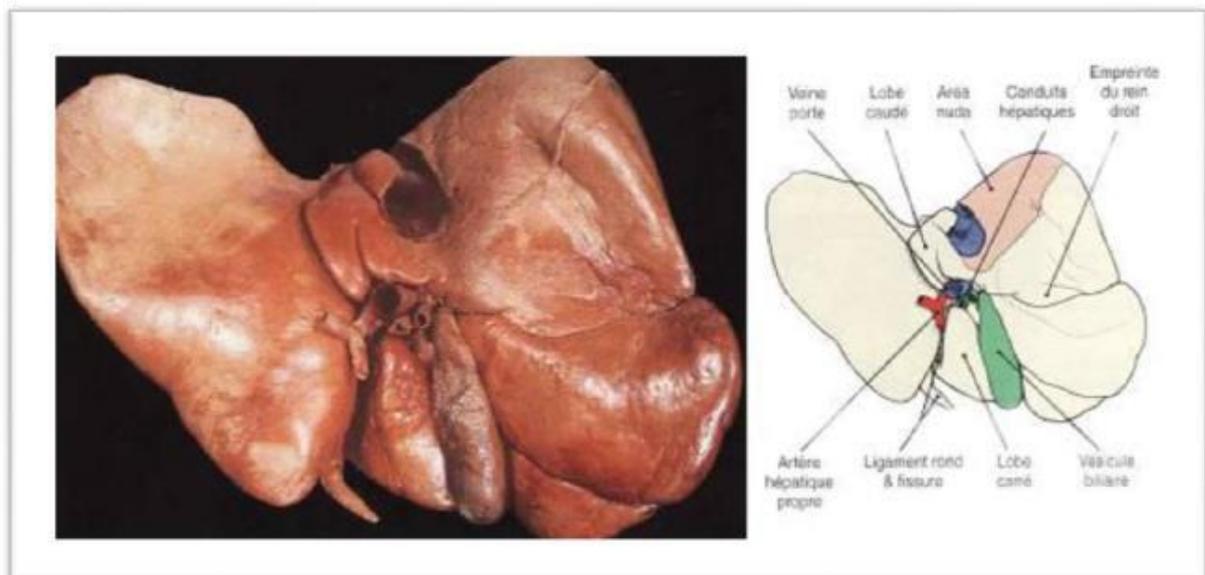


Figure 03 : Face Inférieure (Gosling et *al.*, 2003).

4.1.3. Face postérieure

Cette face est divisée en trois zones par deux sillons longitudinaux, celui de la vésicule biliaire et la fissure du ligament rond; leur extrémités supérieures sont réunies par un sillon transverse, le hile ou porte du foie. Celui-ci livre passage aux divisions de l'artère hépatique commune et de la veine porte ainsi qu'aux voies biliaires. Le ligament rond monte dans la fissure à laquelle il a donné son nom pour rejoindre la branche gauche de la veine porte. Le lobe gauche du foie recouvre le corps de l'estomac et le petit omentum.

A droite de la fissure du ligament rond se trouve un petit lobe, quadrilatère, le lobe carré, il est en rapport avec la face antérieure de la région pylorique de l'estomac et de la partie supérieure du duodénum. A droite du lobe carré, il y a, enfouie dans son sillon, la vésicule biliaire et, à droite de celle-ci se voit l'empreinte du rein droit. Le lobe droit rencontre également l'angle colique droit et la partie descendante du duodénum (Gorina et *al.*, 2003).

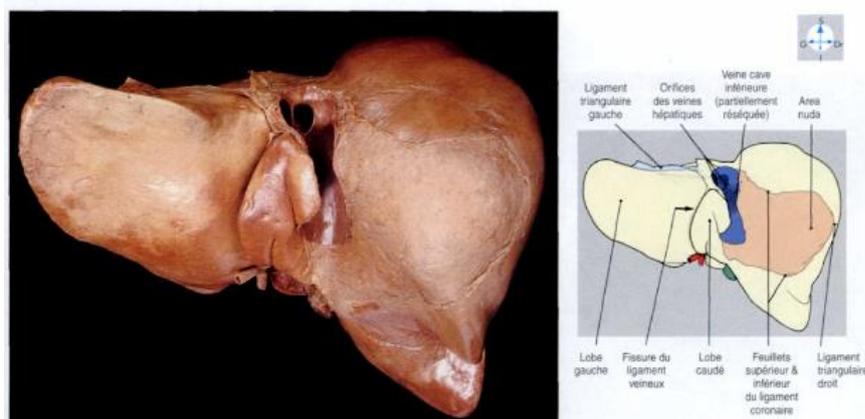


Figure 04 : Face Postérieure (Gosling et *al.*, 2003).

4.2. Vascularisation

Le foie est un des organes les plus densément vascularisés du corps humain. Il contient plus de 10% du volume sanguin total du corps, et il est traversé par 1,4 litre de sang en moyenne à chaque minute (pour un adulte).

Le foie reçoit le sang de deux vaisseaux majeurs : l'**artère hépatique** et la **veine porte**. En pénétrant dans le foie, ces vaisseaux se divisent jusqu'à former un très dense réseau de vaisseaux extrêmement fins. Le sang de l'artère hépatique apporte essentiellement l'oxygène nécessaire aux cellules du foie. Selon les personnes, l'anatomie varie.

Le foie peut posséder une à trois artères:

- ❖ l'artère hépatique moyenne, qui naît du tronc cœliaque.
- ❖ l'artère hépatique droite, qui naît de l'artère mésentérique supérieure.

- ❖ l'artère hépatique gauche, qui naît de l'artère gastrique.

Dans la majorité des cas, on ne trouve **qu'une seule artère**; l'artère hépatique moyenne, qui naît du tronc coeliaque. Cette anatomie est appelée "modale" parce qu'elle est la plus fréquente dans la population (Oriana et Denis, 2015).

4.3. Structure macroscopique

4.3.1. Lobes, segments

Le foie se divise en quatre lobes inégaux ; le lobe hépatique droit est le plus volumineux, le lobe hépatique gauche est la partie la plus étroite de l'organe. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit. Le lobe carré et le lobe caudé sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau du hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie, et que passent des canaux biliaires majeurs. Chaque lobe du foie est divisé en segments; on compte 8 segments en tout. Ces divisions anatomiques sont importantes pour les interventions chirurgicales : lorsqu'une partie du foie est endommagée et doit être extraite, la résection suit souvent ces contours anatomiques (Oriana et Denis, 2015).

4.4. Structure microscopique

4.4.1. Le lobule hépatique

La description histologique classique du foie repose sur le concept d'un regroupement des hépatocytes au sein d'unités anatomiques que sont les lobules hépatiques.

Un lobule hépatique représente une portion du parenchyme hépatique dont la forme est celle d'un prisme polyédrique aux limites constituées par le tissu conjonctif accompagnant les axes vasculaires et biliaires. Au sein d'un lobule, les lames d'hépatocytes (travées de Remak) sont disposées de façon radiaire autour d'une veine centro-lobulaire vers laquelle convergent les sinusoides pour s'y aboucher par de larges fenêtres. Les angles des lobules constituent les espaces portes ou espaces de Kieman limités par une lame parenchymateuse bordante unicellulaire, régulière et percée d'orifices. Ces espaces, de forme arrondie ou triangulaire contiennent la triade porte préterminale (une artère porte, une veine porte et un canal biliaire). Les côtés des lobules forment les septapérilobulaires dans lesquels cheminent les structures biliaires avec les branches de divisions terminales des vaisseaux portes.

Le lobule hépatique peut être divisé en trois territoires:

- ❖ le territoire centro-lobulaire correspond aux zones les plus proches de la veine centro-lobulaire;
- ❖ le territoire périlobulaire longent les limites périphériques du lobule, et
- ❖ le territoire médiolobulaire est situé entre les territoires centro et périlobulaire.

Il existe une discrète hétérogénéité entre les hépatocytes du lobule. Les cellules centrolobulaires sont plus petites et plus claires tandis que celles du territoire péri-lobulaire sont plus denses et plus basophiles).

Chez l'homme, les lobules hépatiques ne forment pas des entités nettement individualisées comme ci-dessus décrites. Les lames parenchymateuses sont en continuité d'un lobule à l'autre et les limites entre les lobules n'apparaissent que dans des situations pathologiques telles que la cirrhose. On dit de ce fait que chez l'homme les lobules constituent des unités anatomiques virtuelles (Ouattara, 1999).

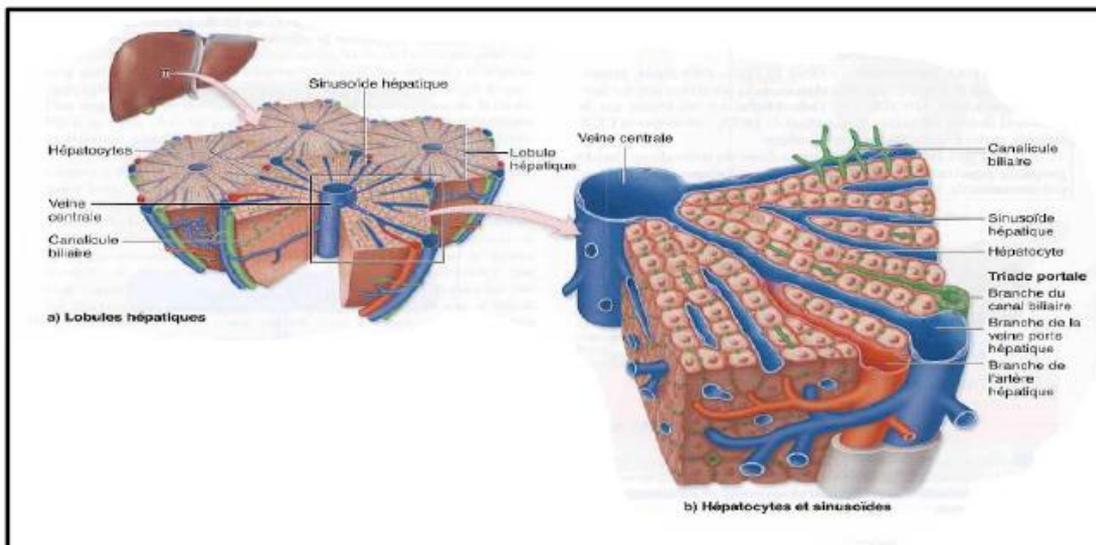


Figure 05 : Lobule hépatique (Bendjaffer et *al.*, 2015).

4.4.2. L'acinus

L'acinus est organisé autour des branches terminales des veines portes. Dans cet espace, deux zones fonctionnelles peuvent être facilement définies grâce à des repères anatomiques : la zone périportale, centrée par l'espace porte, et la zone périverneuse, centrée par la veine centrolobulaire. La zone périportale correspond approximativement à la zone centrale de l'acinus, tandis que la zone périverneuse correspond approximativement à la zone périphérique de l'acinus (Marc, 2012).

4.4.3. les sinusoiïdes hépatiques

Les sinusoiïdes épousent complètement la forme des espaces ménagés entre les lames de cellules parenchymateuses. De ce fait ils ont un calibre plus large et plus irrégulier que celui des capillaires ordinaires. Leur paroi discontinue dépourvue de lame basale est faite d'une seule couche de cellules endothéliales soutenue par une lame réticulinique fenestrée. La paroi sinusoiïdale comprend trois types de cellules :

- ❖ les cellules endothéliales,

- ❖ les cellules de Kupffer, véritables cellules macrophagiques, les cellules périsinusoïdales ou cellules de Ito ou "fat storing cells".

L'espace de Disse correspond à un espace quasi virtuel situé entre la lame endothéliale et la face sinusoidale de l'hépatocyte (Ouattara, 1999).

4.4.4. Les cellules du foie

- ❖ Les cellules parenchymateuses ou hépatocytes
- ❖ Les cellules endothéliales
- ❖ Les cellules de Kupffer
- ❖ Les cellules étoilées (ou de Ito)
- ❖ Les cellules «natural killer» (ou pit cells)
- ❖ Les fibroblastes

4.4.4.1. La cellule hépatique (hépatocyte)

Elle a généralement la forme d'un polyèdre à 6 ou 8 face, mais peut éventuellement en présenter davantage. Du fait de l'organisation des lames hépatiques elle présente deux faces opposées bordées par un capillaire, ce sont les pôles vasculaires, les autres faces sont appliquées contre celles des cellules voisines et creusées d'une gouttière pour le canalicule biliaire. Elle possède habituellement un noyau arrondi, volumineux, dont la taille peut varier d'une cellule à l'autre. Cependant, les cellules binuclées peuvent se trouver fréquemment (25% dans certaines espèces). Les mitoses sont exceptionnelles. L'enveloppe nucléaire est régulière et possède une double membrane comme les autres cellules; la chromatine est filamenteuse ou granuleuse; on rencontre près des masses de chromatine des granulations de 30 nm de diamètre environ qui semblent contenir des acides nucléiques; les nucléoles sont constitués de filaments fins et de grains denses. On trouve dans le cytoplasme un certain nombre des organites (Poirier et *al.*, 1980).

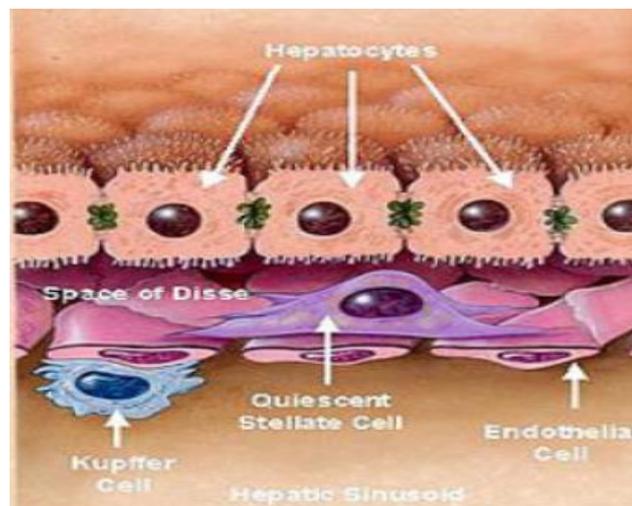


Figure 06 : les cellules de foie (Gosling et *al.*, 2003).

4.5. Canaux biliaires

Les cellules du foie (appelées hépatocytes) produisent la bile, un liquide jaune-vert qui aide le corps à digérer les graisses. La bile circule à travers une série de canaux (tubes) dans le foie jusqu'à ce qu'elle atteigne l'intestin grêle ou la vésicule biliaire, où elle est emmagasinée. (SCC, 2015).

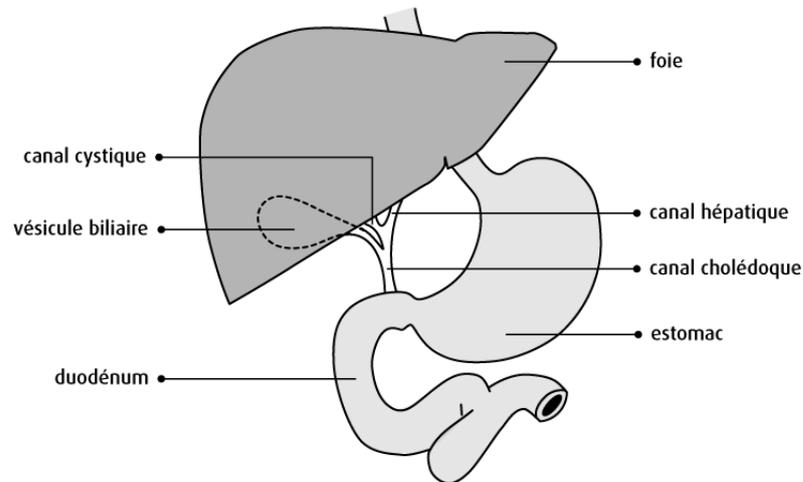


Figure 07 : Canaux biliaires (SCC, 2015).

Les **canaux hépatiques** reçoivent la bile du foie. Deux canaux hépatiques (droit et gauche) partent du foie et fusionnent pour former le canal hépatique commun.

Le **canal cystique** part de la vésicule biliaire et fusionne avec le canal hépatique commun pour former le canal cholédoque.

Le **canal cholédoque** évacue la bile dans le duodénum (première partie de l'intestin grêle).

Lorsqu'il y a de la nourriture dans l'intestin grêle, la bile produite par le foie circule directement dans le canal hépatique commun, puis le canal cholédoque, avant d'être évacuée dans le duodénum pour aider à la digestion.

Lorsque l'intestin grêle est vide, la bile s'accumule dans le canal cholédoque jusqu'à ce qu'elle remonte dans le canal cystique, puis dans la vésicule biliaire, où elle sera entreposée jusqu'à ce que le corps en ait besoin (SCC, 2015).

5. Fonctions du foie

5.1. Fonction sécrétoire exocrine (la bile)

La sécrétion exocrine de la cellule hépatique, se déverse dans l'intestin après avoir été drainée par les voies biliaires intra et extra-hépatique. Faiblement alcaline, elle contient principalement du cholestérol, des lecithine, des pigments et sels biliaires. Les pigments biliaires sont principalement de la bilirubine et de la biliverdine, produits de dégradation métabolique de l'hémoglobine provenant des globules rouges morts. La bilirubine est

conjuguée par la glycuco-tansférase; la conjugaison rend le produit soluble dans l'eau. Les acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol. Une partie en est éliminée par les selles, le reste est réabsorbé par la muqueuse de l'iléon distal et revient au foie par la veine-porte; c'est la cycle entéro-hépatique (Poirier et *al.*, 1980).

5.2. fonction antitoxique

Certains éléments qui arrivent au foie sont toxiques pour l'organisme : le rôle du foie est de transformer (dégradation) ces éléments en produits non-toxiques.

Les produits non toxiques qui se dissolvent dans graisses (lipo-solubles) sont ensuite reversés dans la bile, bile qui sera amenée dans l'intestin, et éliminée dans les selles.

Les produits qui se dissolvent dans l'eau (hydro-solubles) sont reversés dans le sang, qui les mène jusqu'aux reins : ils sont éliminés par les urines.

Ainsi, l'ammoniaque, qui est naturellement produite par le colon (fin du tube digestif), possède une forte toxicité neurologique. Menée au foie par la veine porte, l'ammoniaque est transformée par les cellules du foie en urée, puis l'urée est apportée aux reins et sortie par les urines (Amfe, 2015).

5.3. fonction métabolique

le foie étant impliqué dans la biosynthèse, le stockage, la transformation et la dégradation de composés organiques. L'approvisionnement constant de l'organisme, en substrats énergétiques et précurseurs de biosynthèse est également assuré.

Il possède ainsi, grâce aux hépatocytes, un rôle dans la synthèse de l'urée, de l'albumine et intervient dans le métabolisme glucidique (stockage du glycogène, néoglucogénèse) et donc la glycémie, ainsi que dans les métabolismes lipidique (β -oxydation des acides gras, synthèse de cholestérol et de phospholipides, lipogénèse) et protéique (transformation des acides aminés, formation des protéines plasmatiques sauf les immunoglobulines, catabolisme de l'ammoniaque en urée). Il permet le stockage en particulier des vitamines A, D et B12 mais aussi du fer du fait de la présence d'apoferritine dans les cellules hépatiques (Gandillet, 2004).

6. Les atteintes hépatiques

6 .1. Les hépatites

6 .1.1. Définition

L'hépatite est une atteinte du foie caractérisée par une phase inflammatoire pouvant être aiguë ou chronique. Selon la cause de cette inflammation, on distingue deux grandes catégories d'hépatites (Endougou, 2015) :

- Les hépatites virales, causées par une infection par un virus. Cinq virus d'hépatite ont ainsi été identifiés chez l'Homme : le virus de l'hépatite A (VHA), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'hépatite D (VHD) et le virus de l'hépatite E (VHE). Un autre virus transmissible par le sang a également été identifié dans certains cas d'hépatite chronique et est désigné GB virus C ou virus de l'hépatite G (VHG). L'ensemble des connaissances montre cependant que ce HGV ne se réplique pas dans le foie et n'entraîne pas d'hépatite (Benhamou, 2002).

- Les hépatites non virales, principalement provoquées par les produits ou agents toxiques pour le foie. Elles peuvent être dues aux parasites (les schistosomes et plus principalement leurs œufs...), aux médicaments (paracétamol...), aux poisons ou à une consommation excessive d'alcool. On peut également y inclure l'hépatite auto-immune qui est une hépatite inflammatoire chronique d'origine obscure se caractérisant par la production d'auto-anticorps (Benhamou, 2002).

6.1.2. Les hépatites virales

6.1.2.1. L'infection aigüe

Après avoir été infecté par HBV, la période d'incubation accompagnée de la montée virémique dure entre 45 et 180 jours, avant l'apparition des symptômes cliniques, et correspond à la première phase de l'infection appelée hépatite aigüe. Dans 90% des cas, les patients évolueront vers la guérison. L'intensité des symptômes d'une infection aigüe varie d'un individu à l'autre et dans 75% des cas d'exposition au virus, l'infection aigüe est asymptomatique et n'est, par conséquent, pas diagnostiquée. Dans les autres cas, les patients développeront des symptômes non-spécifiques de type nausées, asthénie, anorexie, fièvre, arthralgie et urticaire. Le taux des alanineaminotransaminases (ALAT, enzymes prédominantes dans le foie) est également très élevé (jusqu'à 30 fois supérieure à la normale) en raison d'une forte inflammation du foie, suivie d'une cytolyse hépatique. Le virus HBV n'est pas cytopathique *per se*. Ainsi, les cas symptomatiques observés sont la résultante d'une réponse immune inadaptée médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, la lyse des hépatocytes infectés par les lymphocytes TCD8+ est le mécanisme majeur permettant le contrôle de l'infection mais engendrant également les dommages hépatiques. Dans les cas d'hépatite fulminante, survenant dans 1% des cas d'hépatite aigüe, on observe une nécrose du parenchyme hépatique à l'origine d'insuffisance hépatocellulaire. Ces cas sont le plus souvent rencontrés lors de coinfection avec d'autres virus hépatotropes tel le virus de l'hépatite delta (HDV) (Gruffaz, 2013).

6.1.2.2. Hépatites virales chroniques

L'hépatite virale chronique est définie biologiquement par la persistance d'une élévation du taux des transaminases plus de 6 mois après une hépatite virale aiguë. Cependant les épisodes aigus sont le plus souvent asymptomatiques. L'hépatite virale chronique est en général une découverte tardive et fortuite. Elle est définie histologiquement par l'existence de lésions hépatiques associant une nécrose hépatocytaire et un infiltrat inflammatoire. Les hépatites chroniques actives peuvent évoluer vers la cirrhose. Les cirrhoses dues aux hépatites chroniques virales représentent un risque majeur de survenue d'un carcinome hépatocellulaire. Le diagnostic précoce des hépatites virales chroniques est important dans l'issue du traitement.

Au total, le diagnostic d'hépatite chronique virale est suspecté sur la constatation d'une sérologie virale positive associée à une élévation prolongée du taux des transaminases. Le diagnostic ne peut être confirmé que par la biopsie hépatique qui doit être systématique devant une élévation des transaminases persistant plus de 6 mois, associée à un marqueur viral de réplication (Sangare, 2005).

6.1.3. Les hépatites non virales

6.1.3.1. Les hépatites auto-immunes (HAI)

sont un groupe sans doute hétérogène de maladies de cause (s) inconnue (s), caractérisées par des lésions hépatocytaires nécrotico-inflammatoires, la présence d'auto-anticorps particuliers et une grande sensibilité au traitement corticoïde. Il est important pour le clinicien de savoir en faire le diagnostic car l'HAI est une maladie dont l'évolution spontanée est potentiellement grave (cirrhose, décès ou transplantation hépatique) alors que l'évolution sous traitement est habituellement très favorable (Lemoine et *al.*, 2016).

6.1.3.2. Hépatite toxique chimique

Les hydrocarbures halogénés (chloroforme, trichloroéthylène, perchloroéthylène. . .) sont pourvoyeurs d'hépatotoxicité. Le plus emblématique d'entre eux est le tétrachlorure de carbone (CCl_4), autrefois utilisé en sniff par certains toxicomanes. La molécule sniffée est transformée en métabolites hautement toxiques, inductrices de radicaux libres et d'adduits (Figure). Le CCl_4 est à l'origine d'une nécrose hépatocytaire centro-lobulaire accompagnée d'ictère et de nécrose tubulaire rénale, généralement précédée de manifestations transitoires neurologiques (vertiges, troubles visuels, confusion) et digestives (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées). La *N*-acétylcystéine a été proposée avec efficacité dans cette intoxication. Les expositions chroniques aux solvants sont à l'origine de cirrhose micro et macronodulaire.

Le phosphore blanc contenu dans certains raticides ou poudres de détonateur est fréquemment utilisé dans les pays du tiers monde au cours de tentatives de suicide. Après une phase initiale de troubles digestifs, il induit une hépatite stéatosique médiolobulaire associée à une nécrose tubulaire rénale et à une psychose toxique. L'ictère est plus marquée que pour le CCl_4 , mais les transaminases moins élevées. Enfin, certains produits industriels ou domestiques (fongicides, insecticides ou raticides) contenant des composés inorganiques de l'arsenic, du thallium ou des borates sont à l'origine d'atteintes hépatiques toxiques graves de mauvais pronostic. L'exposition chronique à ces agents peut être à l'origine d'évolution vers une cirrhose (Mégarbane et *al.*, 2007).

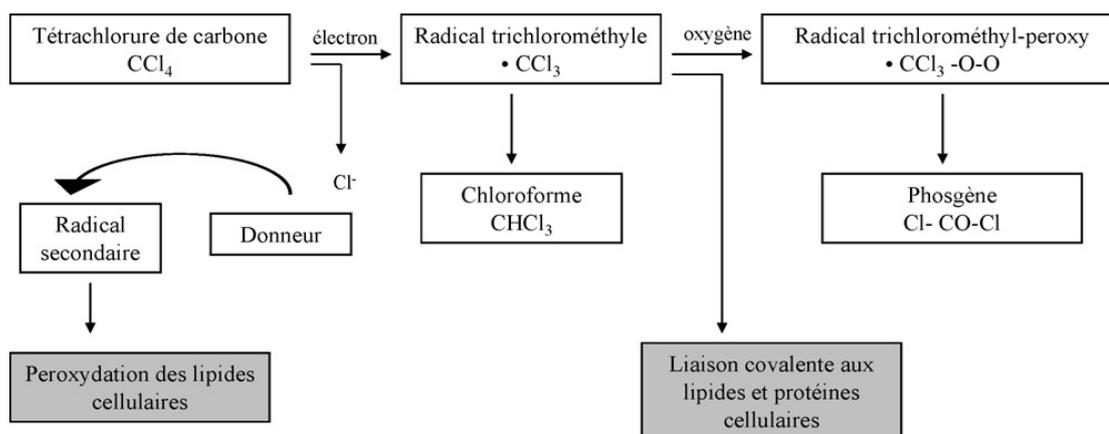


Figure 08 : Activation métabolique du tétrachlorure de carbone à l'origine de son hépatotoxicité (Mégarbane et *al.*, 2007).

6.1.3.3. L'hépatotoxicité médicamenteuse

Les médicaments sont la cause d'une grande variété d'atteintes hépatiques.

Les hépatites aiguës en sont la principale manifestation, représentant plus de 90 % des cas. Plus rarement, il s'agit d'atteintes chroniques pouvant aboutir à une cirrhose.

a. Mécanismes d'hépatotoxicité médicamenteuse et facteurs favorisants

Les médicaments induisent des lésions hépatiques par trois mécanismes principaux. Le mécanisme le plus fréquent est la formation de métabolites réactifs (Berson, 2005). La toxicité est souvent due à la transformation des médicaments en métabolites réactifs ou radicaux libres toxiques, surtout par les cytochromes P450 hépatiques (CYP). Habituellement, ces métabolites sont détoxifiés par divers systèmes de protection, en particulier la conjugaison au glutathion et les époxydes hydrolases. Quand ces mécanismes sont insuffisants, les métabolites toxiques entraînent des lésions moléculaires et cellulaires aboutissant à une atteinte mitochondriale, une par un mécanisme implique l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM) entraînant la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose et des réactions immunotoxicologiques. La stéatohépatite microvésiculaire est liée à d'autres

atteintes mitochondriales (cyclines, antirétroviraux) et la stéatose macrovacuolaire a un défaut de transport des lipides (antirétroviraux). L'hépatotoxicité médicamenteuse est favorisée par divers facteurs (1, 2):

- ✓ la dénutrition diminuant la détoxification (baisse du glutathion) [isoniazide].
- ✓ l'induction enzymatique augmentant la transformation d'un médicament en métabolite toxique (rifampicine-isoniazide).
- ✓ des facteurs génétiques métaboliques et les systèmes de contrôle immunitaires comme les allèles HLA (amoxicilline-acide clavulanique, abacavir).

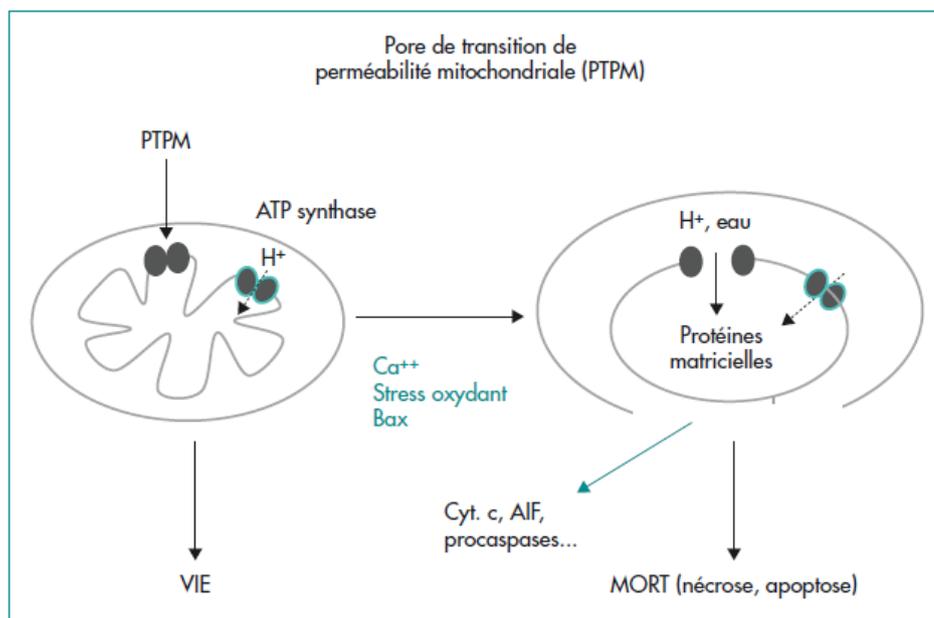


Figure 09 : L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM)

(Berson, 2005).

b. énergétiques mitochondriales

✓ Inhibition première de la β -oxydation

Lorsque la β -oxydation est inhibée, les acides gras s'accumulent dans le cytosol sous la forme de triglycérides émulsifiés provoquant une stéatose typiquement microvésiculaire qui n'empêche pas le maintien du noyau au centre de la cellule (Fromenty et Pessayre, 1995). Lorsque l'inhibition de la β -oxydation devient chronique, la fusion des microvésicules de stéatose induit une stéatose macrovacuolaire, repoussant le noyau à la périphérie de la cellule (Fromenty et Pessayre, 1995). En plus de la stéatose, l'inhibition première de la β -oxydation provoque une diminution secondaire de la production d'énergie. En période de jeûne, les acides gras constituent la principale réserve d'énergie de la cellule (Saudubray et Martin, 1999). Chez les sujets dont la β -oxydation est inhibée, le jeûne prolongé provoque une hypoglycémie sévère (Saudubray et Martin, 1999) ainsi qu'un afflux d'acides gras libres dans le foie (provenant de la lipolyse périphérique qui n'est pas inhibée) qui favorisent la stéatose

et dont l'effet découplant respiratoire amplifie le déficit énergétique. L'incapacité du foie à produire de l'énergie provoque une atteinte fonctionnelle de plusieurs organes expliquant l'insuffisance hépatocellulaire (parfois associée à une insuffisance rénale et une pancréatite) et l'atteinte cérébrale sévère entraînant un coma et la mort du patient (Fromenty et Pessayre, 1995).

✓ Inhibition première de la chaîne respiratoire

L'inhibition première de la chaîne respiratoire provoque un déficit énergétique dont la sévérité provoque soit un dysfonctionnement cellulaire soit la mort cellulaire (Fromenty et Pessayre, 1995). L'inhibition du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire provoque aussi une réduction accrue des complexes respiratoires situés en amont du blocage, à l'origine d'une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène et d'un stress oxydant majorant les lésions cellulaires. Enfin, l'inhibition de la chaîne respiratoire empêche la réoxydation du NADH et du FADH₂ produits par la β -oxydation qui est de ce fait inhibée (Fromenty et Pessayre, 1995).

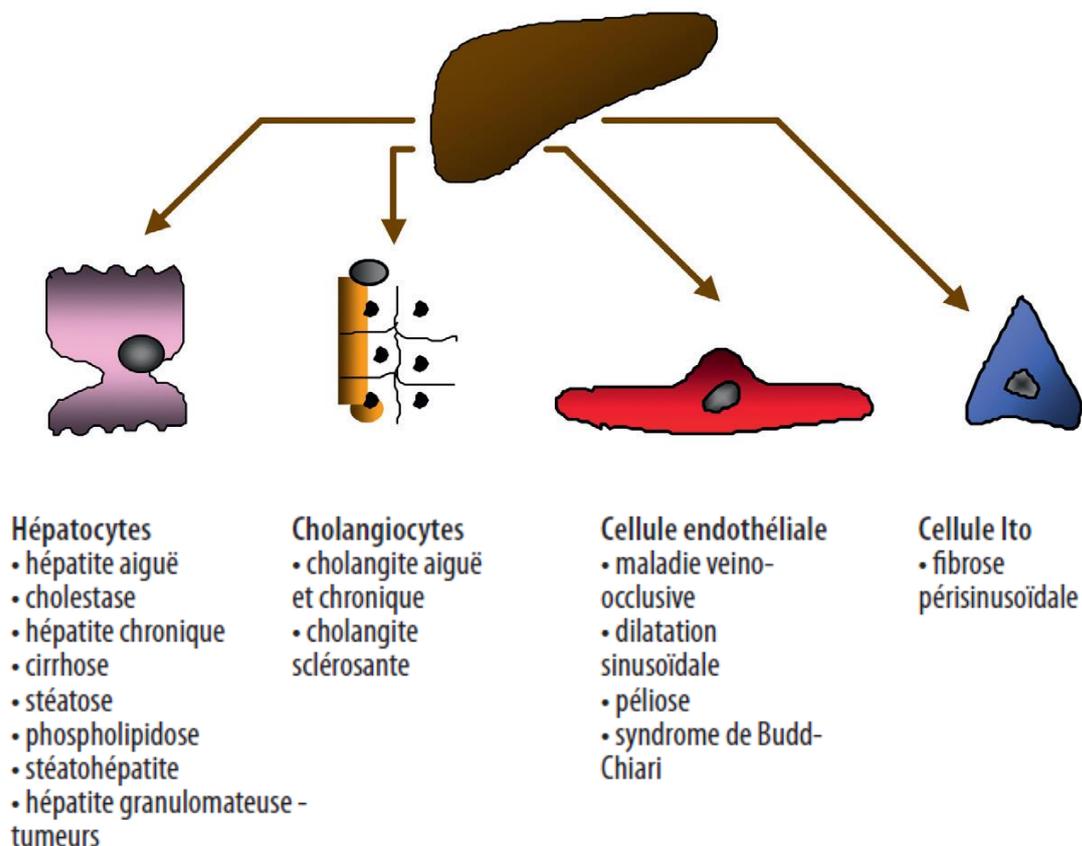


Figure 10 : Cellules impliquées dans l'hépatotoxicité des médicaments (Larrey, 2013).

6.2. Les lésions hépatiques

6.2.1. Nécrose

La nécrose (mode de mort cellulaire régulée) est un processus dégénératif qui intervient dans des cellules ayant subi des dommages physiques, chimiques ou osmotiques. La nécrose

hépatique implique la mort des hépatocytes, elle peut être focale (Centro-lobulaire médiane, ou périphérique) ou généralisée : c'est la plupart du temps une lésion aiguë (mort cellulaire ou tissulaire) (Frank, 1992).

6.2.2. Stéatose

Cela correspond à une accumulation de lipides dans les hépatocytes lorsque la quantité de graisse métabolisable par l'organisme est dépassée. Le diagnostic est posé lorsque les lipides représentent 5 à 10% du foie. Une stéatose simple est généralement une atteinte bénigne ne causant généralement pas de lésions hépatiques, et étant asymptomatique en dehors d'une hépatomégalie.

Cependant, le foie devient plus susceptible à des atteintes ultérieures.

Ses causes principales sont l'obésité, le diabète, les carences protéiques, une hyperlipidémie, des prédispositions génétiques...(Haïne, 2005).

6.2.3. La fibrose

La fibrose hépatique est définie par l'accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique. C'est la complication majeure de toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, parasitaire, biliaire ou autre. Son expression ultime est la cirrhose, processus irréversible, cause de morbidité et de mortalité importante (Rosenbaum et *al.*, 1994).

6.2.3.1. Mécanismes de la fibrose hépatique

La fibrose est caractérisée par l'accumulation de constituants normaux de la matrice extracellulaire dans le foie et résulte d'un déséquilibre entre leur synthèse, leur dépôt et leur dégradation. La matrice extracellulaire (MEC) hépatique représente chez l'homme moins de 3 % du poids du foie normal. Elle est localisée dans la capsule, les espaces portes où elle s'organise en matrice interstitielle et en lame basale autour des vaisseaux et des canaux biliaires. Elle est également présente dans la paroi des veines centro-lobulaires et dans l'espace de Disse où elle ne forme pas une lame basale continue. Cette matrice est constituée d'un assemblage complexe de macromolécules réparties en cinq groupes : les collagènes, les glycoprotéines, l'élastine, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (Bourlière, 2000).

6.2.4. Cirrhose

Lorsque le foie est endommagé, des cicatrices apparaissent sur l'organe pendant qu'il tente de réparer les dommages. Les premières phases de la cicatrisation s'appellent la fibrose. On dit qu'une personne a la cirrhose lorsque son foie est atteint de dommages ou de cicatrices graves et nombreux. La cicatrisation peut empêcher le foie de fonctionner correctement.

La cirrhose est une maladie qui évolue très lentement. Elle peut mettre jusqu'à 30 ans à se développer. Le temps que la cirrhose met à se manifester dépend de quelques facteurs, y compris la cause de la cirrhose, la santé générale de la personne touchée, son mode de vie et la génétique (Hodoul, 2012).

6.2.5. Le carcinome hépatocellulaire

(CHC) est la tumeur hépatique primitive la plus fréquente et le sixième cancer le plus fréquent. En 2001 elle représentait 90% des tumeurs hépatiques primitives et 7% de l'ensemble des cancers ; en 2008 son incidence était de 65 000 cas et sa mortalité de 60 240 cas en Europe. Elle se développe habituellement sur une cirrhose (75 à 80 % des cas), plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique, exceptionnellement sur un foie sain. Les étiologies principales sont les maladies de surcharge (déficit en alpha-1-antitrypsine, hémochromatose, stéatose hépatique non alcoolique, maladie de Wilson), les intoxications chroniques (alcool, aflatoxine), les hépatites virales B ou C chroniques, les hépatites auto-immunes. Histologiquement, il existe un continuum histologique entre le nodule régénératif, le nodule dysplasique et le CHC. Le **nodule régénératif** est constitué d'hépatocytes normaux, réponse bénigne à une altération de la perfusion. Le **nodule dysplasique** de bas grade puis de haut grade présente des atypies cytologiques sans critères stricts de malignité ou d'invasivité. Le **CHC bien différencié** est constitué d'hépatocytes anormaux avec critères de malignité, non fonctionnels, organisés en structures pseudo-acineuses, avec présence d'amas biliaires. Il existe des formes nodulaires (85-90%) ou infiltratives (10-15%). La vascularisation évolue également au cours de la transformation, du nodule régénératif de vascularisation à prédominance portale, jusqu'au CHC de vascularisation exclusivement artérielle par néoangiogenèse tumorale (Hodoul, 2012).

7. l'exploration de la fonction hépatique

7.1. l'exploration biologique hépatique

7.1.1. les transaminases

7.1.1.1. L'alanine aminotransférase (ALAT, GPT)

est une enzyme qui se trouve majoritairement dans le foie. Une élévation de son taux sérique signifie souvent une atteinte hépatocellulaire. Ce test est beaucoup plus spécifique d'une lésion hépatique que l'ASAT. L'importance de l'augmentation est généralement classée comme suit: légère, intermédiaire et élevée (Nicole et *al.*, 2009).

7.1.1.2. L'aspartateaminotransférase (ASAT, GOT)

se trouve non seulement dans le foie mais également dans d'autres organes : le muscle cardiaque, les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, le pancréas, les poumons, les leucocytes et les érythrocytes. Elle est donc peu spécifique. Lors d'abus d'alcool, on observe un rapport ASAT/ALAT ≥ 2 contrairement aux autres causes d'augmentation des transaminases qui provoquent souvent un rapport ASAT/ALAT ≤ 2 (Nicole et al., 2009).

les transaminases ASAT et ALAT reflètent la cytolyse hépatique. En préopératoire, leur augmentation peut être variable en fonction de l'étiologie, sans forcément avoir une valeur péjorative. Elles ont toutefois un intérêt pronostique dans les chirurgies sur foie cirrhotique (Farges et al., 1999).

7.1.2. La γ -glutamyltransférase (γ -GT)

Les Gamma GT sont des enzymes provenant de plusieurs organes (foie, pancréas, rein) et participant au transfert des acides aminés entre les cellules. La présence des gamma GT dans le sang est le reflet d'un processus enzymatique (mécanisme utilisant des enzymes) de l'organisme.

Le dosage sanguin des gamma-GT permet d'évaluer l'activité hépatique. Le taux de gamma GT dans le sang s'élève à l'occasion de nombreuses maladies du foie, plus particulièrement l'alcoolisme chronique, les hépatites virales, la cirrhose, la cholestase (obstruction des voies biliaires) (Bruno, 2016).

7.1.3. La phosphatase alcaline (PAL)

Se trouve majoritairement dans le foie et les os. Tout comme la γ -GT, elle est un marqueur de cholestase. Elle est physiologiquement élevée dans le troisième trimestre de la grossesse et chez les adolescents en croissance. Le dosage concomitant de la γ -GT permet de déterminer l'origine de l'élévation de la PAL : si celle-ci est normale, l'origine est osseuse, sinon elle est hépatique.

On distingue entre une cholestase intra- et extra-hépatique. En général, une cholestase extra hépatique s'accompagne de voies biliaires dilatées à l'ultrason hépatique (Nicole et al., 2009).

7.1.4. Bilirubine

La bilirubine est un pigment jaune provenant de la dégradation de l'hémoglobine, et dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère (ou "jaunisse"). La bilirubine est dite "libre" jusqu'à son passage dans le foie, et "conjuguée" ensuite (on parle de "conjugaison hépatique"). Le taux de "bilirubine totale" est la somme des taux de bilirubine libre et conjuguée.

Les causes d'élévation du taux de bilirubine sanguine sont variées : un rétrécissement sur les voies biliaires (calcul, tumeur des voies biliaires ou du pancréas ...), les maladies du foie (hépatite, cirrhose ...), une destruction anormalement importante des globules rouges (hémolyse) (Bruno, 2016).

7.2. Etude histologique

Elle est réalisée à partir de pièces issues de ponctions-biopsies-hépatiques, de tranches chirurgicales et de prélèvements nécroscopiques. L'histologie de la glande hépatique demeure une importante méthode d'investigation pour le diagnostic des hépatopathies malgré le développement et la précision des méthodes biologiques et physiques. Il est d'ailleurs conseillé que l'utilisation de termes consacrés tels qu'hépatite, nécrose hépatique, hépatite chronique ou cirrhose ne doit pas être faite en l'absence de données histologiques, même si des anomalies sont observées dans les tests biochimiques (Ouattara, 1999).

8. Tétrachlorure de carbone CCl₄

Le tétrachlorure de carbone est un liquide transparent, incolore et volatil avec une odeur douce caractéristique. Il est miscible avec la plupart des solvants aliphatiques et possède à son tour des propriétés de solvant. La solubilité dans l'eau est faible. Le tétrachlorure de carbone est ininflammable et reste stable en présence d'air et de lumière. Sa décomposition peut produire du phosgène, du dioxyde de carbone et de l'acide chlorhydrique. La source de tétrachlorure de carbone dans l'environnement est probablement presque exclusivement d'origine anthropique. La plus grande partie du tétrachlorure de carbone produit est utilisée dans la fabrication de chlorofluorocarbones et d'autres hydrocarbures chlorés (Fouw, 2004).

Le tétrachlorure de carbone utilisé pour l'induction de l'intoxication hépatique, il provient des laboratoires Sigma Aldrich. C'est un alcane utilisé comme solvant et/ou réactif dans les laboratoires et les industries chimiques. Le tétrachlorure de carbone est le plus communément utilisé d'une part et d'autre part, il induit une pathologie rencontrée en clinique. Il manifeste sa toxicité sur l'organisme animal en provoquant d'importantes lésions sur plusieurs organes.

Sur le foie, le CCl₄ provoque des nécroses qui à long terme peuvent évoluer en cirrhoses hépatiques. Cette cytotoxicité du CCl₄ est obligatoire et prévisible chez tous les individus d'une même espèce animale. Elle est de type indirect, car c'est une toxicité qui se manifeste après la conversion hépatique du CCl₄ en des métabolites réactifs toxiques (Djahra, 2014).

8.1. Caractéristiques physiques et chimiques

Tableau 01 : Caractéristiques physiques et chimiques (Mat inc. 2014 ; VWR, 2005).

Solvant	Halogéné
Nom du produit	tétrachlorure de Carbone
Numéro CAS	56-23-5
Numéro CE	200-262-8
Index CE	602-008-00-5
Formule moléculaire	CCl ₄ = 153.82 g/mol
État physique	Liquide
Apparence et odeur	Liquide incolore. Odeur de l'éther
Limite de détection olfactive	50.0 ppm
Densité	1.594
Point de fusion	-23°C
Point d'ébullition	76 - 77°C
Pression de la vapeur	91.0 mm ³ 20°C
Densité spécifique de la vapeur	5.3
Taux d'évaporation	12.08
Coefficient H2O / Huile	0.0015
Pourcentage de volatilité	100
Solubilité	Pratiquement insoluble dans l'eau (0.05%). Miscible avec l'alcool, le benzène, le chloroforme et l'éther.

8.2. Effets de tétrachlorure de carbone sur la santé

Le tétrachlorure de carbone est classifié comme possiblement cancérigène pour les humains en raison des données inadéquates sur sa cancérigénicité chez l'humain, mais des preuves suffisantes chez les animaux. Toutefois, les études sur le cancer existantes comportent des lacunes majeures. D'après des études chez l'animal, le pouvoir cancérigène du tétrachlorure de carbone découle de ses effets hépatotoxiques, d'où l'existence possible d'un seuil. Par conséquent, la CMA a été établie en fonction de l'hépatotoxicité, en

incorporant également un facteur d'incertitude supplémentaire de 10 pour tenir compte du manque d'étude appropriée sur les effets chroniques et de données probantes concernant le mode d'action pour la cancérogénicité (Santé Canada, 2011).

8.3. Les effets toxiques du tétrachlorure de carbone

Le foie est particulièrement sensible au tétrachlorure de carbone puisqu'il contient une grande quantité d'enzymes qui modifient la forme du produit chimique. Certains des produits de dégradation peuvent attaquer les protéines cellulaires, interférant avec les fonctions des cellules hépatiques. Les produits qui attaquent les membranes cellulaires peuvent entraîner la mort des cellules. Dans les cas bénins, le foie devient enflé et tendre, et la graisse s'accumule à l'intérieur de l'organe. Dans les cas graves, les cellules hépatiques peuvent être endommagées ou détruites, entraînant une diminution de la fonction hépatique. De tels effets sont généralement réversibles si l'exposition n'est pas trop élevée ou trop longue. Le tétrachlorure de carbone a également des effets sur d'autres tissus du corps, mais ceux-ci ne sont généralement pas aussi communs ou importants que les effets sur le foie, les reins et le cerveau (Obaid, 2005).

CCl_4 induit une grande variété d'événements toxiques dans le foie. L'effet de CCl_4 commence par une déshalogénéation réductrice par le cytochrome P450, produisant le radical trichlorométhyle CCl_3^\cdot (Mc Cay et al., 1984). La liaison covalente de ces métabolites aux protéines et aux lipides entraîne des changements dans la structure et la fonction des cellules. De même, le radical peut se lier à l'ADN, causant des dommages avec le résultat final du cancer, mais ces événements ne sont pas liés à la stéatose hépatique. En présence d'oxygène, le radical trichlorométhyle se transforme rapidement en radical trichlorométhylperoxy ($\text{CCl}_3\text{OO}^\cdot$). Lorsque ce radical extrait un atome d'hydrogène d'un acide gras insaturé, il se forme des radicaux centrés sur le carbone qui initient une chaîne de peroxydation et produisent des aldéhydes réactifs, endommageant les lipides et, par conséquent, la fonction membranaire. La vitamine E ou d'autres piègeurs de radicaux peuvent interrompre la propagation du processus de peroxydation (Meinrad, 2000).

De tous ces événements, les réactions de peroxydation lipidique sont celles qui interviennent le plus dans les processus de la mort des hépatocytes en cas d'intoxication aiguë au CCl_4 . Elles s'observent immédiatement après la prise du toxique et se caractérisent par une dilatation du réticulum endoplasmique et un gonflement des mitochondries (Stachura et al., 1981).

Ce radical initie la chaîne des réactions de peroxydation lipidique. Il en résulte une destruction d'acides gras poly-insaturés, en particulier ceux associés aux phospholipides.

La perméabilité des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques est altérée, il en résulte un trouble de l'homéostasie calcique. Parmi les produits de dégradation des acides gras on trouve des aldéhydes comme la 4-hydroxynonéal, qui inhibe de nombreuses enzymes et se fixe sur des groupements fonctionnels de protéines (Bisson et *al.*, 2005).

Tableau 02 : Caractéristiques de la molécule de tétrachlorure de carbone (Bisson et *al.*, 2005).

Formule brute	Formule développée	Poids moléculaire (g)	Synonymes
CCl ₄	$ \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array} $	82	perchlorométhane tétrachlorométhane carbon chloride carbon tetrachloride methane tetrachloride methane tetrachloro- perchloromethane tetrachloromethane tetrachlorocarbon

Chapitre II
Stress oxydatif

1. Systèmes oxydant

1.1. Définition stress oxydatif

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes (Camille et Mireille, 2011). Il peut avoir diverses origines : mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, habitudes de vie non adéquates (tabagisme, consommation d'alcool), prise de la pilule contraceptive et de médicaments, exercice physique intense ou mal géré, exposition inconsidérée à de grandes sources productrices d'ERO (soleil, irradiations), interventions chirurgicales (transplantation d'organes, pontages coronariens), surcharge en fer, ... (Pincemail et *al.*, 2009). Les ERO seront à la base de dégâts cellulaires importants en provoquant des mutations au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN), en inactivant des protéines ou encore en induisant des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire ou des lipoprotéines (Pincemail, 2001).

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Mohammedi, 2013).

1.2. Les radicaux libres

1.2.1. Définition d'un Radical

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Halliwell et Gutteridge, 1989). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA) (Delattre et *al.*, 2005).

Les radicaux libres sont divisés en radicaux hydroxyles et en radicaux superoxydes. Les radicaux hydroxyles sont les plus puissants des ERO (espèces réactives de l'oxygène) avec une durée de vie extrêmement faible (inférieure à la microseconde), Ces radicaux diffusent peu et réagissent quasiment sur le lieu de leur production.

Les radicaux superoxydes sont peu réactifs par rapport aux radicaux hydroxyles. Ils ont une durée de vie relativement longue (environ une dizaine de secondes) et diffusent bien au-delà de leur lieu de production (Aminata, 2006).

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 $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} . 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 (Favier, 2003). De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité (Delattre et al., 2005).

Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (Bouزيد, 2009).

1.2.2. Types des radicaux libres

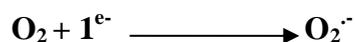
Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH^{\cdot}), le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et sa forme protonnée (HO_2^{\cdot}), le radical peroxy (ROO^{\cdot}) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) sont des molécules hautement réactives (Chu et al., 2010).

1.2.2.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Qui est un radical modérément réactif (Barouki, 2006).

Les mitochondries sont le siège d'une importante production physiologique d'ERO; en effet, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, environ 2% de l'oxygène est transformé en radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) (Dominique, 2007) subit une réduction monoélectronique, au niveau de l'ubiquinone (Cadenas et Davies, 2000).

les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénase ou COX, lipo-oxygénase, Nitric Oxyde synthases (NOS), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) (Cai, H. et Harrison, D. G., 2000).

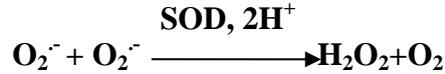


L' $O_2^{\cdot-}$ est relativement stable, peu toxique pour l'organisme. Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003). Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la

production de molécules très nocives. Il est régulé par des enzymes, les superoxydes dismutases qui catalysent sa dismutation (Halliwell, 1989).

1.2.2.2. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

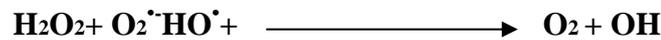
Provient d'une réaction entre deux anions superoxydes qui met fin au processus radicalaire.



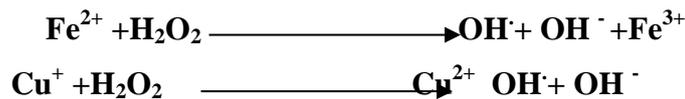
Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant, mais on considère qu'il joue avec ce dernier un rôle important dans le stress oxydatif car ils diffusent facilement à travers les membranes vers des organites vulnérables des cellules comme le noyau ou la mitochondrie (Hennebelle, 2006). Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries (Nohl et al., 2004).

1.2.2.3. Le radical hydroxyle HO[•]

Le radical hydroxyle peut être induit par la réduction de L'H₂O₂ selon la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO[•] (Comhair et Erzurum, 2002).



Le cuivre et le fer libres génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H₂O₂, par une réaction appelée réaction de Fenton (Favier, 2003).



1.2.2.4. L'oxygène singulet ¹O₂

L'eau oxygénée est aussi convertit par la myeloperoxidase (MPO), dans les neutrophiles, en acide hypochloreux (HOCl), un très fort oxydant qui agit comme agent bactéricide dans les cellules phagocytaires. La réaction de HOCl avec H₂O₂ résulte en la production de ¹O₂ (Ahsan et al., 2003).



Est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau (Hennebelle, 2006).

1.2.2.5. L'oxyde nitrique NO[•]

Est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (Fang et al., 2002).



1.2.2.6. L'anion hypochlorite ClO^-

Est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par l'amyéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'infections. Il n'est présent que lors d'infections et peut participer au stress oxydatif (Hennebelle, 2006).

1.2.2.7. Le peroxy-nitrite ONOO^-

La réaction du NO avec anion superoxyde donne naissance au peroxy-nitrite (Wiernsperger, 2003).



L'anion peroxy-nitrite est un puissant oxydant et agent de nitration, notamment des résidus tyrosine. Ses effets peuvent être soit directs, soit médiés par des radicaux libres secondaires dont il est à l'origine (OH^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , $\text{CO}_3^{\cdot-}$) (Deby *et al.*, 2002). Le peroxy-nitrite (OONO^-) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Knight, 2001).

1.2.3. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003).

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue, sous le nom de « Flambée respiratoire », c'est-à-dire explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action des superoxydes dismutases (SOD) et NO synthase (NOS) aboutissent à un mélange très corrosif de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , ONOOH , avec en plus dans le polynucléaire HOCl et $^1\text{O}_2$. Ce mélange réactionnel, que l'Homme a imité en utilisant comme désinfectant l'eau de javel ou l'eau oxygénée, détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens (Favier, 2003).

Possède une fonction régulatrice, alors que le radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ module la signalisation cellulaire et intervient dans les régulations métaboliques, en plus, lorsqu'il est produit par le réticulum endoplasmique lisse avec H_2O_2 , ils interviennent dans la régulation

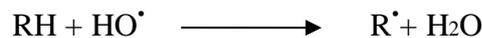
redox de certaines fonctions essentielles de ce compartiment cellulaire telles que l'adressage et la sécrétion des protéines (Valko et *al.*, 2007).

1.2.4. Cibles biologiques des radicaux libres

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (Favier, 2003). Le danger est accentué par la multiplicité des sources de formation des radicaux libres. Qui provoque des lésions directes sur les molécules biologiques (Favier, 2003; Ohare, 2007).

1.2.4.1. Les lipides

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés (Cillard et Cillard, 2006). Un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI).



Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO^{\bullet}), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin (Haleng, 2007).



L'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéanal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Haleng, 2007).

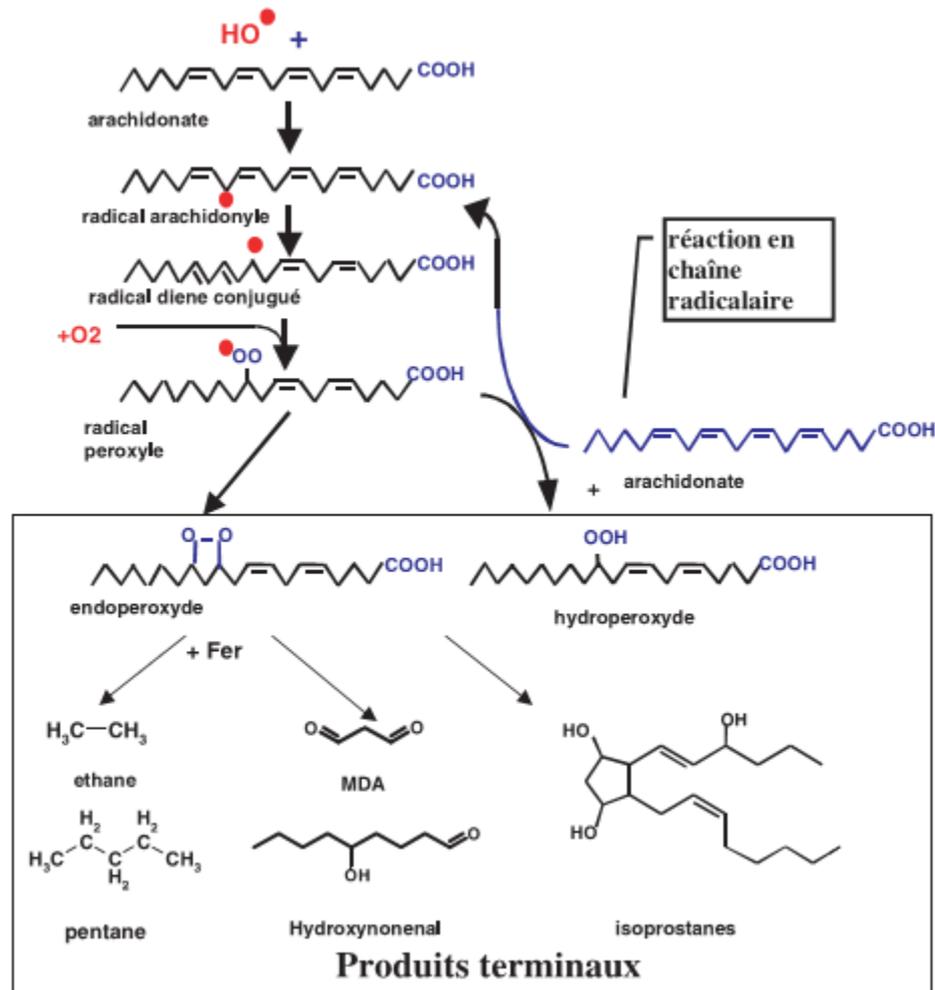


Figure 11 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

1.2.4.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Haleng, 2007).

Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

1.2.4.3. Les acides nucléiques ADN

Les bases nucléiques sont susceptibles d'être directement oxydées par les ERO, conduisant à la formation de 8-oxo-guanine, à l'origine de mutations géniques (Barouki,

2006). Certains affectent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et *al.*, 2005). Ils conduisent à la dénaturation oxydante des acides aminés et par conséquent modifient les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines (Pincemail et *al.*, 1999). L'altération des bases nucléiques et les cassures perturbent les processus de transcription (Deby et *al.*, 2002).

2. Les systèmes antioxydantes

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1990).

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Bouguerne, 2012).

On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng et *al.*, 2007).

2.1. Les antioxydants enzymatiques.

2.1.1. Superoxydesdismutases (SOD)

Le superoxydedismutase (SOD) ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant (Haleng et *al.*, 2007).

Eliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène (Favier, 2003).

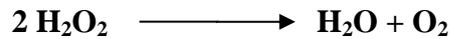


Il y a trois formes de SOD. La SOD cuivre-zinc est située dans le cytosol, la SOD du manganèse est principalement une enzyme mitochondriale, et la SOD extracellulaire se trouve habituellement à l'extérieur de la membrane plasmique (Comhair et Erzurum, 2002).

2.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme hémérique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire (Lindau et Shaffer, 1993).

Catalase



La catalase est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe_3 et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de H_2O_2 (Delattre et *al.*, 2005). Présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques (Favier, 2003). Il est particulièrement important dans le cas d'une teneur limitée en glutathion ou d'une activité réduite de GPX et joue un rôle important dans le développement de la tolérance au stress oxydatif dans la réponse adaptative des cellules (Wassmann et *al.*, 2004).

La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Cantin, 1999).

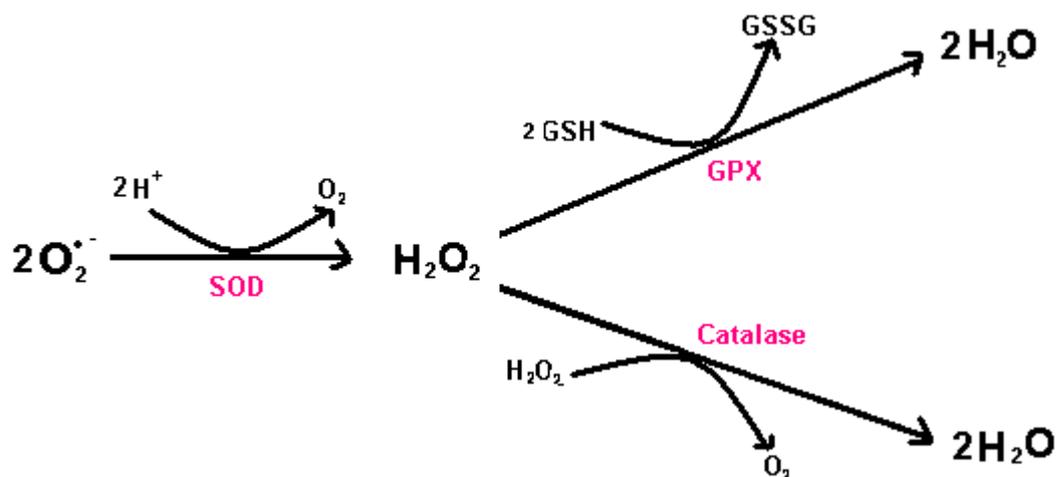


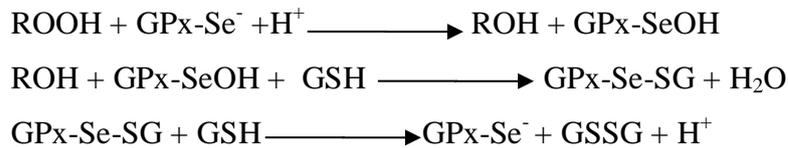
Figure 12 : Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Hennebelle, 2006).

2.1.3. Glutathion peroxydase

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Haleng et *al.*, 2007).

Il existe des GPx avec ou sans résidu sélénio-cystéine dans leur site actif mais les plus courantes sont celles possédant une sélénio-cystéine. Jusqu'à présent 5 GPx sélénio-cystéine ont été identifiées GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 et GPx5 (Comhair et Erzurum, 2001).

L'ensemble des GPx sélénio-cystéine catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux ou organique en eau et en alcool lipidique respectivement, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). Toutes ces enzymes contiennent dans leurs sous-unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme (Delattre et *al.*, 2005). Elles fonctionnent toutes selon le même mécanisme catalytique suivant :



En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau.

Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré, cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques et André, 2004).

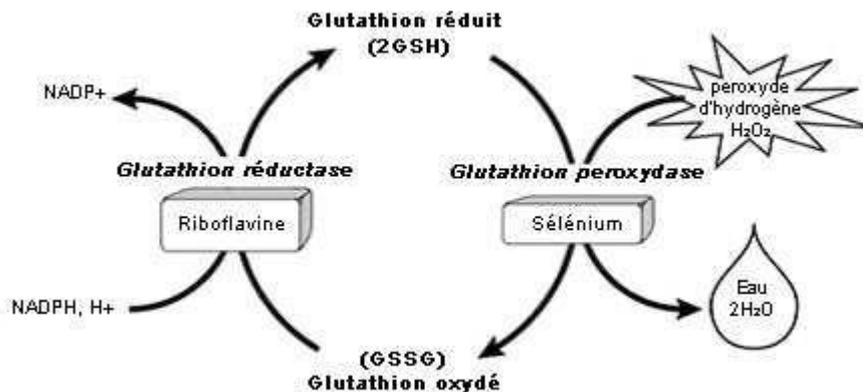


Figure 13 : Cycle oxydo-réducteur du glutathion (Hagen et *al.*, 1990).

Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPx) dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx) (Favier, 2003).

2.1.4. Glutathionne-S-transférase (GST)

Glutathion S-transférase est une famille de enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes catalysent la conjugaison du glutathion à des substrats électrophiles (Pemble *et al.*, 1994).

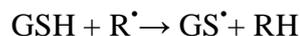
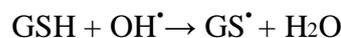
Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification des d'une grande variété de composés xénobiotiques (par exemple des agents cancérigènes, des médicaments antitumoraux, les polluants environnementaux) et de composés endogène (par exemple, des peroxydes, des sous-produits de l'activité des espèces d'oxygène réactif) (Sherratt, 2001).

2.2. Antioxydants non enzymatiques

2.2.1. Le glutathion (GSH)

Est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinylglycine) ayant de multiples fonctions dans les organismes vivants. En tant que porteur d'un groupe thiol actif sous la forme d'un résidu de cystéine (Volodymyr, 2011).

Le glutathion (GSH) joue un rôle essentiel dans la préservation des formes actives de divers antioxydants de faible taille (vitamines C, E, ubiquinone, polyphénols). Il est aussi le cofacteur de toute une série des enzymes antioxydantes (Defraigne et Pincemail, 2008). Le glutathion est modérément stable dans les milieux intracellulaires car les peptidases intracellulaires peuvent cliver les liaisons peptidiques formées par les groupes α -carboxyle des acides aminés, mais typiquement pas les groupes γ -carboxyle (Volodymyr, 2011). Le glutathion neutralise directement les ERO tels que les peroxydes lipidiques et joue également un rôle majeur dans le métabolisme xénobiotique (Percival, 1998). Le piégeage de O_2 par le GSH conduit à la formation de radicaux thiyle (GS) et de H_2O_2 via plusieurs étapes, qui sont une réaction de propagation radicalaire (Suzy, 2002).



Le rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) est un excellent marqueur du stress oxydant et de son importance (Haleng *et al.*, 2007).

2.2.2. Vitamine C

La vitamine C est considérée comme l'antioxydant hydrosoluble le plus important dans les liquides extracellulaires. La vitamine C est considérée comme l'antioxydant soluble dans l'eau le plus important dans les fluides extracellulaires. Elle est capable de neutraliser les ERO dans la phase aqueuse avant que la peroxydation des lipides ne soit initiée. La vitamine C a été citée comme étant capable de régénérer la vitamine E (Percival, 1998).

2.2.3. La vitamine E (α -Tocophérol)

La vitamine E, un antioxydant liposoluble majeur, est l'antioxydant de rupture de chaîne le plus efficace dans la membrane cellulaire où elle protège les acides gras de la membrane contre la peroxydation des lipides (Percival, 1998).

Vitamine E est composée de huit isoformes, avec quatre tocophérols (α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol) et quatre tocotriénols (α -tocotriénol, β -tocotriénol, γ -tocotriénol et δ -tocotriénol), α - le tocophérol étant l'isoforme la plus puissante et la plus abondante dans les systèmes biologiques. Le groupe de tête chroman confère l'activité antioxydante aux tocophérols, mais la queue de phytyle n'a aucune influence. La vitamine E arrête la peroxydation des lipides en faisant don de son hydrogène phénolique aux radicaux peroxydes formant des radicaux tocophéroxylés qui, bien qu'étant également des radicaux, ne sont pas réactifs et incapables de poursuivre la réaction en chaîne oxydative. La vitamine E est le seul antioxydant majeur, soluble dans les lipides, présent dans le plasma, les globules rouges et les tissus, ce qui lui permet de protéger l'intégrité des structures lipidiques, principalement les membranes (Carocho et Ferreira, 2013).

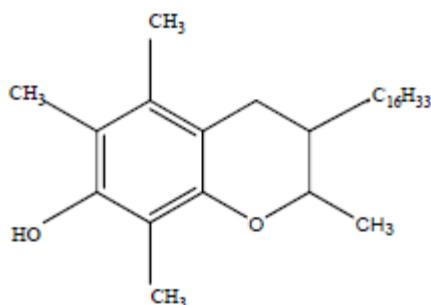


Figure 14 : Alpha-tocophérol (Brewer, 2008).

2.2.4. Oligo-éléments

Les oligoéléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont les cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydant (Defraigne et Pincemail, 2008).

2.2.4.1. Le sélénium

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines (Burk, 2002).

2.2.4.2. Le zinc

Zinc est un minéral essentiel pour diverses voies métaboliques, présent dans la superoxyde dismutase, une enzyme antioxydante importante qui convertit le radical oxygène singulet en peroxyde d'hydrogène. Le zinc induit la production de métallothionéine qui est un piègeur du radical hydroxyle. Il n'attaque pas directement les radicaux libres mais joue un rôle

important dans la prévention de leur formation (Carocho et Ferreira, 2013). Le zinc protège également les groupements thiols des protéines (Mezzetti et *al.*, 1998).

2.2.4.3. Le cuivre

Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels du superoxyde dismutase. Toutefois, au même titre que le fer, il joue, en tant que métal dit de transition, un rôle important dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées (Mezzetti et *al.*, 1998).

2.3. Antioxydants d'origine végétale

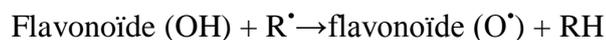
2.3.1. Polyphénols

L'activité antioxydant des composés phénoliques est principalement attribuable à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène et extincteurs (qu'enchère) de l'oxygène singulet (Gulcin et *al.*, 2010). Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des espèces réactives de l'oxygènes (ERO) et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et *al.*, 2007).

2.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, dont beaucoup sont des pigments naturels, sont un groupe important de phénols végétaux qui ont des propriétés antioxydantes. Dans la plante, les flavonoïdes ont probablement pour fonction de le protéger des dommages causés par l'oxygène à haute énergie (Suzy, 2002).

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques formés dans les plantes des acides aminés phénylalanine, tyrosine et malonate. La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH^\bullet), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et radicaux peroxylipidiques, par la donation directe d'atome d'hydrogène selon la réaction suivante (Finaud et *al.*, 2006) :



Les propriétés antioxydantes sont conférées aux flavonoïdes par les groupes hydroxyles phénoliques attachés aux structures cycliques et ils peuvent agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, désactivateurs d'oxygène singulet, éliminateurs de radicaux superoxydes et même comme chélateurs de métaux (Carocho et Ferreira, 2013).

2.4. Les Antioxydants Synthétisés

Ces composés purs sont ajoutés aux aliments afin de pouvoir résister à divers traitements et conditions ainsi que pour prolonger la durée de conservation.

Le principal objectif des antioxydants synthétiques est la prévention de l'oxydation des aliments, en particulier des acides gras.

Le BHT (hydroxytoluènebutylé) et le BHA (hydroxyanisolebutylé) sont les antioxydants chimiques les plus utilisés (Carocho et Ferreira, 2013).

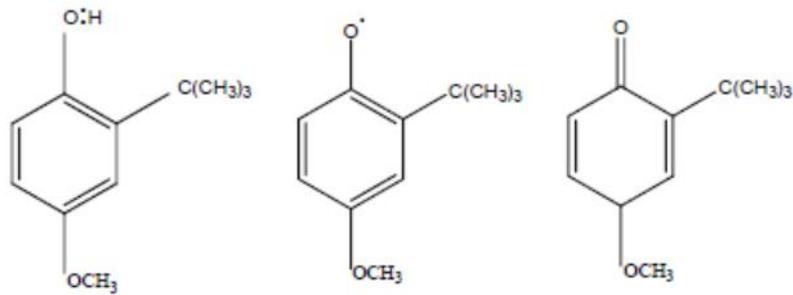


Figure 15 : BHA faisant don de H[•] (à un radical) devenant lui-même un radical puis réarrangeant une structure stable (quinone) (Brewer, 2008).

Chapitre III
Daphne gnidium L.

1. Famille Thymelaeaceae

Les Thymelaeaceae sont une famille cosmopolite composée d'environ 40 à 45 genres, sont l'une des familles basales de l'ordre Malvales Dumort (Zachary, 2005). La famille des Thymelaeaceae comprend environ 500 espèces d'arbres et arbustes généralement toxiques. Elle est répartie dans toutes les régions tempérées et tropicales de la planète. On reconnaît la famille aux fleurs tubulaires essentiellement sépalaires de ses membres. Les genres de cette famille comptant le plus d'espèces sont *Daphne* (90 espèces), *Daphnopsis* (73 espèces), *Gnidia* (152 espèces), *Gonystylus* (32 espèces), *Pimelea* (80 espèces), *Thymelaea* (27 espèces) et *Wikstroemia* (87 espèces) (Gelais, 2014).

Thymelaeaceae, ce qui a permis la reconnaissance de deux sous-familles, Octolepidoideae Gilg (= Gonystyloideae Tiegh. + Octolepis Oliv., 8 genres, c. spp.), et Thymelaeoideae Burnett (37 genres, environ 750 spp.). Sous-famille Octolepidoideae est clairement morphologiquement distingué de Thymelaeoideae par sa fleur courte ou non-tubulaire, gynécée 3-12 carpellate, fruit capsulaire et exine non-crotonoïde du grain de pollen. a ensuite subdivisé les Octolepidoideae en deux groupes classés de manière informelle; Le groupe Octolepis diffère du groupe Gonystylus par des anthères droites, peltées ou réfléchies (vs en forme de fer à cheval), un style droit (vs contorsionné), un tégument pubescent (vs glabre), endogène (vs uniforme), copieux (vs absent), l'endosperme et les cotylédons plats (vs épaissis). Le groupe est composé d'Octolepis, un petit genre d'arbustes d'arbres de taille moyenne en Afrique continentale et à Madagascar, et de quatre autres genres endémiques de Nouvelle-Calédonie et d'Australie (Queensland et Northern Territory), à savoir *Arnhemia* Airy Shaw (1 sp.), *Deltaria* Steenis (1 sp.), *Lethedon* Spreng. (environ 15 spp.), et *Solmsia* Baill. (2 spp.). L'octolepis se distingue des autres genres chez Octolepidoideae par une suite unique de caractères morphologiques, y compris l'esquive imbriquée des sépales, des filaments droits dans le bourgeon floral, étamines, anthères basifixés et 3-6 ovaires loculaires. Les anthères basifixées sont probablement une synapomorphie du genre (Zachary, 2005).

2. Genre *Daphne*

2.1. Distribution et description du genre *Daphne*

Les plantes du genre *Daphne* sont de petits buissons ou des arbres courts avec des branches clairsemées. La taxonomie du genre *Daphne* est très complexe et compliquée en raison de l'existence d'un grand nombre d'espèces et de sous-espèces.

Le genre *Daphne* appartient à la famille des Thymelaeaceae qui comprend 44 familles avec environ 500 espèces végétales. Le principal centre d'évolution de ce genre était la Chine. Le genre couvre 95 espèces qui sont principalement distribuées en Europe et dans certaines

régions de l'Asie subtropicale. Jusqu'à présent, dans la flore d'Europe, la présence de 17 espèces de ce genre a été identifiée (Sovrlić et Manojlović, 2016).

2.2. Les espèces végétales du genre *Daphne*

Tableau 03 : Les espèces végétales du genre *Daphne* (Sovrlić et Manojlović, 2016).

genre <i>Daphne</i>	Les espèces	Noms vernaculaires
	<i>Daphne oleoides</i> Schreber <i>ssp. Oleoides</i>	(Spurge-olive)
	<i>Daphnegenkwa</i> Sieb. et Zucc	(Lilac Daphne)
	<i>Daphne odora</i> Thunb	(Fragrant Daphne, Winter Daphne)
	<i>Daphne acutiloba</i> Rehd	
	<i>Daphne gnidium</i> L.	(Flax-leaved Daphne)
	<i>Daphne retusa</i> Hemsl	
	<i>Daphne mucronata</i> Royle	(Kashmir Daphne)
	<i>Daphne pontica</i> L.	(Twin flowered Daphne)
	<i>Daphne mezereum</i> L.	(Mezereon, Paradise plant, February Daphne)
	<i>Daphne giraldii</i> Nitsche	/
	<i>Daphne altaica</i> Pall	/
	<i>Daphne papyracea</i> Wall.	/
	<i>Daphne acutiloba</i> Rehd	/
	<i>Daphne acuminata</i> Boiss	/
	<i>Daphne alpina</i>	/
	<i>Daphne cneorum</i> L.	/
<i>Daphne blagayana</i> L.	/	
<i>Daphne malyana</i> Blečić	/	

Les extraits d'espèces de *Daphne* situées en Serbie (*Daphnea lpina* sous-espèce *alpina*, *Daphne cneorum* L. (fleur de Garland ou Rose *Daphne*), *Daphne blagayana* L. Freyer et *Daphne malyana* Blečić) présentent des activités antioxydantes et antimicrobiennes significatives (Sovrlić et Manojlović, 2016).

3. *Daphne gnidium* L.

Noms vernaculaires

Nom français : Garou, Daphné Garou, Thymèle, Saint Bois

Nom anglais : Flax-leaved *Daphne*

Nom arabe : Lazzaz (Mohammedi, 2013).

Abderrazaq EL DJAZAIRI (1960) rapporté dans son livre différents noms vernaculaires au Daphné à savoir: Assas, Azaz, Lazaz et aussi Math'nen.

3.1. Présentation et description botanique

C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, existe dans tout le Tell de l'Algérie (Mohammedi, 2013). L'écorce présente une cassure fibreuse, filandreuse. Les tiges sont de couleurs rougeâtre ; elles sont dressées, longues de 60 cm à 2 mètres, formant des rameaux très feuillés sur toute leur longueur et d'allure générale cylindrique avec leur feuillage très dense. Les feuilles sont alternes, persistantes de consistance coriace, sessiles, simples, allongées, étroites et aigues, de forme lancéolée-linéaire-, longues de 3 à 4 cm et large de 4 à 6 mm ; elles sont de couleur vert bleuté, acuminées et cuspidées et pourvues d'une seule nervure (Dif, 2015). Inflorescences terminales en panicule rameuse longue de 5-10cm, entièrement blanche – tomenteuse, fleurs blanches caduques. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé, d'environ 8 mm de diamètre. La floraison va d'octobre à mars, c'est une plante entomogame (Mohammedi, 2013).



Figure 16 : *Daphne gnidium L.* (El fennouni, 2012).

3.2. Classification

Règne : végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : Eudicots

Ordre : Myrtales

Famille : Thymelaeaceae

Genre : *Daphne*

Espèce : *Daphne gnidium L.* (Abetti, 2014).

3.3. Composition

La composition des principaux flavonoïdes et coumarines du *D. gnidium* est un peu mieux connu. Selon les données publiées, les composés suivants peuvent être présents : apigénine, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, genkwanine-5-O-3-D-primeveroside, luteoline, luteoline-7-O-glucoside, orientine, isoorientine, quercétine, 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavonol, acétylumbelliférone, daphnine, daphnétine, daphnétine-8-O-glucoside et la daphnoretine, et également l' α -tocophérol (Nowik, 2005).

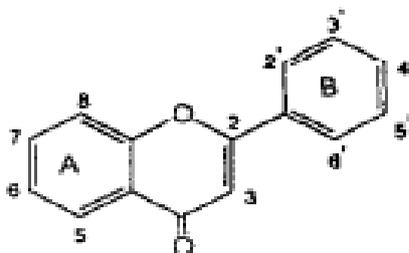


Figure 17 : Structure de base des flavonoïdes (Di et al., 1999).

Tableau 04 : Les flavonoïdes (1-9) du *D. gnidium* (Nowik, 2005).

N°	Composé	3	5	6	7	8	3'	4'
1	Apigénine	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH
2	Api-7-O-Glucoside	-H	-OH	-H	-O-glucosyl	-H	-H	-OH
3	Luteolin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH
4	Lut-7-O-Glucoside	-H	-OH	-H	-O-glucosyl	-H	-OH	-OH
5	Quercétine	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH
6	Orientine	-H	-OH	-H	-OH	-glucosyl	-OH	-OH
7	Isoorientine	-H	-OH	-glucosyl	-OH	-H	-OH	-OH
8	Genkwanine	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH
9	Gen-5-O-Primeveroside	-H	-O-xyloglucosyl	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH

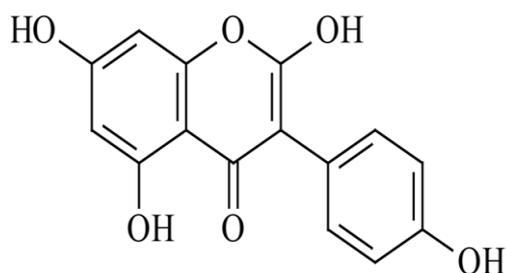


Figure 18 : 2,5,7,4-tétrahydroxyisoflavonol (composé n° 10) (Nowik, 2005).

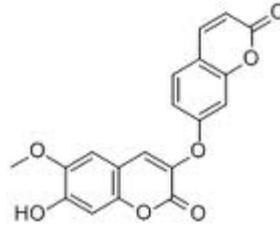


Figure 19 : Daphnoretine (El fennouni, 2012)

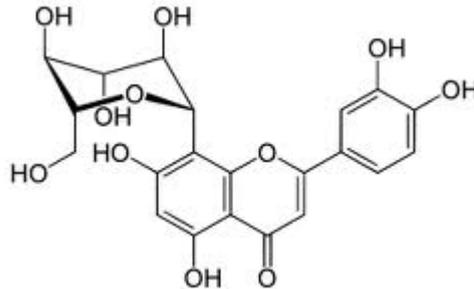


Figure 20 : Orientine (El fennouni, 2012)

	5	6	7	4'		5	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH	-	OH	OH		OH	OH	OH	OH	-
Lutéoline	OH	-	OH	-		OH	OH	-	OH	-
Quercétine						OH	OH	OH	OH	OH
Kaempférol						OH	OH	-	OH	-
Myricétine						OH	OH	OH	OH	OH

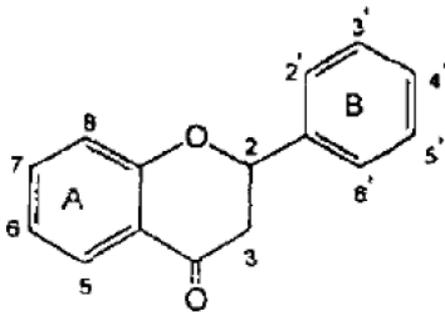


Figure 21 : Structure de base des flavanones
(Di et al., 1999).

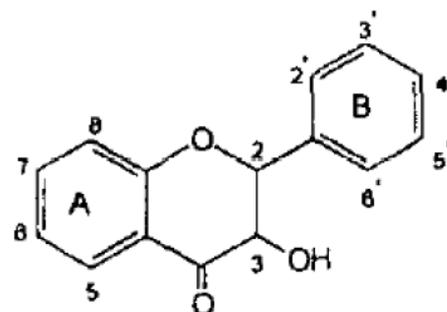


Figure 22 : Structure de base des flavanols
(Di et al., 1999).

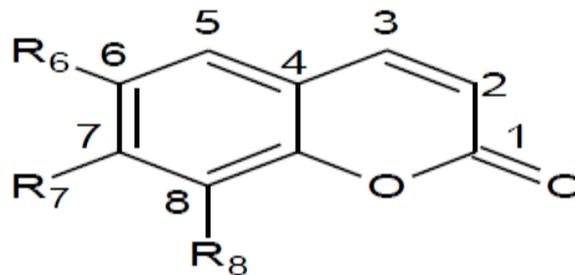
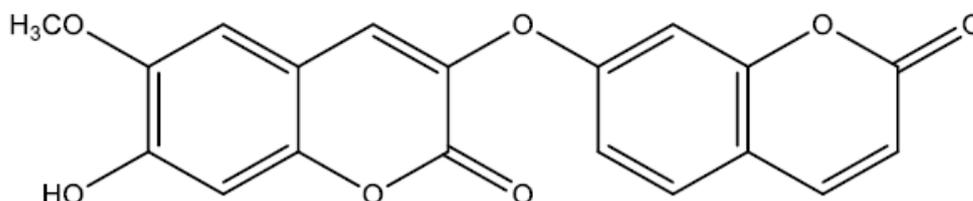


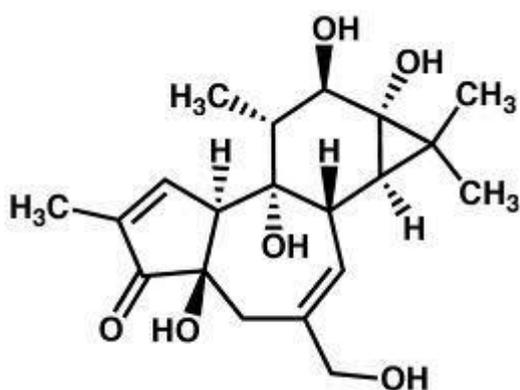
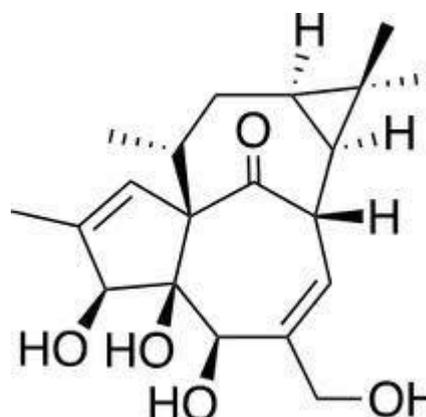
Figure 23 : Structure générale des coumarines (Rezine et Fedouche, 2017).

Tableau 05 : les coumarines (11-14) du *D. gnidium* (Nowik, 2005).

Numéro	Composé	7	8
11	Acetylumbelliférone	-OCOCH ₃	-H
12	Daphnetin	-OH	-OH
13	Daphnin	-O-glucosyl	-OH
14	Dap-8-O-Glucoside	-OH	-O-glucosyl

**Figure 24 :** Daphnorétine (composé n ° 15) (Gelais, 2014).

Toute la plante mais surtout les baies et l'écorce, renferment des diterpènes (esters du phorbol et de l'ingenol).

**Figure 25 :** Phorbol (El fennouni, 2012)**Figure 26 :** Ingenol (El fennouni, 2012)

L'écorce contient une résine (Kerharo et *al.*, 1961).

3.4. Propriétés pharmacologiques

Le Garou est doté de propriétés vésicantes, purgatives, abortives, réputé aussi comme hypoglycémiant (Bnouham et *al.*, 2002).

Une étude a montré le pouvoir inhibiteur des racines du *Daphne gnidium* L. sur la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose dans la lignée cellulaire de cancer du sein humain MCF-7 (Chaouki et *al.*, 2009).

L'extrait alcoolique des feuilles agit comme un anti-inflammatoire *in vitro* par inhibition des macrophages des souris et des lymphocytes activés. Il a présenté également une activité antibactérienne contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli*, mais était inactive contre les champignons (Cottiglia et *al.*, 2001; Harizi et *al.*, 2011).

3.5. Utilisation de *Daphne gnidium L.*

Anciennement, l'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisé sous forme de pommade aux propriétés épispastiques. En Phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides, la sclérose en plaque et le sida. Le principe actif susceptible de détruire les leucoblastes malins dans la leucémie myéloblastique aigue en évolution est le Primeverosyl *B. genkwanine*, hétéroside extrait primitivement du *Gnidia kraussiana*, plante de la savane africaine et actuellement du *Daphne gnidium L.*, plante méditerranéenne; cette dernière contient en effet un plus fort pourcentage de principe actif; dont la purification est plus facile. Dans la pharmacopée traditionnelle, il était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive. Le Garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien (Mohammedi, 2013). En médecine traditionnelle, l'infusion des feuilles est utilisée comme hypoglycémiant et pour traiter les maladies de la peau. Cette plante est également utilisée dans la teinture textile traditionnelle (Chaabane et *al.*, 2012).

Pour guérir la maladie de l'hépatite virale On écrase les tiges fraîche, en la sève qu'on l'applique sur le front ou on met les feuilles desséchés sur les braises, puis on a aspiré la fumé dégagée (Dif, 2015).

Les femmes l'utilisaient autrefois pour teindre leurs cheveux en noir. Cette plante est aussi habituellement utilisée comme teinture pour les textiles et les cheveux (Nowik, 2005)

De tous les temps (et surtout au Moyen Âge) l'écorce des rameaux fut recommandée pour soigner les affections de la peau (antiseptique) et divers troubles vénériens. Jusqu'en des temps récents, elle demeura un remède populaire en qualité de drogue vésicante (encore qu'elle provoque assez souvent l'apparition de cloques sur la peau). Enfin, on la tint pour purgative, sudorifique et même abortive. Pareillement, dès l'Antiquité, feuilles et fruits furent utilisés comme purgatifs(énergiques) et Galien les recommandait en cas de troubles biliaires. Mais la répétition d'accidents, dus à la toxicité des divers organes du Garou a fait renoncer à leur emploi (Beniston et W, 1984).

Cependant, *Daphne gnidium L.* est considéré comme dangereux en raison de sa toxicité élevée. Elle provoque maux de tête, frissons, pâleur, dilatation pupillaire, gonflement de la bouche et des lèvres, difficulté de déglutition, diarrhée et spasmes digestifs, convulsions, troubles pulmonaires et décès (Chaabane et *al.*, 2012).

DEUXIEME PARTIE
PARTIE PRATIQUE

Chapitre I
Matériels & Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériel végétal

La plante utilisée dans ce travail est le feuille de *Daphne gniduum* L., qui a été achetée du marché local, l'échantillon ont été finement broyée pour obtenir une poudre fine conformément. Les poudres de *Daphne gniduum* L. sont conservées à la température ambiante dans de contenant hermétique à l'abri de la lumière vive jusqu'à le début de l'expérimentation (figure 27).



Figure 27 : les feuilles des *Daphne gniduum* L. (photo originale).

1.2. Matériel animal

Notre étude a été réalisé sur quarante (40) rattes femelles de type *Wistar Albinos*, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, d'un poids entre 161 et 212 g au début d'expérience. Les animaux sont élevés à l'animalerie au niveau de la faculté de sciences de la nature et de la vie, à l'université Echahid Hamma Lakhdar.

Les rattes sont soumises pendant 20 jours à une période d'adaptation où elles ont un accès libre à l'eau et à l'aliment sous aux conditions de l'animalerie.

Les rattes ont été séparées dans des cages aléatoirement. Ils sont divisés en 8 lots (cinq rattes par cage : $n=5$). Les cages sont munies d'un porte étiquette où sont mentionnés le nom du lot, l'intervalle des poids, avec la date de début de traitement.

1.3. Matériels d'étude au laboratoire

Les matériels et les réactifs utilisés dans les différents tests sont regroupés dans un tableau et présentés dans l'Annexe 1.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait aqueux

La plante étudiée (10 g) est mis à macérer à l'obscurité et à température ambiante dans l'eau distillée 100 ml pendant 24 heures. Après la macération, l'extrait aqueux est récupéré par filtration sur papier Wattman. Ensuite l'extrait a été évaporé à 56°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R- 200) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Puis séché à l'étuve à une température ne dépasse pas 55 C° (figure 28). Enfin ce résidu sec a été conservé à une température de +4°C (Matkowski et Piotrowcka, 2006).

2.2. Calcule du rendement de l'extrait

Les rendement de l'extrait brut aqueux macéré isolé a été quantifié selon la formule :

$$R \% = \text{PEB/PMV} \times 100$$

R : Rendement.

PEB : Poids de l'Extrait Brut (g).

PMV: Poids de Matière Végétale (g).

2.3. Etude *in vitro*

2.3.1. Les analyses phytochimiques

2.3.1.1. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (Trease et Evans, 1987).

2.3.1.2. Composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait aqueux avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (Trease et Evans, 1987).

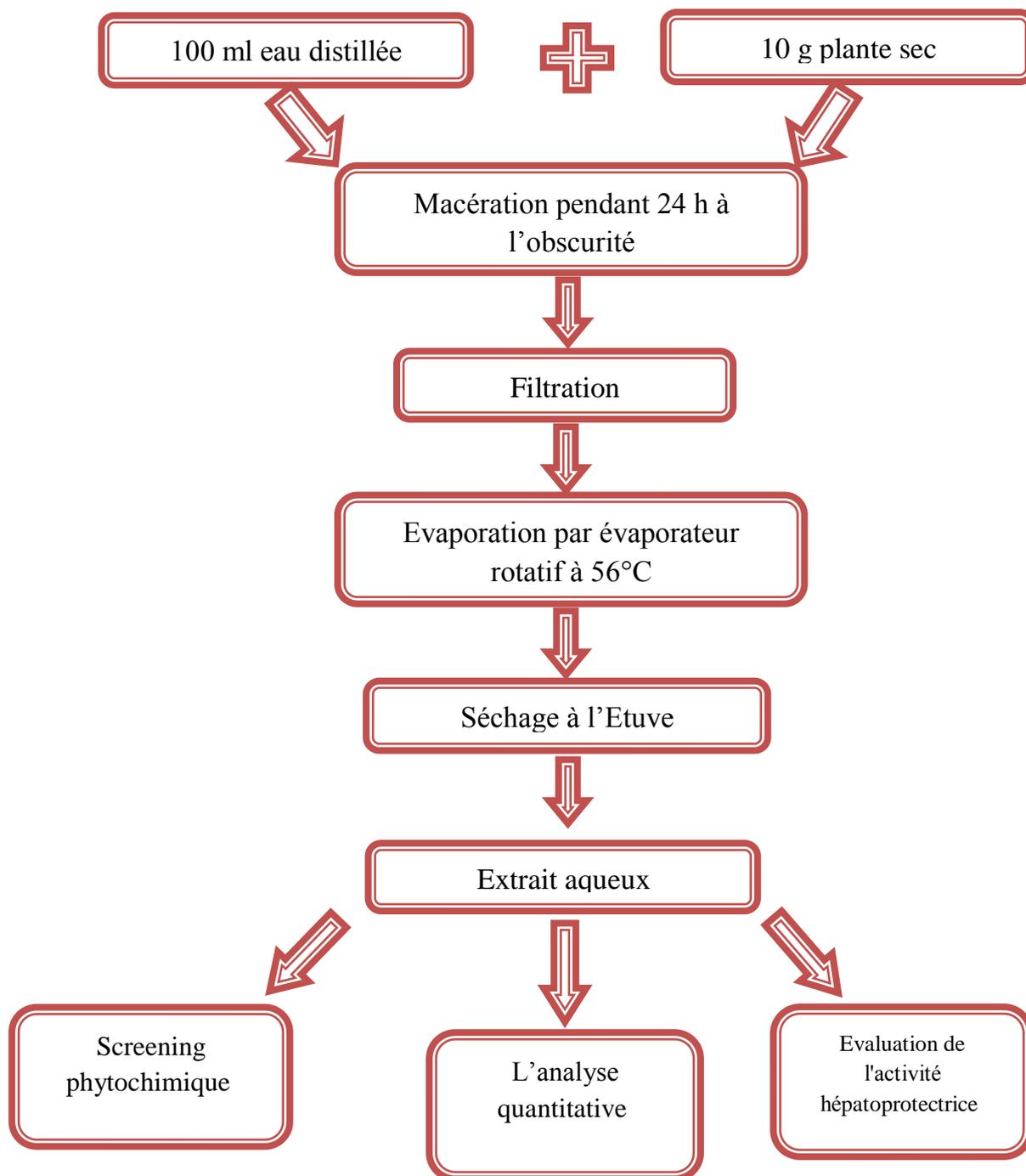


Figure 28 : Protocole de préparation de l'extrait aqueux

2.3.1.3. Test des stéroïdes

Pour 1ml d'extrait végétal ajouter 0,5ml de solution d'acide acétique, est suivi par 0,5ml de H₂SO₄ concentré. Si la solution ne donne aucune couleur verte cela prouve la présence de stéroïdes non saturés. Dans un 2^{ème} tube, le même volume de H₂SO₄ est ajouté. La présence de la couleur rouge indique la présence des dérivés des stéroïdes (Harborne et *al.*, 1973).

2.3.1.4. Les saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 2ml de l'extrait à analyser, ajouter 2ml d'eau distillée chaude, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm d'une mousse indique la présence de saponines (Makhloufi, 2013).

2.3.1.5. Flavonoïdes

Dans un tube à essai, mettre 5ml d'extrait aqueux et plus 5ml d'ammoniaque (NH_3) dilué et 1ml d'acide sulfurique (H_2SO_4). L'apparition d'une couche supérieure avec une couleur jaune prouve la présence des flavonoïdes (Prashant et *al.*, 2011).

2.3.1.6. Terpénoïdes

Dans un tube à essai, ajouter à 5ml d'extrait de plante, 2ml de chloroforme (CHCl_3) et 3ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré. La formation d'une couleur brune rougeâtre indique la présence des Terpénoïdes (Dharmendra et *al.*, 2012).

2.3.1.7. Les alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff.

Prendre 1 ml de l'extrait à analyser dans 3 tubes à essai et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube et 5 gouttes du réactif de Dragendorff dans le troisième tube, l'apparition d'un précipité blanc, brun et orange, respectivement, révèle la présence des alcaloïdes (Azzi, 2013).

2.3.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

2.3.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999).

✓ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphomolibdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm (Boudjelal, 2012).

✓ Mode opératoire

Mettre 0,2 ml de chaque extrait dans des tubes à essais ; ajouter 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée ; puis laisser agir 5 min avant d'ajouter 0,8ml de carbonate de sodium à 7.5%. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 765 nm. On

effectue la même opération pour l'acide gallique à différentes concentrations. Le blanc est représenté par le solvant utilisé additionné du Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium. Toutes les mesures sont répétées 3 fois (Berra, 2015).

2.3.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Kosalec et *al.*, 2004) légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *Daphne gnidium* L.

✓ Mode opératoire

1 ml de la solution d'extrait (préparés dans l'éthanol) est ajouté à 1 ml d' $AlCl_3$ à 2% dans le méthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g ES).

2.3.2.3. Test du DPPH (diphénylpyryl-hydrazyl)

L'activité anti-radicalaire de l'extrait a été évaluée *in vitro* par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune (figure 29), en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et *al.*, 1997). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

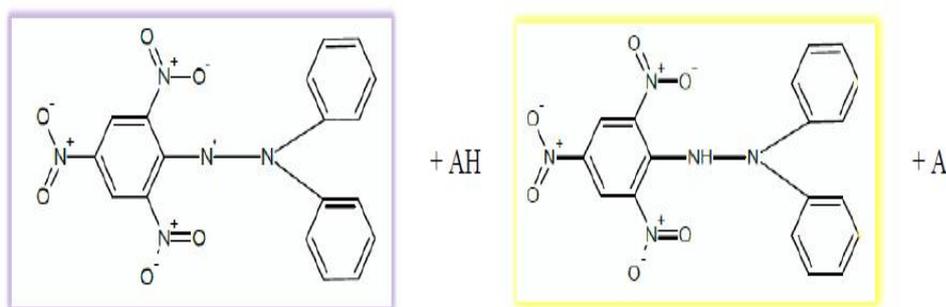


Figure 29 : Réaction entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH[•]) (Younes, 2015).

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol absolu. 200 μ l de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 800 μ l de DPPH. Des solutions d'antioxydant de référence ou acide ascorbique sont également

préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm (Cuendet et *al.*, 1997).

2.4. Etude *in vivo*

2.4.1. Préparation de solution CCl₄

L'hépatopathie est obtenue chez les rattes par intoxication aiguë au CCl₄. La voie d'administration utilisée est la voie intrapéritonéale. Sauf pour le test d'activité protectrice qui se définit à travers l'utilisation d'une dose létale de toxique, les intoxications sont réalisées avec des doses qui induisent une hépatopathie significative chez les animaux sans entraîner leur mort pendant l'expérimentation.

Les doses utilisées dans cette expérimentation sont :

- 3 ml/Kg de CCl₄ comme dose d'intoxication pour le test d'action protectrice de l'extrait de plante (Adewale O.B., et *al.*, 2014).
- 6 ml/Kg de CCl₄ comme dose létale, déterminé après plusieurs essais.

Pour des commodités d'ordre expérimental, le CCl₄ est dissous 1:1 (v/v) dans l'huile d'olive. On obtient des solutions d'intoxication de 3 ml/Kg et des solutions létale de 6 ml/kg

Une heure après les intoxications les animaux sont mis en présence d'eau et deux heures après, les aliments sont apportés.

L'utilisation du CCl₄, tient compte du fait qu'il est le plus communément utilisé d'une part et d'autre part qu'il induit une pathologie rencontrée en clinique: nécrose, stéatose et même cirrhose. Son expression cytopathologique se résumant en un syndrome de cytolysse hépatique, l'intensité de son action peut facilement être suivie par les marqueurs de ce syndrome (les transaminases sériques GOT et GPT) (Ouattara, 1999).

2.4.2. Préparation de l'extrait végétal

2.4.2.1. Evaluation des doses d'administration expérimentale

Deux concentrations de solution 100 et 200 mg/kg/j sont préparées dans une solution d'eau physiologique puis administrées à raison d'un volume de 1 ml.

2.4.2.2. Méthode d'administration de l'extrait de *Daphne gnidium* L.

Les administrations de l'extrait de plante se font par gavage à l'aide d'une seringue munie d'une canule de gavage. L'animal saisi par la peau du dos est maintenu dans une position verticale. On insère la canule dans sa bouche et on la fait descendre jusque dans l'œsophage. Tout doucement, on pousse sur le piston de la seringue de manière à envoyer directement la quantité d'extrait voulue dans l'estomac (figure 30).



Figure 30 : Gavage de l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L.

L'administration est réalisée à 30 minutes avant ou après l'intoxication (30 minutes avant pour les tests d'action préventive et 30 minutes après pour les tests d'action protectrice) (Ouattara, 1999).

Durant 9 jours l'extrait reçu par les rattes des groupes tests ont été administrés à la dose de 100 et 200 mg/kg, p.o. Au septième jour, toutes les rattes des différents lots et à l'exception de ceux du lot 4 (témoin traité non intoxiqué) ont reçu le tétrachlorure de carbone CCl_4 (3ml/kg, i.p. ou 6ml/kg, i.p.) (Sourabie et *al.*, 2012).

2.4.3. Traitement des animaux

Après la période d'adaptation, les rattes ont été réparties au hasard en huit groupes de cinq rattes, les rattes ont été traités neuf jours comme suit :

Lot 1 : Lot témoin non intoxiqué non traité.

Lot 2 : Lot témoin intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) avec une dose 3ml/kg.

Lot 3 : Lot témoin intoxiqué par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) avec une dose 6ml/kg.

Lot 4 : Lot témoin traité non intoxiqué.

Administration préventives de l'extrait de *Daphne gnidium* L.

Lot 5 : Lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. avec dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué à 7^{ème} jour au CCl_4 dose 3ml/kg.

Lot 6 : Lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. avec dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué à 7^{ème} jour au CCl_4 dose 3ml/kg.

Lot 7 : Lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. avec dose 1 (100 mg/kg), puis intoxiqué à 7^{ème} jour au CCl_4 dose 6ml/kg.

Administration curatives de l'extrait de *Daphne gnidium* L.

Lot 8 : Lot intoxiqué au CCl₄ (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. avec dose 1 (100 mg/kg).

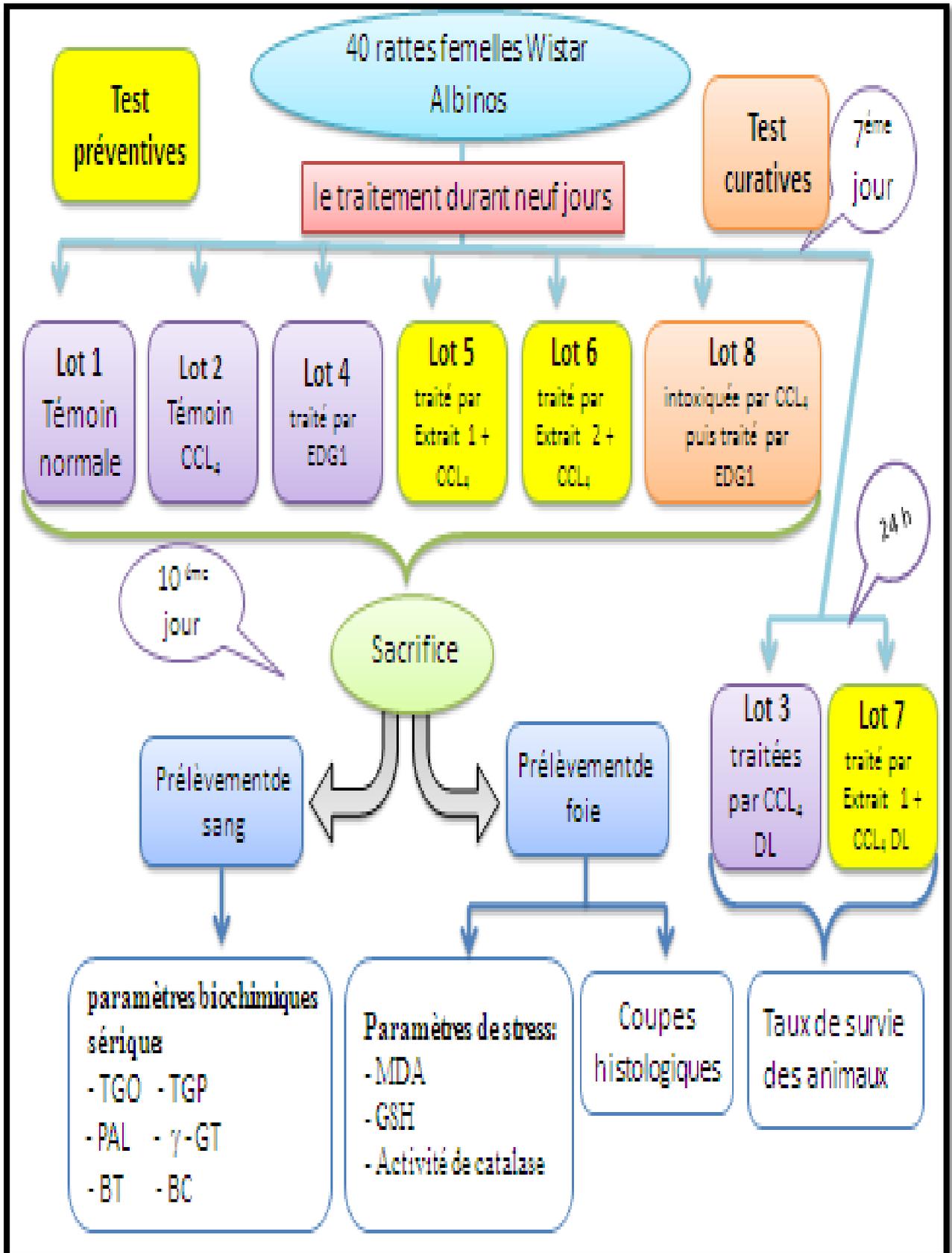


Figure 31 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental de l'étude.

2.4.4. Evaluation du taux de survie après une intoxication d'ordre létale

Elle est effectuée uniquement pour le test d'une dose massive de toxique. Vingt-quatre heures après les traitements, les animaux ayant survécu à l'intoxication sont dénombrés dans les deux lots constitués et les résultats sont exprimés sous forme de pourcentages. L'amplitude de l'activité hépato-protectrice d'une substance peut être appréciée en comparant le pourcentage de survie que produit cette substance dans un lot test intoxiqué avec le pourcentage de survie d'un lot témoin traité uniquement avec l'hépatotoxique (Ouattara, 1999).

✓ Expression des résultats

Pour les deux lots constitués, les résultats quantitatifs sont exprimés sous forme de pourcentages d'animaux vivants dans le cas du test des doses massives de l'agent d'intoxication comme suite:

$$(\%) \text{survie} = \frac{n}{N} \times 100$$

n : nombre d'animaux ayant survécu dans le lot.

N : effectif du lot.

2.4.5. Sacrifice et prélèvement de sang et de foie

A la fin de chaque type d'expérimentation (24 heures après la dernière administration d'extrait de plante), Après 16h de jeune et la mesure de poids les rattes sont anesthésiées par le chloroforme (94%) et sacrifiées par décapitation. Le sang est recueilli sur des tubes secs. Ces tubes sont centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min, le sérum est récupéré et conservé à (-20°C) jusqu'au moment des analyses des paramètres biochimiques (TGO, TGP, phosphatases alcalines, Gamma-Glutamyl-Transférase (γ -GT), Bilirubine totale, Bilirubine directe).

Le foie soigneusement prélevés, rincés avec l'eau physiologique, ensuite pesés.

Une partie des foies est fixée dans le formol (10%) afin de réaliser les coupes histologiques et l'autre est conservée à (-20°C) pour la préparation de l'homogénat pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (Malondialdéhyde, Catalase, Glutathion).

2.4.6. Dosage des paramètres biochimique du sang

2.4.6.1. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

✓ Principe

Dans notre étude, l'Aspartate aminotransférase ont été déterminés suivant une méthode cinétique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de l'Aspartate aminotransférase (Murray, 1984). L'Aspartate aminotransférase (ASAT) initialement appelée glutamate oxalo acétate-transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un

groupe aminé d'aspartate vers l' α -cétooglutarate pour donner du glutamate et l'oxaloacetate. L'oxaloacetate est réduit au Malate par Malate déshydrogénase (MDH) :

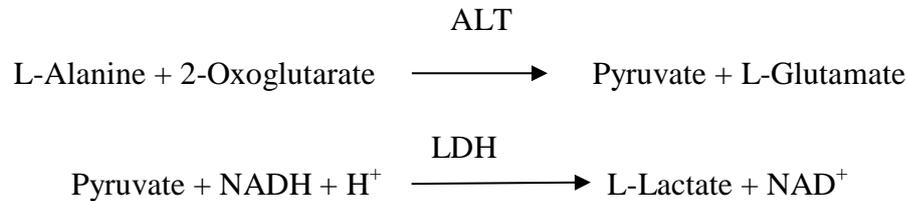


Le taux de diminution de NADH, mesurée photométriquement. Elle est proportionnelle avec la concentration de ASAT catalysée dans l'échantillon, La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=340$ nm.

2.4.6.2. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT)

✓ Principe

Le dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT ou TGP), est selon une méthode développée par Wroblewski et La Due, et optimisée par Henry et Bergmeyer (conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant :



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ et proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P_5P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (Bergmeyer et al., 1978).

2.4.6.3. Dosage de l'activité des phosphatases alcalines

✓ Principe

Dans notre étude, la phosphatase alcaline a été déterminée suivant une méthode cinétique par un Autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de phosphatase alcaline (Wenger, 1984). La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1-propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé.

2.4.6.4. Méthode de dosage de bilirubine total

✓ Principe

La bilirubine totale a été déterminée suivant la méthode d'acide sulfanilique. Réaction entre la bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté qui conduit à un composé, l'azobilirubine,

coloré en milieu très acide ou basique. Principe de Malloy-Evelyn modifié par Walters et *al* : en solution aqueuse, seule la BD réagit. Pour doser la BT il est nécessaire de rompre la liaison entre la bilirubine indirecte et l'albumine. Cette étape est réalisée par l'addition de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est proportionnelle à la concentration en bilirubine et est mesurée à 550 nm (530-580) (Walters et Gerarde, 1970).

2.4.6.5. Méthode de dosage de bilirubine direct

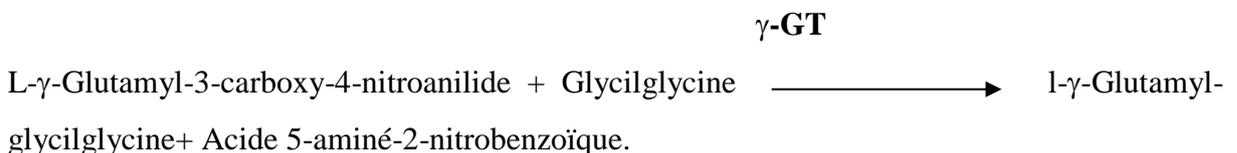
✓ Principe

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. En l'absence de diméthyl sulfoxyde seule la bilirubine directe se couple avec l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine. L'absorbance de l'azobilirubine est mesurée à 555 nm.

2.4.6.6. Dosage de gamma-glutamyl transférase (γ -GT)

✓ Principe

gamma-glutamyl-transférase (γ -GT) catalyse le transfert d'un γ -glutamyl-p-nitroanilide au dipeptide accepteur γ -glutamyl de la γ -groupe glycyglycine d'après la réaction suivante :



La vitesse de formation de l'acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de γ -GT dans l'échantillon testé (Djaber et Kherraz, 2016).

✓ Mode opératoire

1. Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.
2. Mélanger et introduire dans une cuve thermostatée, attendre 1 minute.
3. Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon, mettre en marche le chronomètre et lire l'absorbance chaque minute pendant 3 minutes.
4. Calculer la moyenne de la différence d'absorbance par minute (A/min).

2.5. Dosage des paramètres de stress oxydatif

2.5.1. Préparation des homogénats

Le foie de chaque rattes est coupé en petits morceaux puis pesé environ 1 gramme et enfin l'homogénéisé à l'aide d'un mortier le pilonné dans une solution de tampon de broyage TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4). L'homogénat obtenu est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 15 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant

est récupéré dans des tubes secs est stocké à -20°C jusqu'à son utilisation pour les dosages tissulaires.

2.5.2. Dosages des protéines tissulaires

✓ Principe

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Les groupements amines ($-\text{NH}_2$) des protéines réagissent avec un réactif à base de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol et de bleu de Coomassie pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon.

✓ Mode opératoire

1. Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
2. Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
3. Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
4. Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.
5. La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.
6. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions.

2.5.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

✓ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).

✓ Réactifs

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0.375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0.01% P/V ; Chlorure d'hydrogène (HCl) 1 N 0.375 mg de TBA, 20g de TCA, 0.01g de BHT, 25 ml de HCl 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 ml et le volume complété à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

✓ Mode opératoire

Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100 μl d'échantillon, 400 μl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100°C pendant 15

minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

✓ Méthode de calcul

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1.53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/l}$.

$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de protéine}) = (\text{Do échantillon} / 1,53 \times 10^5) / \text{mg de protéine}$.

2.5.4. Dosage de l'activité enzymatique du catalase

✓ Principe

L'activité de catalase consiste à mesurer la disparition de H_2O_2 induite par la catalase contenue dans l'échantillon en mesurant l'absorbance de H_2O_2 à 560nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

✓ Mode opératoire

Dans des tubes à essais en mélanger 1ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1 M, PH7.2), 0.975 ml de H_2O_2 fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (Aebi, 1984).

✓ Expression des résultats

L'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine), selon la formule:

$\text{UI/g} = (2.3033/\text{T}) \times (\log \text{A1}/\text{A2}) / \text{g de protéine}$.

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

2.5.5. Dosage des glutathion réduit (GSH)

✓ Principe

Le complexe formé entre le GSH et l'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB), ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel présente une absorbance à 412nm (Weckbercker et Cory, 1988).

✓ Mode opératoire

Mélanger avec l'agitateur 0.8 ml de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) et laisser 15 minutes dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 t/min pendant 5minutes. Puis, prélever 0.5ml de surnageant, ajouter le 1ml de solution tampon tris avec NaCl

avec 0.025ml de DTNB (0.01mol) méthanol. Laisser le mélange 5min de température de chambre puis lire l'absorbance avec spectrophotomètre d'absorption moléculaire à 412nm contre le blanc (eau distillé).

✓ Expression des résultats

On calcule la concentration du GSH exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{GSH nM/mgdeprot} = \frac{\text{Do} \times 1 \times 1.525 \times d}{13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de prot}}$$

GSH : concentration de glutathion.

DO : la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1 : volume de mélange de protéine.

1.525ml : volume total de mélange.

13133 : constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

0.8ml : volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

0.5ml : volume de solution surnagent.

d : facteur de dilution.

2.6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du centre d'analyse pathologique Ben Bordi, service l'anapath, El Oued, la technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984) qui comporte les étapes suivantes :

2.6.1. Fixation des échantillons

Après sacrifice des rattes les reins est immédiatement introduite pendant 12 heures dans le formol à 10% permettant l'immobilisation et la fixation des structures et constituants cellulaires puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml eau distillée) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur de 1.5 mm.

2.6.2. Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide d'un appareil automatique pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spécieux.

2.6.3. Inclusion

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion ».

2.6.4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 μm . Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélative chauffée à 40° C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100° C pendant 1 heure.

2.6.5. Coloration

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoéine Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100ml d'alcool éthylique à 70% + 50ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétiques) selon les étapes suivante :

- Déparaffiner par l'utilisation de réactif le toluène. Les coupes sont passées dans 4 bains de toluène pendant 5 à 10 min chacun. Le toluène du dernier bain doit être pur.
- Hydrater les lames pour retirer le toluène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans l'éthanol l'un à 96° et l'autre à 70° d'une durée de 3 à 5 min chacun puis sont enfin lavées à l'eau courante pendant 5 min environ avant coloration.
- Coloration au hématoxyline-éosine (15 minutes) pour mettre en évidence les éléments cellulaires et tissulaires, le noyau apparaît colorée en bleu, le cytoplasme et le tissu conjonctif extracellulaire en rose.
- Les lames sont mises dans l'Hémalun acide de Mayer pendant 6 min, rincer à l'eau. Puis dans l HCl 0.5% en faisant plonger les lames 2 fois et dans lithinée 2 min avant de rincer, les faire passer dans l'éosine pendant 5 min, puis rincé 3 fois pendant 5 min.
- Déshydrater les lames colorées successivement pendant quelques secondes dans l'alcool à 70°, l'alcool à 96° et enfin dans deux bains d'alcool absolu, le premier pendant quelques secondes et le second pendant 5 min, toluène 5 min.
- Le montage et l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une goutte de l'Eukitt, une lamelle de verre sur l'échantillon histologique, qui permette l'adhérence entre la lame et la lamelle. Une légère pression sur la lamelle permet de chasser les bulles d'air.

- Après montage, les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au toluène puis observées par un microscope optique.

Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet. Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique lié à appareil photo.

2.7. Etude statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse des données a été effectuée par application du **test T de Student**, qui est basé sur la comparaison entre deux moyennes, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 13Fr) et EXCEL 2010 qui nous aide pour faire les tests et les courbes.

la signification est déterminée par la valeur $\alpha=0.05$; Si :

$P < 0.05$: Différence significative.

$P < 0.01$: Différence hautement significative.

$P < 0.001$: Différence très hautement significative.

$P > 0.05$: Différence non significative.

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition=f(concentration)].

Chapitre II
Résultats

1. Etude *in vitro*

1.1. Rendement d'extrait aqueux

Le rendement de l'extraction qui est le rapport entre le poids d'extrait et le poids de plante est 39.32 %.

1.2. Analyses phytochimiques

Les résultats des tests de criblage phytochimique préliminaire sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 06 : Résultats des tests phytochimiques d'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L.

Composés	Présence ou absence
Tanins	+
Flavonoïdes	+
Alcaloïdes	-
Saponines	-
sucres réducteurs	+
Stéroïdes	+
Terpenoïdes	+

-: absent ; +: présent

Le screening phytochimique a mis en évidence divers métabolites secondaires dans la partie aérienne de la plante : flavonoïdes, tanins, sucres réducteurs, stéroïdes et terpènes.

1.3. Analyse quantitative des composés phénoliques

1.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour l'extrait à partir d'une gamme étalon établie réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait sec (mg EAG/g ES). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,987$ (Annexe 2).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. par macération est de 131.29 mg EAG/g ES.

1.3.2. Dosage des Flavonoïdes

La teneur en flavonoïde a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,995$. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la quercétine par g de l'extrait sec (mg EQ/g ES). (Annexe 2).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes d'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. est 31.486 mg EQ/g ES.

Tableau 07 : La teneur en polyphénol et flavonoïdes au niveau des feuilles de la plante de *Daphne gnidium* L.

	Polyphénols (mg EAG/g ES)	Flavonoïdes (mg EQ /g ES)
Extrait de <i>Daphne gnidium</i> L.	131.29	31.486

1.4. Test de DPPH

Les capacités antioxydantes d'extrait de plante étudiée ont été déterminées et comparées à l'activité de composé anti-radicalaire étalon, l'acide ascorbique. Les résultats obtenus (pourcentage d'inhibitions I%) sont représentés dans la courbe d'étalonnage (Annexe 2), $Y = 0.011x + 0.155$, $R^2 = 0.964$.

Les résultats obtenus pour le test de DPPH, exprimés en termes de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50}) sont représentés dans la figure 33.

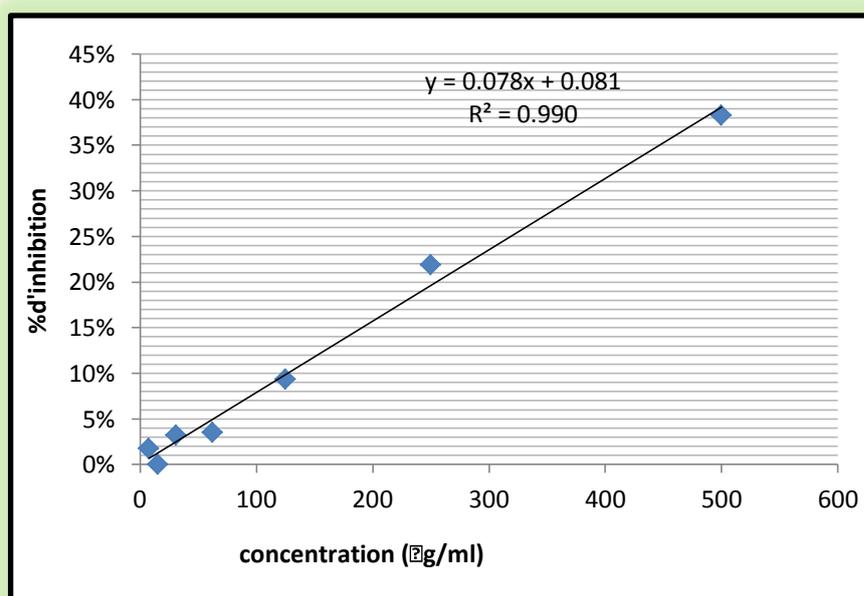


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par d'extrait de *Daphne gnidium* L.

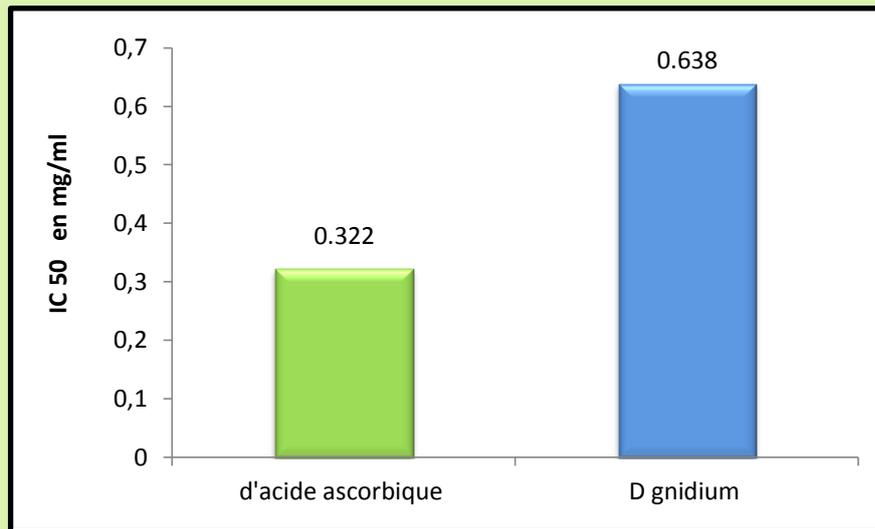


Figure 33 : IC₅₀ d'extrait de *Daphne gnidium* L. et l'acide ascorbique en mg/ml.

2. Etude *in vivo*

2.1. Effet de traitement par l'extrait de *Daphne gnidium* L. sur le taux de survie des animaux face à une intoxication massive létal par CCl₄

Tableau 08 : Le taux de survie des animaux en fonction des traitements en cas d'intoxication d'ordre létal au CCl₄

Lots	Traitement	Pourcentages de survie
3	témoin intoxiqué	0 %
7	traité avec l'extrait de <i>Daphne gnidium</i> L. puis intoxiqué	40 %

2.2. Effet de traitement par *Daphne gnidium* L. sur le poids relatif de foie

Les résultats présentés dans la figure 34 et le tableau 08 montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids relatif de foie chez les rattes traitées avec du CCl₄ seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin normal (Lot 1). Et une diminution hautement significatives ($P \leq 0,001$) chez les rattes traitées avec l'extrait seul, diminution significatives ($P \leq 0,001$) chez les rattes traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl₄ (dose 3ml/kg) (Lot 6). Ainsi une diminution non significatives ($P \leq 0,001$) est enregistré chez les rattes traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl₄ (dose 3ml/kg) (Lot 5), intoxiqué au CCl₄ (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg). (Lot 8) par rapport au lot témoin intoxiqué (Lot 2).

Tableau 09 : Poids initiale des rattes, le poids de foie et poids relatif de le foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

Lots	Poids		
	Poids corporels (g)	Poids du foie (g)	Poids relatif du foie (%)
Lot 1	173.50± 3.30	6.265±0.305	3.607±0.125
Lot 2	178.7±11.8 **	8.357±0.553	4.756±0.586 *
Lot 3	191.20±6.05	/	/
Lot 4	192.00± 6.42	7.083±0.581	3.681±0.256 ^{NS b}
Lot 5	187.40±3.85	7.924±0.516	4.216±0.207 ^{NS}
Lot 6	188.00±3.42	5.890±0.460	3.0580±0.0627 ^{NS a}
Lot 7	183.00±2.90	/	/
Lot 8	180.00± 3.46	7.967±0.398	4.419±0.230 ^{NS}

Moy ± S.E.M. de 05 rattes de chaque group.

*p < 0.05 ; **p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

^ap < 0.05 ; ^bp < 0.01 ; ^cp < 0.001 comparaison avec le lot CCl₄

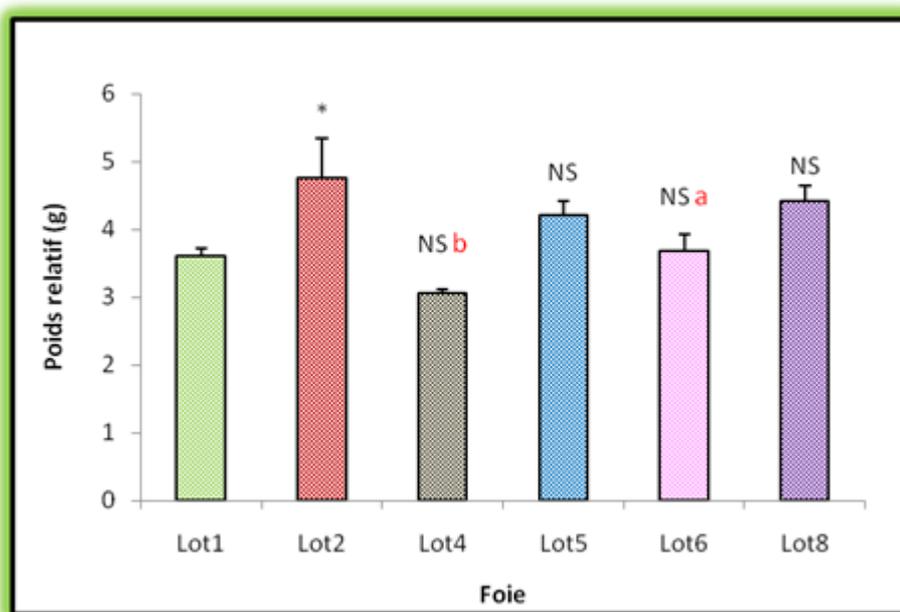


Figure 34 : Variation du Poids relatif de foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux pendant 9 jours.

Comparaison avec groupe témoin : * p< 0.05 ; ** p< 0.01,*** p< 0.001,

Comparaison avec groupe traités par le CCl₄ : ^ap<0.05; ^bp < 0.01; ^cp < 0.001, n= 5 rats.

2.2. Effet de traitement par *Daphne gnidium* L. sur des paramètres biochimiques

D'après la figure 35, nous avons observé une augmentation très hautement significatives ($P \leq 0,001$) de l'activité de transaminase TGO et TGP, chez le groupe intoxiqué par CCl_4 seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin (Lot 1).

Concernant les groupes

- Lot 4 : témoin traité non intoxiqué .
- Lot 6 : traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg).
- Lot 8 : intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg) de test curatif.

on observe une diminution très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de TGP, et diminution de façon hautement significatives ($P \leq 0,01$) du taux de TGO par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2), et une diminution hautement significatives ($P \leq 0,01$) du taux de TGP et TGO chez le groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) (Lot 5) par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2).

Les résultats de paramètres biochimiques présentés dans le figure 36 (Bilans hépatiques : PAL, γ -GT, BT et BC) montrent une augmentation du taux de PAL de façon hautement significatives ($P \leq 0,01$), une augmentation très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de γ -GT, BT et BC chez le groupe intoxiquée par CCl_4 seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin (Lot 1).

Concernant le groupe témoin traité non intoxiqué (Lot 4) et lot traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) (Lot 6), on observe une diminution très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de PAL, BT et BC et diminution significatives ($P \leq 0,05$) du taux de γ -GT, par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2).

Chez le groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) (Lot 5), on observe une diminution très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de PAL, BT et BC, et diminution significatives ($P \leq 0,05$) du taux de γ -GT, par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2).

Et pour le groupe intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg) de test curatif (Lot 8), on observe une diminution

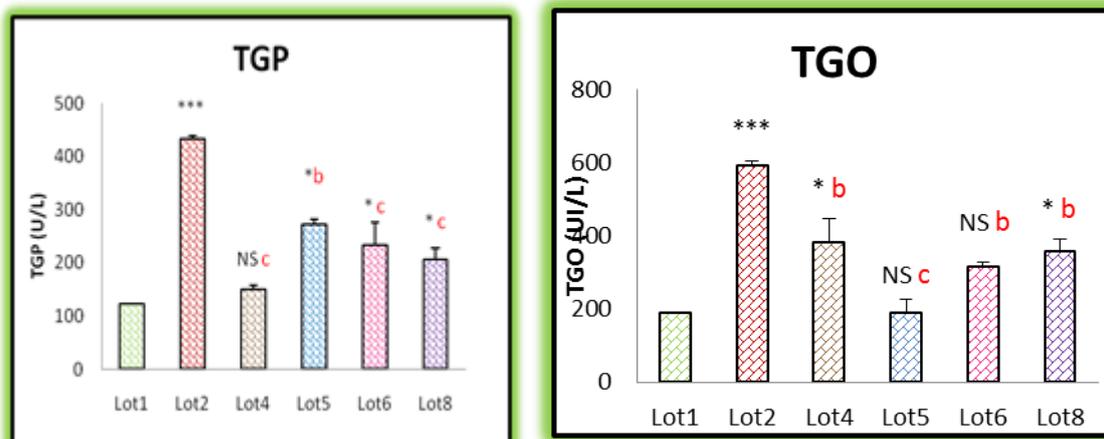


Figure 35 : Variations des enzymes TGO et TGP chez le groupe témoin et les différents groupes expérimentaux

* p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

^a p < 0.05 ; ^b p < 0.01 ; ^c p < 0.001 comparaison avec le lot CCl₄

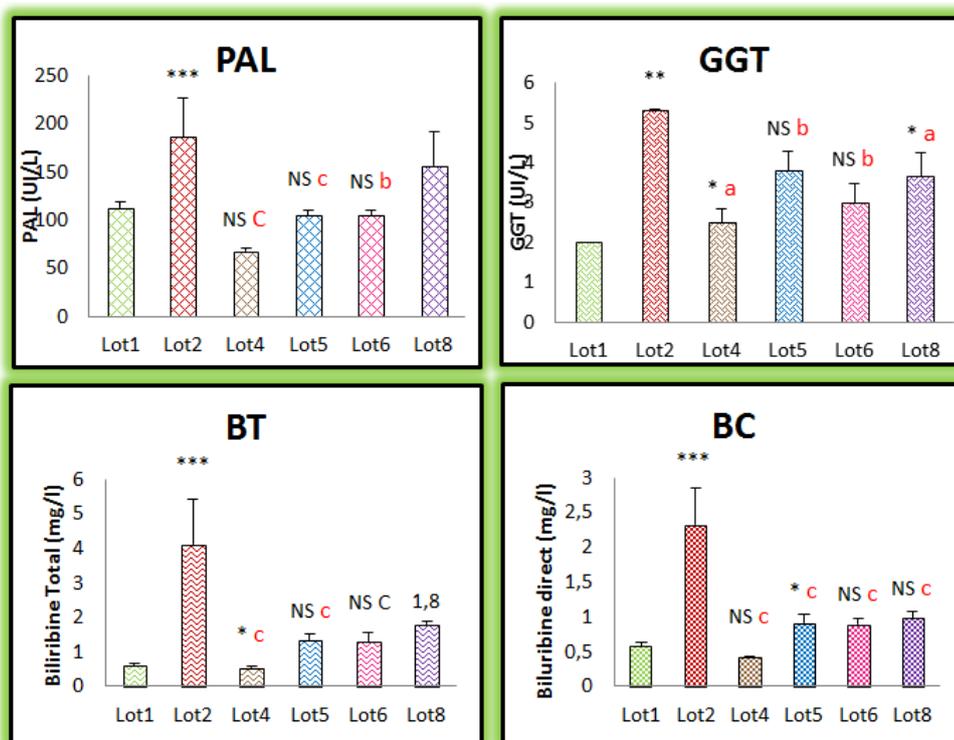


Figure 36 : Variation de l'activité de PAL, GGT, bilirubine totale et directe chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

* p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

^a p < 0.05 ; ^b p < 0.01 ; ^c p < 0.001 comparaison avec le lot CCl₄

très hautement significatives ($P \leq 0,001$) du taux de BT et BC, diminution de façon significatives ($P \leq 0,05$) du taux de γ -GT et diminution non significatives ($P > 0,05$) du taux de PAL, par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2).

2.3. Effet du traitement par *Daphne gnidium* L. sur les paramètres tissulaires du stress oxydatif chez les rats

Les résultats présentés dans la figure 36, montrent une augmentation du taux de MDA de façon hautement significative ($P \leq 0,01$), chez le groupe intoxiqué par CCl_4 seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin normale (Lot 1), et une diminution du taux de MDA de façon :

- très hautement significatives ($P \leq 0,001$), chez le lot 4 (groupe témoin traité non intoxiqué) et le Lot 6 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg)),

- hautement significatives ($P \leq 0,01$), chez le lot 5 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg)) et le lot 8 (groupe intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg) de test curatif),

du taux de MDA par rapport au groupe témoin intoxiqué (Lot 2).

Une augmentation de l'activité de catalase de façon hautement significative ($P \leq 0,01$), est enregistrée chez le groupe intoxiqué par CCl_4 seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin normale (Lot 1). et une diminution de l'activité de catalase de façon :

- très hautement significatives ($P \leq 0,001$) le Lot 6 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg).

- hautement significatives ($P \leq 0,01$), Chez le Lot 8 (groupe intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg) de test curatif)

- significatives ($P \leq 0,05$) chez le lot 4 (groupe témoin traité non intoxiqué) et le Lot 5 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg).

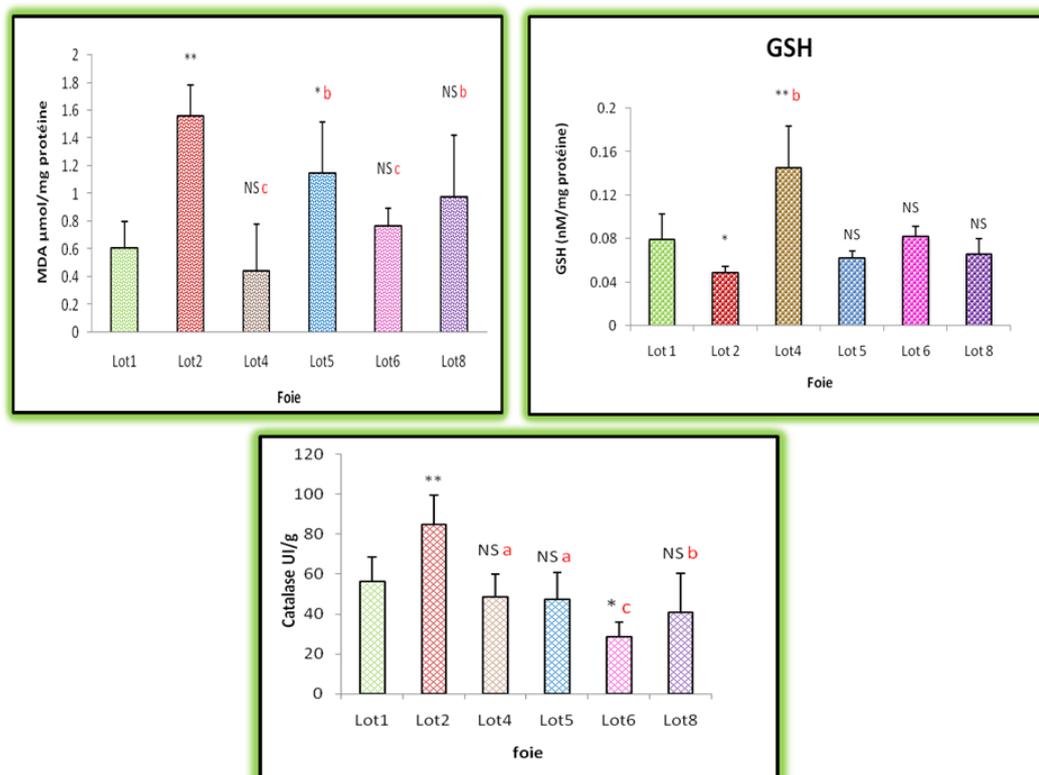


Figure 37 : Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) et glutathion réduit (GSH) et activité de catalase chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

Les résultats montrent aussi une diminution significative ($P \leq 0,05$) du taux de GSH chez le groupe intoxiqué par CCl_4 seul (Lot 2) par rapport au groupe témoin normale (Lot 1), et une augmentation du taux de GSH de façon :

- hautement significatives ($P \leq 0,01$) chez le lot 4 (groupe témoin traité non intoxiqué)
- non significatives ($P > 0,05$) chez le Lot 5 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1(100 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg), le Lot 6 (groupe traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 2 (200 mg/kg), puis intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg)) et le Lot 8 (groupe intoxiqué au CCl_4 (dose 3ml/kg) puis traité avec l'extrait de *Daphne gnidium* L. de dose 1 (100 mg/kg) de test curatif), par rapport au groupe témoin intoxiquée (Lot 2).

2.5. Étude histologique

Des coupes histologiques ont été réalisées au niveau de tissus du foie, pour avoir l'effet des substances actives de l'espèce *Daphne gnidium* L. contre une hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone.

La Structure histologique du foie chez les rattes du lot témoin normale est représentée dans la figure 38. Les résultats montrent des hépatocytes avec un noyau rond; les hépatocytes forment des travées bien agencées autour de la veine centro-lobulaire. Ces travées sont

séparées par des sinusoides. La figure 39 montre une inflammation légère chez les rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl₄ 3ml/kg.

On observe ainsi une destruction cellulaire, régénération des hépatocytes et hémorragie chez les rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl₄ 6ml/kg (figure 40).

On observe une aspect normale des hépatocytes, chez des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg (figure 41) .

La structure histologique du foie des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 200mg/kg puis intoxiqué par le CCl₄ 3ml/kg (test préventive).montre une nécrose persistante, alors que celle des rattes intoxiqués par le CCl₄ 3ml/kg puis traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg (test curative) montre des hépatocytes ayant un aspect histologique sub-normal, l'inflammation des hépatocytes est minimale avec un nécrose hépatocyttaire moins important.

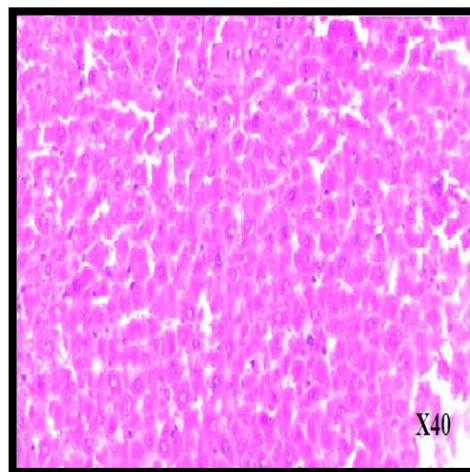


Figure 38 : Structure histologique du foie chez les rattes du lot témoin normal.

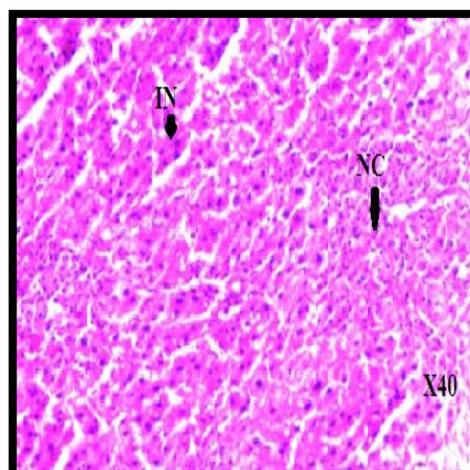


Figure 39 : Structure histologique du foie des rattes témoin intoxiqué par le CCl₄.
IN : Inflammation; NC : Nécrose.

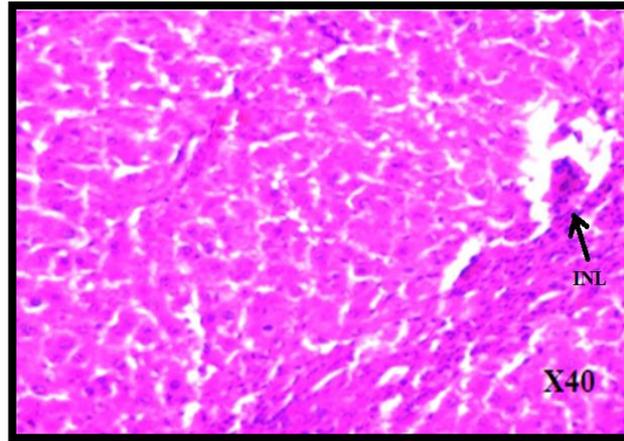


Figure 40 : Structure histologique du foie des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl₄ 3ml/kg.

INL: inflammation légère

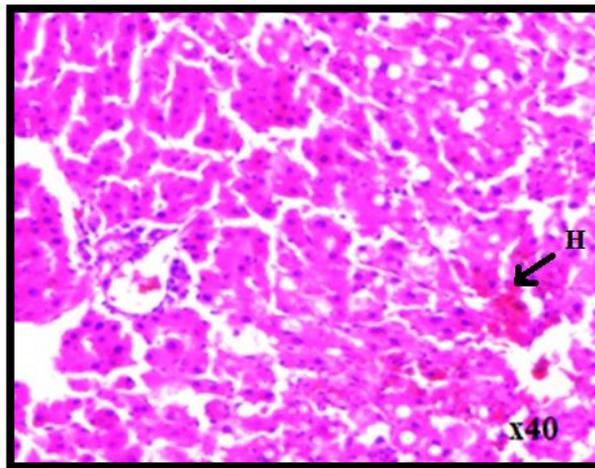


Figure 41 : Structure histologique du foie des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg puis intoxiqué par le CCl₄ 6ml/kg.

H : hémorragie

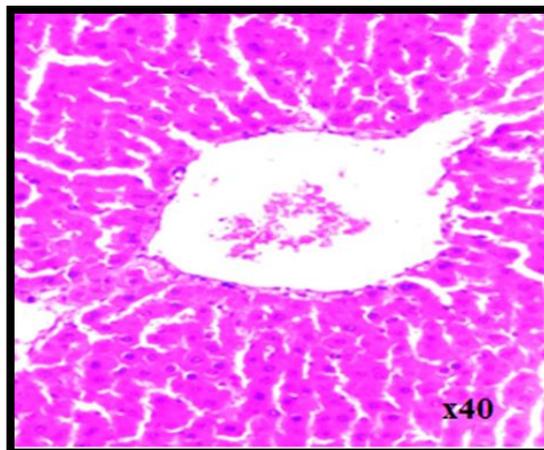


Figure 42 : Structure histologique du foie des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg.

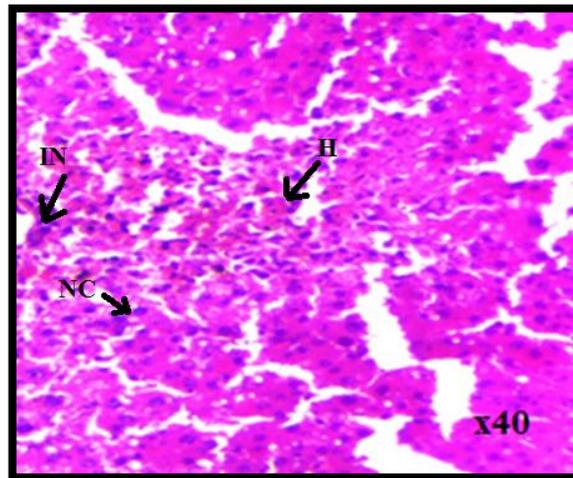


Figure 43 : Structure histologique du foie des rattes traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 200mg/kg puis intoxiqué par le CCl_4 3ml/kg (test préventive).

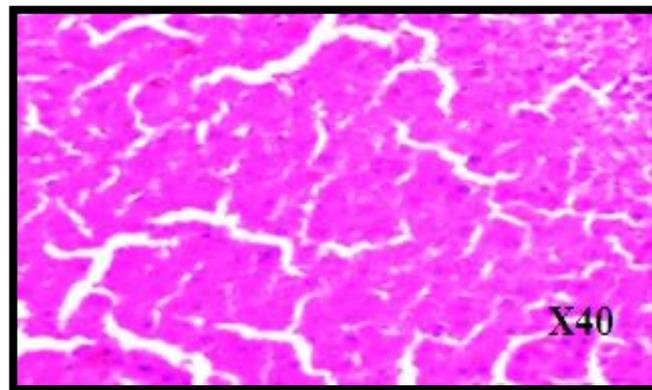


Figure 44 : Structure histologique du foie des rattes intoxiqué par le CCl_4 3ml/kg puis traitée par *Daphne gnidium* L. avec dose 100mg/kg (test curative).

Chapitre III
Discussions

Discussions

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur l'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. ont montré la présence de certains composés actifs, tanins, flavonoïdes, terpenoïdes, stéroïdes et le sucres réducteurs, alors que les alcaloïdes et saponines sont absents. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Mohammedi (2013).

Le teneur en polyphénols était estimé à 131.29 mg EAG/g dans l'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. Ce résultat est en accord avec la littérature (Didi, 2009).

Les résultats quantitatifs des flavonoïdes, révèlent que sa teneur était estimée à 31.486 mg de EQ/g ES. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Didi, 2009).

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques sont considérer comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Li et *al.*, 2007). La détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes à partir d'extraits à base de plantes est nécessaire pour étudier le potentiel des plantes pour la prévention contre les maladies et est la première étape dans la détermination de l'activité antioxydante des extraits des plantes (Tosun et *al.*, 2009).

D'après Dif (2015), la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes d'extrait brut méthanolique de *Daphne gnidium* L. selon les stations est estimés à (288,21 à 385,49 mg EAG/g ES) et (11,59 à 15,52 mg EC/g ES) respectivement. Ces résultats sont relativement très élevées par rapport à nos résultats pour les polyphénols et relativement très faible par rapport à nos résultats pour les flavonoïdes.

Par contre, des résultats relativement très faibles par rapport à nos résultats, sont rapportés par Mohammedi (2013).

Concernant l'activité antioxydante, diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturelles à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres: la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (Mohammedi, 2013). L'évaluation de l'activité antioxydant s'est portée sur l'application de test de DPPH par méthode spectrometrique.

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres (Bougandoura, 2011) ; celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et *al.*, 2008).

Dans la présente étude, l'extrait a un pouvoir anti-radicalaire puissant. Le résultat d'IC₅₀ est de 0.638mg/ml.

L'activité anti-oxydante des plantes du à leur richesse en métabolites secondaire. Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants, susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van et *al.*, 1995). 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'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fl-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stables (Jovanovic et *al.*, 1994).

Les troubles hépatiques sont un problème commun dans le monde, en particulier dans les pays en développement. Cependant, il n'existe pas de médicaments efficaces capables de réguler et de restaurer l'intégrité fonctionnelle du foie. Ces dernières années, les scientifiques ont mené une recherche marquée sur la médecine traditionnelle dans le but de développer de nouveaux médicaments et leurs formulations pour préserver les mécanismes physiologiques hépatiques normaux. Les composés qui peuvent soit diminuer les dommages nécrotiques aux hépatocytes via des mécanismes de défense améliorés contre une agression toxique, soit améliorer la réparation des dommages hépatocytes sont considérés comme potentiellement utiles dans le traitement des troubles hépatiques humains (Perrissoud et Testa, 1982).

Le CCl₄, un toxique bien connu pour la production de lésions hépatiques chimiques chez les animaux a été utilisé comme modèle expérimental pour tester l'activité hépatoprotectrice potentielle des médicaments par plusieurs investigateurs (Bigoniya et Singh, 2014; Weber, 2003; YiC, 2013).

Nos résultats ont révélé que les rattes traitées avec du CCl₄ seul présentaient une augmentation du poids relatif du foie par rapport au groupe témoin normal. Nous indique une hépatomégalie provoquée par le produit chimique, le CCl₄. Ce résultat est en accord avec plusieurs études (Huang et *al.*, 2012; Kamble, 2008).

Il ressort des résultats que les animaux ayant reçu le CCl₄ et traités par l'administration préventive et curative de l'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. présentaient une normalisation du poids relatif du foie. Ces résultats suggèrent que le traitement par l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. a significativement neutralisé l'effet toxique de CCl₄ et a montré une bonne récupération de la santé générale des animaux traités.

Il y a une augmentation significative des niveaux d'enzymes (paramètres biochimiques) TGO, TGP, PAL, γ -GT et bilirubine sérique chez les lots intoxiqué par le CCl₄ par rapport au contrôle normal. Nos résultats concordent avec les résultats publiés par Djahra (2014); Yimam et *al.* (2016) Ceci indique une fuite cellulaire et une perte d'intégrité fonctionnelle

dans le foie. En particulier, l'augmentation du taux sérique de TGO indique des lésions hépatiques. Ces enzymes sont situées dans le cytoplasme des cellules et sont vidées dans la circulation une fois que la membrane cellulaire est endommagée (Adewale et *al.*, 2014). Les agents chimiques entraînant une lésion suffisante du parenchyme hépatique provoquent une élévation de la concentration plasmatique de bilirubine (Darbar, 2011), ce qui peut être expliqué par un mauvais fonctionnement du foie qui ralentit leur évacuation dans la bile. Robinson (1990) a mentionné que la PAL est une enzyme marqueur de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique. Il est souvent utilisé pour évaluer l'intégrité de la membrane plasmique du foie (Abubakar et *al.*, 2010). Par conséquent, une augmentation significative de PAL sérique suite au traitement par CCl₄ peut être due à une rupture de la membrane plasmique (Awada et *al.*, 2017).

Le changement de l'activité de ces enzymes peuvent résulter de nombreuses affections, y compris une nécrose cellulaire, une fuite cellulaire et une perte de l'intégrité fonctionnelle de l'architecture de la membrane des tissus (Wang et *al.*, 2012).

Dans la présente étude, L'effet protecteur d'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. entraîne une réduction concomitante des activités enzymatiques sériques des TGO, TGP, γ -GT et PAL par rapport au groupe traité par le CCl₄. La diminution des niveaux de transaminases indiquent la stabilisation de la membrane plasmique et la protection des hépatocytes et maintenaient une physiologie hépatique normale et entraînaient une stabilisation de la membrane plasmique et une régénération des cellules hépatiques endommagées. Ces résultats suggèrent que le d'extrait aqueux de feuilles de *Daphne gnidium* L. possède des propriétés protectrices contre les lésions hépatiques induites par CCl₄ due à la présence de métabolite secondaire : les polyphénols et les flavonoïdes (quercitine, lutéoline,...). Ces composés sont connus par des propriétés antioxydantes et ont des applications dans le traitement des maladies du foie (Gnanadesigan, 2016).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production de ERO et son élimination (Sanzgiri, 1997). Les ERO, qui sont générés comme produits du métabolisme oxydatif, endommagent fréquemment les macromolécules cellulaires telles que l'ADN et les lipides (Lee, 2016). Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans les lésions hépatiques induites par CCl₄; il est médiée par la production de dérivés de radicaux libres de CCl₄ et est responsable des dommages de la membrane cellulaire et la libération consécutive d'enzymes marqueurs de l'hépatotoxicité (Chiu et *al.*, 2017).

CCl₄ est métabolisé par le cytochrome P450 dépendant des oxygénases, principalement à travers l'isoforme CYP2E1 dans le réticulum endoplasmique et les

mitochondries. L'hépatotoxicité est produite par la formation du radical trichlorométhyl (CCl_3), très réactif (Delgado, 2016; Lu, 2016). Ces radicaux libres réagissent avec l'oxygène pour former des radicaux trichlorométhylperoxy ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$), qui déclenchent une réaction en chaîne de la peroxydation lipidique et attaquent et détruisent les acides gras polyinsaturés, en particulier ceux associés aux phospholipides (Jain, 2008). Ces radicaux peuvent saturer le système de défense antioxydant de l'organisme, qui cause plus de complications hépatiques et anomalies fonctionnelles. Pour cette raison, la peroxydation lipidique est considérée comme un facteur critique dans la pathogenèse des lésions hépatiques induites par CCl_4 (Delgado, 2016).

Nos résultats indiquent une augmentation bien définie de concentration de MDA tissulaire de foie chez les rattes traitées par le CCl_4 par rapport aux témoins normal. Ces résultats sont en accord avec les études des Elberry et al. (2010); Kalu et al. (2011); Mahmoud et al. (2015). Le CCl_4 attribuaient l'augmentation des taux de MDA à une peroxydation lipidique accrue, conduisant à des dommages tissulaires (Adewale, et al., 2014) et une défaillance des mécanismes de défense antioxydants (Cheng, 2013). L'augmentation de la MDA en tant que caractéristique de la lésion hépatique est également considérée comme un marqueur de la peroxydation lipidique (Kitts, 1998; Mateos et al., 2005).

Nos résultats montrent que le traitement des rattes par l'administration préventive et curative de l'extrait des feuilles de *Daphne gnidium* L. empêche de manière significative l'augmentation de la concentration de MDA induite par le CCl_4 dans le foie. Suggérant que l'extrait des feuilles de *Daphne gnidium* L. exerce un effet hépatoprotecteur peut être due à sa propriété antioxydante. Les flavonoïdes peuvent également agir comme désactivateurs des radicaux libres, Ce qui a un effet direct sur la formation de malondialdéhyde (Kwang et al., 2003).

Alors que le GSH était significativement diminué chez les rattes traitées par le CCl_4 , Ces résultats sont en accord avec les études des (Awada, 2017; Kalantari, 2017). Une réduction du GSH est associée à l'accumulation de radicaux libres, ce qui entraîne une lésion de la fonction cellulaire (Okamoto et Colepicolo, 1998). Dans les lésions hépatiques induites par le CCl_4 , le GSH joue un rôle important dans la détoxification des métabolites toxiques du CCl_4 (Deng, 2012). Le GSH peut être combiné avec le métabolite toxique de CCl_4 , en présence de l'activité catalytique GST, qui contribue à la détoxification de CCl_4 . Il participe également à la détoxification de H_2O_2 (Volodymyr, 2011).

Le GSH est un principal antioxydant intracellulaire qui joue plusieurs rôles principaux dans une cellule, notamment les effets antioxydants, le maintien de l'état redox, la

détoxification des xénobiotiques et la protection contre les radicaux libres, les toxines et les peroxydes (Ai, 2013 ; Townsend, 2003). Il est bien connu que l'épuisement de la GSH réduite entraîne une peroxydation lipidique accrue et une peroxydation lipidique surabondante peut entraîner une augmentation de la consommation de GSH (Dong, 2014). Par conséquent, il est important de maintenir des niveaux suffisants de GSH pour la prévention des dommages induits par CCl₄.

Les résultats de la présente étude ont indiqué que l'augmentation de niveau de GSH chez les rattes traitées par le CCl₄ avant et après l'administration de l'extrait, suggérant que le l'extrait de *Daphne gnidium* L. possède la capacité d'éliminer les radicaux libres et protège les cellules contre les radicaux libres.

Intoxication par le CCl₄ affecte également les activités de la catalase. Tous les organismes utilisant de l'oxygène sont équipés de systèmes antioxydants bien organisés pour prévenir les dommages causés par les radicaux libres. Ces enzymes agissent comme la première ligne de défense contre le stress oxydatif induit par les radicaux libres (Ganie, 2011). La catalase neutralise H₂O₂ nocif à l'oxygène et à l'eau, et est en excès, causer des dommages graves à des lipides, l'ARN et l'ADN (Patel *et al.*, 2013).

Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité de catalase dans le foie chez les rattes traitées par le CCl₄. L'augmentation de l'activité de ce enzyme peut expliquer par la capacité de défense équipé par l'organisme (le système antioxydant) qui servent à contre balancer l'effet des oxydants. Donc, on peut dire que dans le cas de stress, l'organisme induit une augmentation de l'activité des enzymes antioxydants pour réduire l'effet des oxydants (Birben *et al.*, 2012).

Nous avons observé une restauration de l'activité de catalase chez les rattes traitées par le CCl₄ avant et après l'administration de l'extrait, ce qui suggère l'effet protecteur de cette plante contre les dommages oxydatifs induits par le CCl₄.

L'examen histopathologique du foie du groupe témoin normal a montré une disposition normale des hépatocytes, avec des noyaux clairement visibles, une veine centrale et une triade portale par rapport aux rattes témoins intoxiqué par le CCl₄ que présentaient une changements majeurs dans architecture hépatique induite par CCl₄ entraînaient une augmentation de la vacuolisation, de l'inflammation et de la nécrose.

Dans les systèmes biologiques, la production anormale de radicaux libres entraîne une nécrose cellulaire et des lésions tissulaires (Hung, 2006). Dans le foie, le métabolisme de CCl₄ stimule la peroxydation lipidique et augmente la production des ERO, ce qui est important car les lipides peroxydés et les ERO provoquent une nécrose hépatocytaire, induisent une

inflammation et stimulent la progression de la fibrose hépatique (Lee, 2016). Les altérations histologiques observées au niveau des hépatocytes sont caractérisées par l'apparition des nécroses, des infiltrats inflammatoires, une congestion, des destructions des parois vasculaires, une perte des jonctions intercellulaires, une stase veineuse et l'apparition de nodules de régénération. Des altérations histologiques similaires ont été observées par Elberry et *al.*, (2010); Djahra (2014).

Nos résultats ont montré que les lésions hépatiques ont été réduites par prétraitement avec l'extrait des feuilles de *Daphne gnidium* L.

Les rats traités au CCl₄ puis avec l'extrait ont enregistré une amélioration des cellules hépatiques avec plus ou moins la même structure que la normale.

La capacité des substances hépatoprotectrices à réduire les effets dommageables ou à préserver les mécanismes du fonctionnement du foie contre les perturbations d'une hépatotoxine, est un indice de son effet protecteur (Krishna et *al.*, 2010).

Les propriétés hépatoprotectrices ont confirmé le rôle des terpénoïdes et des composés phénoliques comme antioxydants. Les terpènes et les composés stéroïdiens agissent comme des antioxydants directs grâce à des mécanismes de piégeage des radicaux libres et / ou des antioxydants indirects en améliorant le statut antioxydant (enzymatique et non enzymatique). En outre, les phénoliques médient l'expression des enzymes antioxydantes qui jouent un rôle important dans la protection du foie contre les effets indésirables liés à la mutagenèse et à l'oxydation (Yeh et Yen, 2006).

CONCLUSION

Conclusion

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique, le pouvoir anti-radicalaire et l'investigation de l'activité hépatoprotectrice de l'extrait aqueux de feuilles de *Daphne gnidium* L. chez les rattes *Wistar Albinos*.

Le screening phytochimique a montré la présence des flavonoïdes, sucres réducteurs, tanins, stéroïdes et terpenoïdes.

L'analyse quantitative montre la richesse de *Daphne gnidium* L. en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les résultats montrent une activité antioxydante puissante par le test du piégeage du radical libre DPPH, avec une Valeur IC₅₀ de 0.638 mg/ml, qui est une valeur très importante par rapport à l'acide ascorbique (0.322 mg/ml).

L'intoxication aiguë au CCl₄ induit une hépatopathie qui se définit par une anomalie des tests biochimiques; élévation de l'activité sérique des transaminases (au-delà de deux fois la normale), La phosphatase alcaline, γ -glutamyl transférase, bilirubine (totale et conjuguée), des lésions de nécrose hépatocytaire localisée dans les zones centro-lobulaires et un stress oxydant estimé par élévation de peroxydation lipidique hépatique (Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde), et d'activité de catalase et diminution de glutathion réduit.

Des anomalies moins sévères presque inexistantes chez les rattes administrées l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. pendant 9 jours successives et intoxiquée par le CCl₄ au 7^{ème} jour de traitement.

L'administration (sept jours de traitement avant l'intoxication) de l'extrait aqueux de notre plante face à une hépatotoxicité létale par le CCl₄, permet d'obtenir un taux de mortalité inférieur à celui d'un lot témoin intoxiqué par une dose létale, ce qui signifie un effet préventif très important de notre plante.

Dans la présente étude, l'extrait aqueux des feuilles de *Daphne gnidium* L. présente un effet protecteur curatif contre une hépatotoxicité non létale, entraînant une réduction concomitante des activités enzymatiques sériques des TGO, TGP, γ -GT et PAL par rapport au groupe traité par le CCl₄.

Une perturbation dans les paramètres biochimiques sériques et hépatiques analysés et paramètres tissulaires du stress oxydatif ainsi que des lésions hépatocytaires localisées dans les zones centro-lobulaires sont observées à partir de l'étude histologique chez les rattes témoins intoxiquées par le CCl₄. Ces lésions régressent avec le temps chez les animaux intoxiqués et traités par l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. pendant 9 jours. Cette étude a

permis donc de montrer le potentiel antihépatotoxique dose dépendant de l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. .

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Abadjian, G. (2006).** Université St Joseph, Beyrouth, LIBAN. L'HISTOLOGIE DES ORGANES Ed. 2006. [En ligne]. http://www.eopathologies.com/acad/h_cd/index.html
- 2-**Abetti, S. (2014).** Etude phytochimique et pouvoirs antioxydant et vasodilatateur des extraits de trois plantes du nord de Maroc (*Daphne gnidium*, *Origanum longatum*, *Cistus villosus*), Mémoire Master, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques.
- 3- **Abou, B., Yapi H. F., Gnahoué G. & Djyh, B. N. (2015).** Evaluation of the hepatoprotective activity of the ethanol extract of *Gomphrena celosioides*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 5 (4), 2231-2560.
- 4- **Abubakar, M.G., Lawal, A. & Usman, M.R. (2009).** Hepatotoxicity studies of sub-chronic administration of aqueous stem bark of *Khaya senegalensis* in albino rats. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 3(1), 26-28. En ligne : <https://www.ajol.info/index.php/bajopas/article/view/58560/46902>
- 5- **Adewale, O.B., Adekeye, A.O., Akintayo, C.O., Onikanni, A. & Saheed, Sabiu. (2014).** Carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage in experimental Sprague Dawley rats: Antioxidant potential of *Xylopias aethiopicus*. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(2), 118-123. En ligne : www.phytopharmajournal.com
- 6-**Aebi, (1984).** Catalase. In L. Pacher (ED). *Method in enzymology* académiepress. Oelamode, 105: 121-126.
- 7- **Ahsan, H., Ali, A. & Ali, R. (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 131(3), 398-404. doi : 10.1046/j.1365-2249.2003.02104.
- 8- **Ai, G., Liu, Q., Hua, W., Huang, Z. & Wang, D. (2013).** Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot*(L.) Medic: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 794-802. doi : 10.1016/j.jep.2013.02.00
- 9- **Aminata, N. (2006).** Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE), Thèse de doctorat en pharmacie, université de BAMAKO.
- 10- **Association Maladies Foie Enfants.** Description du foie. *AMFE*. [En ligne] [Citation : 1 Septembre 2015.] <http://www.amfe.fr/maladies/description-du-foie/>.

- 11- Awada, N. E., Kassemb, H. A., Hamed, M. A., El-Fekya, A. M., & El-Naggard, M.A.A. (2017). Hepatoprotective evaluation and isolation of the major secondary metabolites from the ethyl acetate extract of liquid culture filtrate of *Chaetomium globosum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97 (2018), 174-180. doi : 10.1016/j.biopha.2017.10.120
- 12- Azzi, R. (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- 13- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/ Sciences*, 3 (22), 266-272. doi : 10.1051/medsci/2006223266
- 14- Bendjaffer, K. & Zehani, L. (2015). Etude de l'effet protecteur d'une plante médicinale endémique appartenant au genre *Genista* vis-à-vis la toxicité hépatique provoquée par la gentamicine. Mémoire de Master Domaine en Sciences de la Nature et de la Vie non publié, Université des Frères Mentouri Constantine.
- 15- Benhamou, JP. (2002). Hépatologie clinique. Paris: Flammarion médecine-sciences.
- 16- Beniston, N.T. & Beniston, W.S. (1984). Fleurs d'Algérie, Entreprise National du livre.
- 17- Bergmeyer, H.U. & al. (1978). Clin Chem, 24, 58-73. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80027.
- 18- Berra, D. (2015). Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria pubescens*. Mémoire Master académique, non publiée, université Echahid Hamma Lakhdar El Oued.
- 19- Berson, A. (2005). Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale. *Hépatogastro*, 12(3), 191-198.
- 20- Bigoniya, P. & Singh, C.S. (2014). Hepatoprotective activity of a standardized polyherbal liver formulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(10), 4209-4218. doi : 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(10). 4209-18
- 21- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5(1), 9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

- 22- Bisson, M., Heuze, G., Joachim, S., Lacroix, G., Lefevre, J.P. & Strub, M.P. (2005).** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Tétrachlorure de carbone. INERIS. Version 2 : 5-7
- 23- Boll, M., Weber, L. W. D., Becker, E. & Stampfl, A. (2000).** Hepatocyte Damage Induced by Carbon Tetrachloride: Inhibited Lipoprotein Secretion and Changed Lipoprotein Composition. *Institute of Toxicology, GSF - National Research Center for Environment and Health, Z. Naturforsch, 56(1)*, 283-290.
- 24- Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A. & Ziyat, A. (2002).** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Ethnopharmacology forum, Int J Diabetes and Metabolism, 10(1)*, 33-50.
- 25- Boudjelal, A. (2012).** Extraction et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées de la région de M'sila, Algérie. Thèse de doctorat, Université badji Mokhtar. Annaba.
- 26-Bougandoura, N. (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Saturejacalaminthasspnepta* (nabta) et *Ajugaiwa* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire Magister. Université Abou BakrBelkaid, Tlemcen. .
- 27- Bouguerne, B. (2012).** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et de leur propriétés biologiques vis-à-vis maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de Doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- 28- Bourlière, M. (2000).** Comment évaluer la fibrose hépatique en dehors de la PBH ?, Tirés à part : Marc Bourlière, Service d'hépto-gastroentérologie, Hôpital Saint-Joseph, 135-148.
- 29- Bouzid, W. (2009).** Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. Mémoire de magister, Université El-Hadj Lakhder, Batna.
- 30- Bradford, M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Academic Press, 72 (57), 248-254. En ligne http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf.
- 31- Brewer, S. (2008).** Preserving Beef Quality with Natural Antioxidants, *WHITE PAPER : Natural Antioxidants*, 1-16.
https://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/PE_White_%20Papers/Preserving_Bee_f_with_Natural_Antioxidants.pdf

- 32- Bruno, R. (2016).** Les Dosages sanguins liés aux maladies hépatiques. Centre Hépatobiliaire Paul Brousse. [En ligne] 02/12/2016. <http://www.centre-hepato-biliaire.org/soin-traitement/examens/dosage-sanguin.html>
- 33- Burk, R. (2002).** Selenium, an Antioxidant Nutrient, *Nutrition in clinical care*, 5(2), 75-79. doi : 10.1046/j.1523-5408.2002.00006.x
- 34- Cadenas, E. & Davies, J.A. (2000).** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 222-230. doi : 10.1016/s0891-5849(00)00317-8
- 35- Cai, H. & Harrison, D. G. (2000).** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : The role of oxidant stress. *American heart association*, 87(10), 840-844. En ligne : <http://circres.ahajournals.org/content/87/10/840>
- 36- Camille, M. & Mireille, S. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. 27(4), 405-12.
- 37- Chengfang, Y., Li, L., Zuheng, M., Yujuan, Z., Wenxiao, P., Meili, X., Shuping, F. & Yongwen, L. (2018).** Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Experimental and therapeutic medicine* 15: 2228-2238.
- 38- Cillard, J. & Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations, *DOSSIER*, 13(1), 24-29. doi : org/10.1051/ocl.2006.6666
- 39- Cantin, PA. (1999).** Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation, Moss J. New York: Dekker, 519-531.
- 40- Caroch, M. & Ferreira, I. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. 1-39. En ligne : <https://pdfs.semanticscholar.org/4e66/a36a8c9a2259b2f88df57919f90040c7cbc5.pdf>
- 41- Chaabane, F., Boubaker, J., Loussaif, A., Neffati, A., Kilani-Jaziri, S., Ghedira, K. & Chekir-Ghedira, L. (2012).** Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *Daphne gnidium* leaf extracts, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(153), 1-10. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/153>

- 42- Chaouki, W., Leger, D.Y., Liagre, B., Cherrah, Y., Beneytout, J.L. & Hmamouchi, M. (2009).** Roots of *Daphne gnidium* L. inhibit cell proliferation and induce apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmazie*, 64(8), 542-6. doi : 10.1691/ph.2009.9502
- 43- Cheng, N., Ren, N., Gao, H., Lei, X., Zheng, J. & Cao, W. (2013).** Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄ induced acute liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, Vol55, 234-240. Doi : 10.1016/j.fct.2012.11.022
- 44- Chiu, Y. J., Chou, S. C., Chiu, C. S., Kao, C. P., Wu, K. C., Chen, C. J., Tsai, J. C. & Peng, W. H. (2017).** Hepatoprotective effect of the ethanol extract of polygonumorientale on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *journal of food and drug analysis*, 26 (2018), 369-379. doi : 10.1016/j.jfda.2017.04.007
- 45- Chu, W. L., Lim, Y.W., A K, R. & Lim, P.E. (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8. doi : 10.1186/1472-6882-10-53
- 46- Comhair, & Erzurum. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283 (2), 246-255. doi.org/10.1152/ajplung.00491.2001
- 47- Corentin. (2005),** Iatrogénie et fonctions hépatiques. Thèse doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier.
- 48- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Caus, M., Pompei, R. & Bonsignore, L. (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4), 302-305. doi : 10.1078/0944-7113-00036
- 49- Cuendet, M., Hostettmann, K. & Potterat, O. (1997).** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, *Medicinal and biological Chemistry*, 80 (4), 1144-1152. doi : 10.1002/hlca.19970800411
- 50- Darbar, S., Bhattacharya, A. & Chattopadhyay, S. (2011).** Antihepatoprotective potential of livina, a polyherbal preparation on paracetamol induced hepatotoxicity: A comparison with silymarin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical*, 4(1),72-77. En ligne : <https://innovareacademics.in/journal/ajpcr/Vol4Issue1/168.pdf>
- 51- Deby-Dupont, G., Deby, C. & Lamy, M. (2002).** Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 11(1), 28-39. doi : 10.1016/S1624-0693(01)00208-0

- 52- Defraigne, J.O. & Pincemail, J. (2008).** stress oxydant et antioxydants : Mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63(1), 10-19. En ligne: <https://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/20796/1/292.pdf>
- 53- Delattre, J., Beaudoux, J.L. & Bonnefont, R. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales* Paris, 353 - 376. En ligne : <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/radicaux-libres-et-stress-oxydant/delattre/descriptif-9782743009731>
- 54- Delgado, M.C., Cordero, P.P., Salazar, A. R. & Waksman, M.N. (2016).** Models of hepatoprotective activity assessment. *Medicina Universitaria*, 17(69), 222-228.doi : .10.1016/j.rmu.2015.10.002
- 55- Deng, J.S., Chang, Y.C., Wen, C.L., Liao, J.C., Hou, W.C., Amagaya, S., Huang, S.S. & Huang, G.J. (2012).** Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Vitisthunbergii* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in rats through anti oxidative activities. *Journal of Ethnopharmacology* 142(3),795-803. doi : 10.1016/j.jep.2012.06.003
- 56- Denis, C., Daniel, A. & Rene, A. (2006).** Chirurgie du foie et de l'hypertension portale.
- 57- Dharmendra, S., Poonam, S., Abhishek, G., Shikha, S., Ekta, S. & Rajeev, N. (2012).** Qualitative Estimation of the Presence of Bioactive Compound in *Centella Asiatica*: An Important Medicinal Plant. *International Journal of Life Science and Medical Science*, 2(1), 5-7.doi: 10.5963/LSMR0201002
- 58- Di C. G., Mascolo, N., Izzo A. A. & Capasso, F. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 65 (4), 337-53. Doi : 10.1016/S0024-3205(99)00120-4
- 59- Didi, A. (2009).** Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de *l'Arbutusunedo* et du *Daphne gnidium* l. de la région Telmcen. Mémoire Magister. Université aboubekr belkaid, Telmcen.
- 60- Dif, M. M. (2015).** Etude écologique, phytochimique et valorisation des plantes médicinales des monts de Tessala (W. de Sidi Bel-Abbés, Algérie NW) : Cas de *Daphne gnidium* L., Thèse de Doctorat, Université Djillali Liabes, Sidi Bel-Abbés.

- 61- Djaber, H. & Kherraz, M. (2016).** Effet de la phytothérapie sur les modifications métaboliques et histologiques des certaines plantes médicinales sur l'envinémation scorpionique Mémoire Master. Université Echahid Hamma Lakhdar El OUED.
- 62-Djahra, AB. (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du marrube blanc ou *marrubium vulgare* L. Thèses de doctorat en science biologie végétale
- 63- Dominique, B.R. (2007).** Stress oxydant et vieillissement. *Spectra biologie*, Vol 157, 23-26.
- 64- Dong, Y., Huang, J., Lin, X., Zhang, S., Jiao, Y., Liang ,T., Chen, Z. & Huang, R. (2014).** Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1),201-206.doi : 10.1016/j.jep.2014.01.001
- 65- Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Nagy, A. A., Gabr, S. A., Suliaman, M. I. & Abdel-Sattar, E. (2010).** Antihepatotoxic effect of *marrubium vulgare* and with aniasomnifera extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1(4), 247-254. En ligne : <https://www.jbclinpharm.org/articles/antihepatotoxic-effect-of-marrubium-vulgare-and-withania-somnifera-extracts-on-carbon-tetrachlorideinduced-hepatotoxicity-in-rats.html>
- 66- El-fennouni, M. (2012).** Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au maroc, Thèse de Doctorat, Université Mohammed V Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat.
- 67- Endougou, E. A. M. (2015).** *Neoboutoniamelleri var velutina* (Prain) Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae) : Evaluation des propriétés hépatoprotectrice et antioxydante. Thèse de doctorat en biologie. Université de Lille.
- 68- Fabiny, D. L. Ertingshausen, G. (1971).** Clin. Chem. 17, p: 696-700. Cite par fiche technique BIOLABO. Réf : 80107.
- 69- Fang, Y.Z. Yang, S. & Wu, G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. doi : 10.1016/S0899-9007(02)00916-4

- 70- Farges, O., Malassagne, B., Flejou, J. F., Balzan, S., Sauvanet, A. & Belghiti, J. (1999).** *Risk of major liver resection in patients with underlying chronic liver disease: a reappraisal, Ann Surg, 229(2), 210-215.*
- 71- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115. En ligne: <http://www.andrecontrelasla.be/IMG/pdf/Favier.pdf>
- 72- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. (2006).** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine, 36(4),327-358.* doi: 0112-1642/06/00040327/\$39.95/0
- 73- Flament, JB., Delattre, JF., & Hidden, G. (1982).** The Mechanisms Responsible for Stabilising the Liver. *Anatomia Clinica, 4 (2), 125-135.* Doi : 10.1007/BF01800622
- 74- Fouw, J. D. (2004).** Carbon tetrachloride. First draft, *National Institute of Public Health and the Environment*, World Health Organization Geneva.
- 75- Frank, C L. (1992).** Toxicologie. MASSON Paris Milan Barcelone Bonn. Page : 41,8285, 198.
- 76- Fromenty, B. & Pessayre, D. (1995).** Inhibition of mitochondrial b-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics, 67(1),101-54.* doi :10.1016/0163-7258(95)00012-6
- 77- Gandillet, A. (2004).** Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique. Thèse de doctorat en sciences du vivant, Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. l'Université Louis Pasteur Strasbourg I, Strasbourg, France.
- 78- Ganie, S. A., Haq, E., Hamid A., Qurishi, Y., Mahmood, Z., Zargar, B. A., Masood, A. & Zarga, M. A. (2011).** Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 11(1),1-17.* doi : 10.1186/1472-6882-11-17
- 79- Gelais, A. (2014).** Étude de la composition chimique et de l'activité biologique de *Dirca palustris L.*, Mémoire, Université du QUÉBEC à CHICOUTIMI.
- 80- Georges, D. (2006).** Hépatoprotecteur, Dictionnaire médical, Medicopedia. En ligne <https://www.dictionnaire-medical.net/term/39036,1,xhtml>
- 81- Gérard, A.(2006).** Université St Joseph, Beyrouth, LIBAN. L'HISTOLOGIE DES ORGANES Ed. [En ligne]. http://www.eopathologies.com/acad/h_cd/index.html

- 82- Gnanadesigan, M., Ravikumar, S., & Anand, M. (2016).** Hepatoprotective activity of *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou mangrove plant against CCl₄ induced liver damage. *Journal of Taibah University for Science*; 11 (2017), 450–457. doi : 10.1016/j.jtusci.2016.07.004
- 83- Gosling, J.A., Harris, P.F., Whitmore, I. & Willan, P.L.T. (2003).** Anatomie humaine: atlas en couleurs (2^{ème} ed). française : de boeck.P. 377.
- 84- Gruffaz, M. (2013).** La protéine Core du virus de l'hépatite B est le déterminant majeur responsable de l'inhibition précoce de la réponse IFN dans les hépatocytes. thèse de Doctorat, L'université Claude Bernard-LYON 1.
- 85- Gülçin, İ. Bursal, E. Şehitoğlu, M. H. Bilsel, M. & Gören, A.C. (2010).** Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey, *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2227-2238. Doi : 10.1016/j.fct.2010.05.053
- 86- Habig, WH., Pabst, MJ. & Jakoby, WB. (1974).** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22),7130-7139.
- 87- Hagen, T. M., Wierzbicka, G. T., Sillau, A. H., Bowman, B. B., & Jones, D.P. (1990).** Bioavailability of dietary glutathione: Effect on plasma concentration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259 (4) , 524 -590. doi : 1152/ajpgi.1990.259.4.G524
- 88- Haleng, J., Pincemail, J., Defraignem J.O. & Chapelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10): 628-638. En ligne: <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/8914/1/Stress%20oxydant,%20RMLg,%202007.pdf>.
- 89- Halliwell, & Gutteridge, (1989).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, 70 : 737 - 757.
- 90- Harizi, H., Chaabane, F., Ghedira, K. & Chekir-Ghedira, L. (2010).** Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cellular Immunology*, 267 (2), 94-101. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.12.002
- 91- Harborne , J.B. (1973).** Phytochemical Methods, London. Chapman And Hall, Ltd. Pp. 49-188.

- 92- Hennebelle, T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées), Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des sciences et technologies de LILLE – LILLE 1
- 93- Hodoul, M. (2012).** Apport de la ponction biopsie échoguidée au diagnostic des lésions focales hépatiques, Thèse de Doctorat en médecine, Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Roue.
- 94- Houlot, R. (1984).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine. 19-21, 225-227.
- 95- Hordé, P. (2014).** Hépatotoxicité – Définition, Sante-Medecine.
- 96- Huang, Q.F., Zhang, S.J., Zheng, L., He, M., Huang, R.B. & Lin, X. (2012).** Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamy saffinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 713-718. doi : 10.1016/j.fct.2011.12.009
- 97- Hung, M.Y., Fu, T.Y., Shih, P.H., Lee, C.P., Yen, G.C. & Zhong, D. (2006).** (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves inhibits CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 44(8), 1424-31. doi: 10.1016/j.fct.2006.03.009
- 98- Jacques, B. & André, R. (2008).** Biochimie métabolique (2^e éd.) .Paris. Les cours du PCEM
- 99- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B. & Simic, M.G. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 116(11), 4846-4851. En ligne : <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00090a032>
- 100- Jain, A., Soni, M., Deb, L., Jain, A., Rout, S.P., Gupta, V.B. & Krishna, K.L. (2008).** Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 61-66. doi : 10.1016/j.jep.2007.09.009
- 101- Kalantari, H., Forouzandeh, H., Khodayar, M.J., Siahpoosh, A., Saki N. & Kheradmand, P. (2017).** Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acute liver damage in mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 8 (2018), 120-127. doi : 10.1016/j.jtcme.2017.04.010

- 102- Kalu, F.N., Ogugua, V.N., Ujowundu, C.O., & Nwaoguikpe, R.N. (2011).** Aqueous Extract of *Combretum dolichopentalum* Leaf - a Potent Inhibitor of Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (10), 114-117. En ligne : http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/309_pdf.pdf
- 103- Kamble, M. B., Dumbre, R. K. & Rangari, V.D. (2008).** Hepatoprotective activity studies of herbal formulations. *International Journal of Green Pharmacy*, 2(3), 147-150.doi : 10.4103/0973-8258.42731
- 104- Kerharo, J., Guichard, F. & Bouguet, A. (1961).** Les végétaux ichtyotoxiques (Poisons de pêche), Matière médicale: extraits des bulletins et mémoires de l'école nationale de médecine et de pharmacie de Dakar. 355-386. En ligne : <https://www.horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins...5/b.../22354.pdf>
- 105- Kitts, D.D., Yuan, Y.V. & Godin, D.V. (1998).** Plasma and lipoproteinlipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(2), 202–209. doi : 10.1139/cjpp-76-2-202
- 106- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. & Vladimir-Knez EICS. (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *ActaPharmaceutica*, 54(1), 65-72.
- 107- Knight, T. R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A. & Jaeschke, H. (2001).** Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury : Role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci.*, 62(2), 212-20.
- 108- Kwang, G., Takayuki, S., Gary, R., Sung, E., Jeong, H., & Byeoung, S. (2003).** Inhibitory Effects of Plant-Derived Flavonoids and Phenolic Acids on Malonaldehyde Formation from Ethyl Arachidonate. *J. Agric. Food chemistry*, 51(24), 7203-7207. doi: 10.1021/jf0345447
- 109- Larrey, D. (2013).** Hépatotoxicité des médicaments anti-infectieux : Hepatotoxicity of anti-infectious drugs, *La Lettre de l'Infectiologue*, 27 (2), 68-71. <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/19577.pdf>
- 110- Lemoine, S., Wendum, D., Corpechot, C. & Chazouillères, O. (2016).** Hépatites autoimmunes : Aspects diagnostiques et thérapeutiques, *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive*, 23 (8-7), 637-652. Doi : 10.1684/hpg.2016.1323

- 111- LES SERVICES DE PRÉVENTION DU LABORATOIRE MAT INC. (2014).** fiche signalétique, *tétrachlorure de carbone*. Centre Anti-Poison pour le Québec: (800) 463-5060
- 112- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. & Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776. doi : 10.1016/j.foodchem.2006.06.022
- 113- Lindau, B.A. & Shaffer, J.B. (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 15 (6), 581 - 588. Doi : 10.1016/0891-5849(93)90160-V
- 114- Lu, Y., Hu, D., Ma, S., Zhao, X., Wang, S., Wei, G., Wang, X., Wen, A. & Wang, J. (2016).** Protective effect of wedelolactone against CCl₄ induced acute liver injury in mice. *International Immunopharmacology*, Vol. 34, 44-52. doi : 10.1016/j.intimp.2016.02.003
- 115- Mahmoud, M. S., Hesham, G. Abd, E. R. & Ahmed, N. M. (2015).** Therapeutic effects of *curcumin* and royal jelly as natural antioxidants on some biochemical parameters in hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in male albino rats, *International Journal of Advanced Research*, 3(11), 520- 535. En ligne : <http://www.journalijar.com>
- 116- Makhloufi, A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricariapubescens*(Desf.) et *Rosmarinusofficinalis* L.) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en biologie. l'université aboubaker belkaid, Telemcen.
- 117- Manning, JC. (2013).** Thymelaeaceae. *Bothalia - African Biodiversity and Conservation*, 43(1), 84-88. doi : 10.4102/abc.v43i1.112
- 118- Marc, D. (2012).** Evaluation rétrospective d'un critère prédictif de mortalité après hépatectomie majeure en réanimation. Thèse de Doctorat en médecine. Université de Lorraine
- 119- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L. & Bravo, L. (2005).** Determination of malondialdehyde (MDA) by highperformanceliquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*. 827(1), 76-82. doi:10.1016/j.jchromb.2005.06.035

- 120- Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006).** Antioxidant and free radicals scavenging activities of some medicinal plants from the *Lamiaceae*. *Fitoterapia*, 77(5),346-353.doi : 10.1016/j.fitote.2006.04.004
- 121- Mc, C., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M. & Janzen, E. G. (1984).** Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 259, 2135-2143.
- 122- Mégarbane, B. Deye, N. & Baud, F. (2007).** Foie toxique : Mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. Toxic hepatitis: Mechanisms of toxicity and specific pharmacological agents, *Reanimation*, (2007) 16, 632-642. Doi : 10.1016/j.reaurg.2007.08.004
- 123- Meinrad, B., Lutz W. D., Weber, E. Be., & Andreas, S. (2000).** Hepatocyte Damage Induced by Carbon Tetrachloride: Inhibited Lipoprotein Secretion and Changed Lipoprotein Composition. *Z. Naturforsch.* 56c, 2 8 3-290.
- 124- Mellal, A. (2010).** Application pratique de l'anatomie humaine. Publibook. P: 174-181.
- 125- Meurisse, M., Pincemail, J., Limet, R. & Defraigne, J.O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. Vol 4, N° 5.
- 126- Mezzetti, A., Pierdomenico, S. D., Costantini, F., Romano, F., Cesare, D. D. Cuccurullo, F., Imbastaro, T., Riario, S. G., Giacomo, F. D., Zuliani, G. & Fellin, R. (1998).** Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 676-681. doi : 10.1016/S0891-5849(98)00109-9
- 127- Migdal, C. & Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-12. doi : 10.1051/medsci/2011274017
- 128- Sovrlić, M. M. & Manojlović, N. T. (2016).** Plants from The Genus *Daphne*: A Review of its Traditional Uses, Phytochemistry, Biological and Pharmacological Activity, *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 18 (1), 69–80. Doi : 10.1515/sjecr-2016-0024
- 129- Mohammadi, Z. (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat, université Abou BekrBelkaïd, Tlemcen.

- 130- Murray, R. (1984).** Aspartateaminotransferase. Kaplan A et al. Clinchem the C.V.
- 131- Niare, A. (2006).** Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* willd. (Myrtaceae). Thèse de doctorat en pharmacie non publiée, Université de Bamako.
- 132- Nicolas, F. (2007).** BIOMAGHREB, 28982(2007), 1-59. Cité par fiche technique AFAQ. ISO 9001: 2000
- 133- Nicole J.S., Olivier, P. & Jacques, C. (2009).** Patient avec des tests hépatiques perturbés : que faire ?, Revue Médicale Suisse : pratique, 5, 2410-2414.
- 134- Nohl, H., Gille, L. & Staniek, K. (2004).** The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Biochemical Society Transactions*, 51(1),223-229.
- 135- Nowik, W.(2005).** HPLC-PDA characterisation of *Daphne gnidium* L. (Thymemeacea) dyeing extracts using two different C-18 stationary phases, Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques, Champs-sur-Marne, France, *J. Sep. Sci.*, 28(2005), 1595–1600
- 136- Obaid, F., Jessilynn, T., Nickolette, R., Margaret, E.F., Suzanne, B. & Gary, D. (2005).** Toxicological profile for carbon tetrachloride. U.s. Department of health and human services public health Service, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*,
- 137- Ohare, C.A. (2010).** La famille des radicaux libres. *Journal de la nutrition*, 2.
- 138- Okamoto, O.K., & Colepicolo, P. (1998).** Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*,119(1), 67-73.doi : 10.1016/S0742-8413(97)00192-8
- 139- Oriana, C. & Denis, C. (2015).** Le Foie et les Voies Biliaires: Anatomie. *Centre Hépatobiliaire Paul Brousse*. [En ligne]. [Citation : 1 Septembre -2015.] <http://www.centre-hepatobiliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html>.
- 140- Ouattara, Y. (1999).** Etude de l'activité des extraits aqueux de plantes hepatotropes sur le foie de souris soumises à une intoxication" algue au tétrachlorure de carbone. Thèse de 3 eme cycle en sciences biologiques appliquées, option physiologie animale. Université de Ouagadougou
- 141- Patel, H., Chen, J., Kumuda, C. & Mahendra, K. (2013).** Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and

HMVEC. *Cardiovascular Diabetology*, 12 (142),1-14. En ligne: <http://www.cardiab.com/content/12/1/142>

142- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B. & Taylor J.B. (1994). Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical Journal*, 300(1), 271-276. doi : 10.1042/bj3000271

143- Perrissoud, D. & Testa, B. (1982). Hepatic pharmacology: Mechanisms of action and classification of anti-necrotic hepatoprotective agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 3(1982),365-367. doi : 10.1016/0165-6147(82)91185-3

144- Pincemail, J., Le Goff, C., Charlier, C., Gillion, P., Cheramy, JP., Van, E. H., Chapelle, JP. & Defraigne, JO. (2009). Evaluation biologique du stress oxydant : Application en routine clinique. *Nutrition & Endocrinologie*, 16-31. En ligne : <https://orbi.uliege.be/request-copy/2268/40285/45460/300.pdf>

145- Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Limet R. & Defraigne J.O. (2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones - Nutrition*, 5(4), 158-164. En ligne : www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/2335.pdf

146- Poirier, J., Coujard, R., & Racadot, J. (1980). Précis d'histologie humain. Presses Université Lava.

147- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review . *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106. En ligne : <https://ar.scribd.com/doc/94036813/Phytochemical-Screening-and-Extraction-a-Review>

148- Rajib, A., Md., Monirul, I., Km, I. J. B., Ashik, M. & Ekramul, H. (2009). Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of Some Medicinal Plants Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, *European Journal of Scientific Research*, 37 (2), 302-310

149- Rahman, T., Hosen, I., Towhidul, M. M. I. & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in bioscience and biotechnology*, 3 (2012), 997-1019. doi : 10.4236/abb.2012.327123

- 150- Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian, L. & Had-Aissouni, L., (2005).** Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24, 502–509. doi: 10.1016/j.annfar.2005.03.004.
- 151- Rezine, F. & Fedouche, M. S. (2017).** Coumarines à intérêt thérapeutique : Synthèse et contrôle analytique, Thèse de doctorat, Université Abou BekrBelkaïd Faculté De Médecine Dr. B. Benzerdjeb, Tlemcen.
- 152- Robinson, S. H. (1990).** Degradation of hemoglobin. 4th Edition. In Williams Hematology edition, New York. PP. 407 – 414.
- 153- Rosenbaum, J., Mallat, A. & Mavier, P. (1994).** La fibrose hépatique, une itopathie ?, *médecine/sciences*, 12(10), 1245-52.
http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2563/MS_1994_12_1245.pdf?
- 155 - Sangare, O. (2005).** Evaluation de *Cochlospermum tinctorium*, *Entada africana* et *Combretum micranthum* dans le traitement des hépatites à bamako. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako.
- 156- Santé Canada. 2011** Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, Document technique, Le tétrachlorure de carbone
- 157- Sanzgiri, U. Y., Srivatsan, V., Muralidhara, S., Dallas, C. E. & Bruckner, J. V. (1997).** Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143 (1), 120-129. doi : 10.1006/taap.1996.8079
- 158- Saudubray, JM. Martin, D., de Lonlay, P., Touati, G., Poggi-Travert, F., Bonnet, D., Juvet, P., Boutron, M., Slama, A., Vianey-Saban, C., Bonnefont, JP., Rabier, D., Kamoun, P. & Brivet, M. (1999).** Recognition and management of fatty acid oxidation defects : a series of 107 patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 22 (4), 488-502. doi : 10.1023/A:100555620
- 159- Searcy, R.L., Reardon, J.E., Foreman, J.A. & Amer, J. (1967).** Méd. Techn. 33,p :15-20. Cite par fiche technique BIOLABO. Réf : 80221.
- 160- Services de Prévention du Laboratoire MAT inc. (2014).** Fiche signalétique, *tétrachlorure de carbone*. Centre anti-poison pour le québec: (800) 463-5060

- 161- Sherratt, P.J. et Hayes J. (2001).** Glutathione-S-transferases: Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. *Ioannides, C: Wiley & sons.* doi:10.1002/0470846305.ch9
- 162- Shweta, S. & Mehta, B.K. (2016).** Hepato-protective activity of three different extracts of *Butea monosperma* in CCl₄ and Isoniazid induced toxicity in wistar rats. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, Int. J. Adv. Res. Biol. Sci, 3(11), 247-254.*
- 163- Si-Tayeb, K., Lemaigre, FP. & Duncan, SA.(2016).** Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell, 18(2), 175-189.* doi : 10.1016/j.devcel.2010.01.011
- 164- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Methods Enzymology, 299 (1999), 152-178.* Doi : 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- 130- Société Canadienne du Cancer. Anatomie et physiologie du foie. cancer.ca. [En ligne] [Citation : 1 Septembre 2015.] <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/liver/anatomy-and-physiology/?region=qc#ixzz3Z51cV02a>
- 165- Sourabie, T.S., Nikiema, J.B.,Guissou, I.P., & Nacoulma, O. G. (2012).** Etude comparée des effets anti-hépatotoxiques d'extraits d'*Argemonemexicana*L. (Papaveraceae), une plante utilisée dans le traitement traditionnel de la jaunisse au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Science, 6(3), 1139-1147.* doi: 10.4314/ijbcs.v6i3.19
- 166- Stachura J., Tarnawski A., Ivey K.J., Macht., Bogdal J., Szczudrawal J. & Klimczyk B. (1981).** Prostaglandin-Protection Of Carbon tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology, 81, pp. 211-217.*
- 167- Suzy, A. A., Comhair, & Serpil, C. E. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 283(2), 246-255.* doi : 10.1152/ajplung.00491.2001
- 168- Trease, E., & Evans, W.(1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London. (2^{ème} Ed).61-62.13
- 169- Tosun, M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H., Polat, T. & Ozturk, E. (2009).** Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research, 42(2), 175-181.* doi: /S0716-97602009000200005

- 170-Townsend, D.M., Tew, K.D. & Tapiero, H. (2003).**The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57(3-4), 145-155. doi : 10.1016/S0753-3322(03)00043-X
- 171- Trinder, P. (1969).** Ann. Clin. Biochem. 6, p : 27-29. Cite par fiche technique BIOLABO. Réf : 80019.
- 172- Valko, M.,Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M. & Telser, J. (2006).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1), 44-84. doi : 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- 173- Van, A. S., Tromp, M., Haenen, G. R. M. M., Van, D.,Vijgh, W. & Bast, A. (1995).** Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical and Biophysical Research*, 214 (3),755-9. En ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575540>
- 174- Volodymyr, I. L. (2011).** Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012(1), 1-26. doi : 10.1155/2012/736837
- 175- VWR International SAS. (2005).** Fiche de données de sécurité. *Identification du produit*. Carbon tetrachloride, Normapur Fontenay sous Bois cedex, France. * 201, rue Carnot * F-94126.
- 176- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z. & Liu, X. (2012).** Protective effect of *Naringenin* against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological trace element research*, 146(3), 354-359. doi: 10.1007/s12011-011-9268-6.
- 177- Walters, M., & Gerarde, H. (1970).** Microchem J, 15, 231-243. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80403.
- 178- Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G. (2004).** Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *American Heart Association*, 44(4), 381-386. doi: 10.1161/01.HYP.0000142232.29764.a7
- 179- Weber, LW., Boll, M. & Stampfl, A. (2003).** Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes : Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology* , 33(2),105-136. doi: 10.1080/713611034
- 180- Weckbercker, G. & Cory, J.G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. Vol. 40(3): 257-

264.

181- Wenger, C. & al., (1984). Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. ClinChem the C.V. Mosby

182- Wiernsperger, N.F. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & Metabolism*. 29(6), 579-585. doi : 10.1016/S1262-3636(07)70072-1

183- Xiaosuo, W., Vimal, K. & George, A. (2003). Extraction and Chromatography-Mass Spectrometric Analysis of the Active Principles from Selected Chinese Herbs and Other Medicinal Plants. *The American Journal of Chinese Medicine*, 31(6), 927-944. doi : 10.1142/S0192415X0300165X.

184- Yagi, K. (1976). Simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* Vol. (15), 212-216. En ligne <https://www.bioassaysys.com/Datasheet/DTBA.pdf>.

185- Yeh, C.T. & Yen, G. C. (2006). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 11-15. doi : 10.1093/jn/136.1.11

186- Yi, P., Johnson, A.N., Han, Z., Wu, J. & Olson, E.N. (2008). Heterotrimeric G proteins regulate a noncanonical function of septate junction proteins to maintain cardiac integrity in Drosophila. *Developmental Cell*, 15(5), 704-713. doi : 10.1016/j.devcel.2008.10.001

187- Yimam, M., Jiao, P., Moore, B., Hong, M., Cleveland, S., Chu, M., Jia, Q., Lee, Y.C., Kim, H. J., Nam, J. B., Kim, M. R., Hyun, E. J., Jung, G. & Do S. G. (2016). Hepatoprotective Activity of Herbal Composition SAL, a Standardize Blend Comprised of *Schisandrachinensis*, *Artemisia capillaris*, and *Aloe barbadensis*. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016 (4), 1-10. doi : 10.1155/2016/3530971

188- Younes, K. (2015). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales de la région ouest d'Algérie : *Artemisia arborescens* L. et *Cardaria draba* (L.) Desv. Thèse de doctorat, Université Abou Belkaid. Tlemcen.

189- Zachary, S. R. (2005). A revision of *Octolepis* Oliv. (Thymelaeaceae, Octolepidoideae). *ADANSONIA*, 27 (1), 89-111.

http://www.mobot.org/MOBOT/Research/curators/pdf/Rogers_2005_Octolepis_Adansonia.pdf.

Référence en arabe

190- عبد الرزاق ابن حمدوش الجزائري. 1960. كشف الرموز في بيان الأعشاب. طبع على دمة احمد بن مراد التركي و أخيه الكتبي. رورندوز 13. الجزائر.

Annexe

Annexe 1 :

Matériels de laboratoire	Produits chimique
Agitateurs magnétiques à plaque chauffante	AlCl_3
Bain-marie de type MEMMERT	Folin-Ciocolteu
Balance analytique de type KERN ABJ/ABS	2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH)
Balance électrique de type KERN EMB 2200-O	acide ascorbique
Centrifugeuse horizontale de type SIGMA	acide galique
Évaporateur rotatif de type Büchi Rotavapor R-200	gélatine
Hown	acide sulfurique (H_2SO_4)
Micropipette	FeCl_3
Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240	acide acétique
Bucher	acétate de sodium
Erlenmeyer	acide trichloroacétique (TCA)
Eprouvette	Acide thiobarbiturique (TBA)
tubes à essai	acide salicylique
Pipette graduée	butylhydroxytoluène (BHT)
Cristallisoir	acide dithio-bis2-nitrobenzoïque (DTNB)
	Tris
	NaCl
	bleu de comassie
	acide phosphorique (H_3PO_4)
	eau oxygénée (H_2O_2)
	méthanol
	chlorure d'hydrogène (HCl)
	carbonate de sodium (Na_2CO_3)
	ammoniac
	1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB)
	tampon phosphate (KH_2PO_4)



Figure : Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (photo originale).



Figure : Évaporateur rotatif de type Büchi Rotavapor R-200 (photo originale).



Figure : Étuve de type MEMMERT (photo originale)



Figure : Bain-marie de type MEMMERT (photo originale).



Figure : Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240 (photo originale).

Annexe 2 :

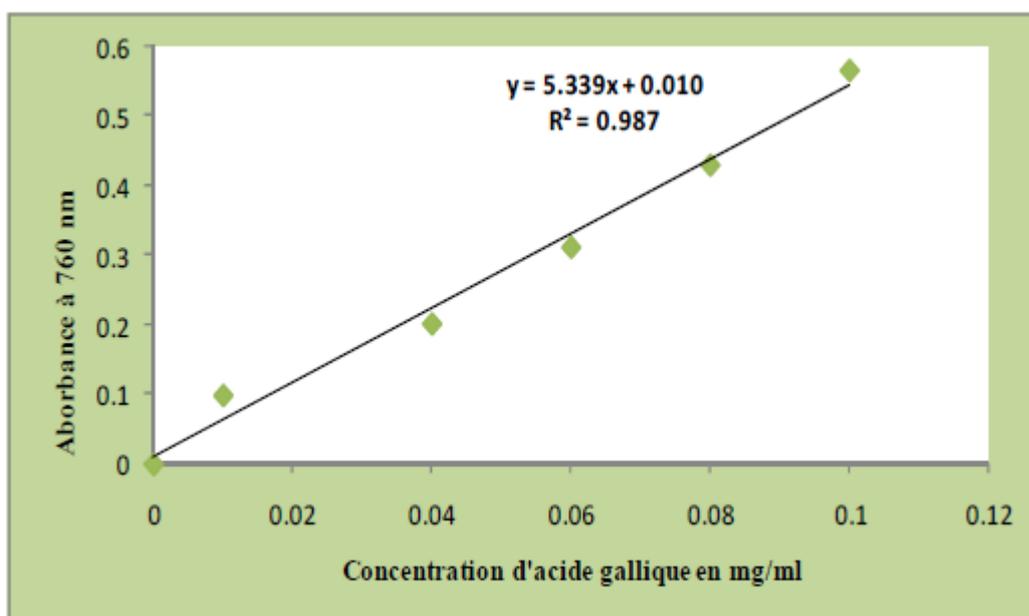


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

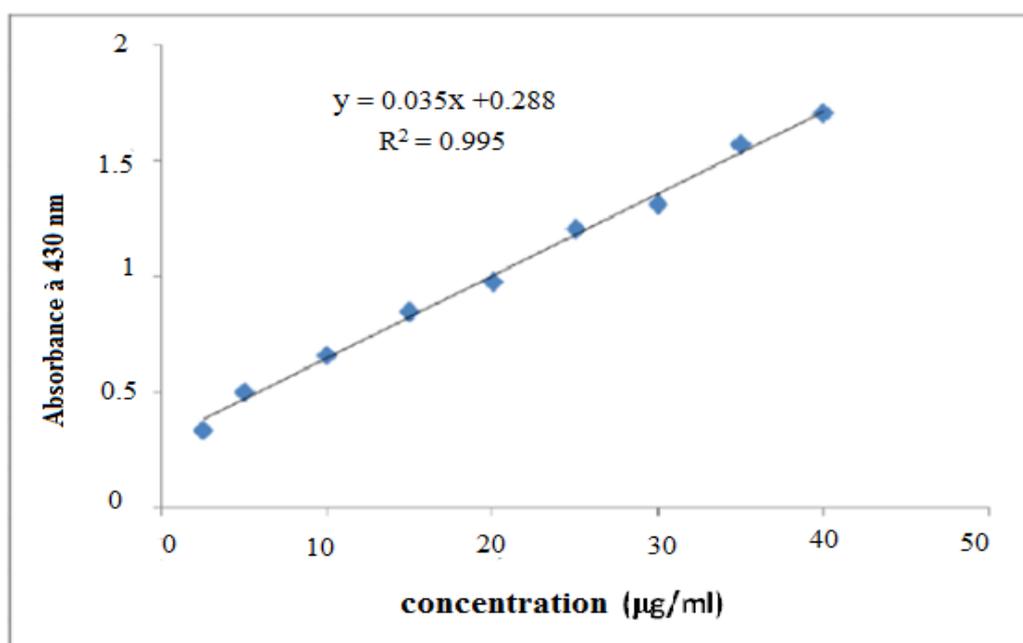


Figure : Courbe d'étalonnage de quercetine.

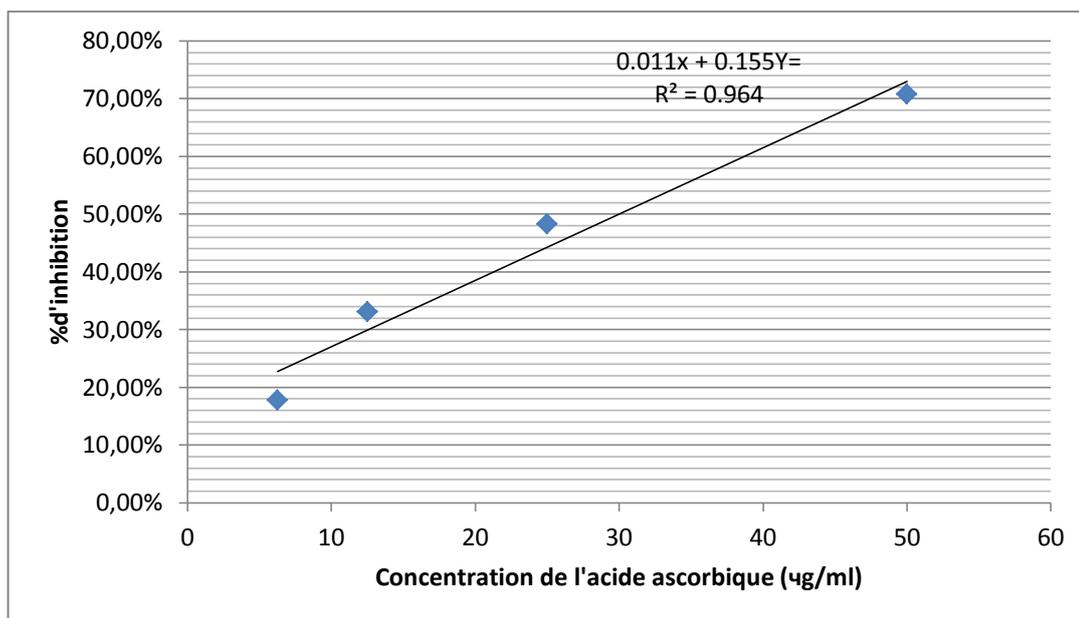


Figure : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique.

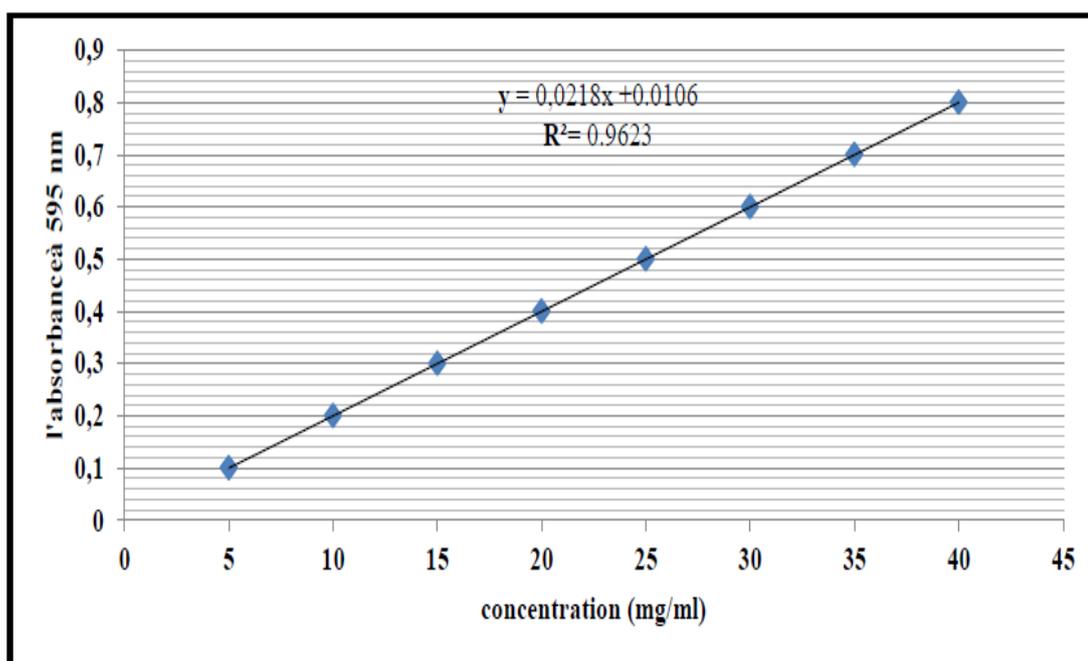


Figure : Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire.