



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 حمدة 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

Effet du venin d'un serpent (*Cerastes cerastes*) et d'une plante
antivenimeuse de la pharmacopée traditionnelle algérienne
(*Matricaria pubescens (Desf)*) chez les lapins

Réalisés par :

M^{elle} BAHEDI Zohra

M^{me} DAOUDI Nabila

Devant les membres du jury composé de :

Président: Mr ALIA Zaid

MA (A) université d'El-oued

Examinatrice: Mme HOUMRI Naouel

MA (A) université d'El-oued

Promotrice: Melle MOUANE Aicha

MA (A) université d'El-oued

REMERCIEMENT

Au terme de cette étude , nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté et la force afin d'achever ce travail .

Nous tenons à remercier notre encadreur Melle: MOUANE Aicha qui a accepté de nous accompagner et de nous orienter à travers la réalisation de ce travail et qui nous a donné beaucoup de son temps précieux .

A tous les membres de jury Mr le président ALIA Zaid, M^{me} HOUMRI Naouel examinatrice, qui ont accepté d'évaluer notre travail.

A Mr :MAKKAOUI.M. pour sa collaboration dans l'extraction de venin qui était fait l'étape la plus dangereuse.

A Mr NAOUASS responsable de l'Institut de Pasteur à Alger, l' annexe de EL HAMMA.

A Mme SAAD EDDIN responsable du laboratoire de venin de l'Institut de Pasteur à Alger, l'annexe de KOUBA.

A Mr DAOUDI Abdelhafid, ATIA Nedjouda et KECHIDA Safa pour leur collaboration, et leurs conseils.

A Mr CHOUIKH Atef pour sa collaboration de faire l'extraction des flavonoïdes.

Aussi a Mr HOUSSAM et MEISSA, I. pour leur aide dans l'égorgeage des lapins.

Nous tenons à remercier: Mr HILICE Youcef, Mr BEN MOUSSA Mohammed, SALMANE Mehdi, et OTHMANI Hadjer pour leur aide dans la préparation des coupes histologiques .

A toutes les travailleuses du laboratoire du centre de santé de DEBILA et GUEMAR.

A toutes les travailleuses du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie d' EL-OEUD.

A nos enseignants .

Et à tous ceux qui nous ont aidé du prés et du loin.

NABILA – ZOHRA

Résumé

Les envenimations des serpents *Cerastes cerastes*, constituent un grand problème sur la santé publique, particulièrement en régions sahariennes d'Algérie. Le venin des vipères est une substance chimique de type protéique avec deux composants essentiels: les toxines et les enzymes.

Certaines espèces des plantes dans notre région possèdent des propriétés pharmaceutique qui confèrent un intérêt médicinal. Parmi ces plantes: le *Matricaria pubescens*.

Nous avons réalise ce travail pour connaitre: l'influence du venin des serpents *Cerastes cerastes*, sur les lapins d'albinos; et l'effet du *Matricaria pubescens* sur l'envenimation ophidienne.

On a fait l'extraction du venin de *Cerastes cerastes* et les flavonoïdes de *Matricaria pubescens* qu'on injecte aux lapins. Après l'égorger du lapins, on a fait des analyses biochimiques et une coupe histologique au niveau des quelques organes: le foie, les poumons, le cerveau et les reins. Les analyses biochimiques et les coupes histologique indiquent une variation de glycémie, créatinine, TGP, et TGO et aussi une variation au niveau tissulaire.

Cet étude, montre que les flavonoïdes de *Matricaria pubescens* ont un efficacité contre l'effet du venin sur les paramètres des métabolismes (l'heperglycémie, l'hypocholestérolimie); mais ces flavonoïdes n'ont pas un effet sur la coagulation sanguine qui est causé par l'envenimation.

Mots clés: *Cerastes cerastes*, *Matricaria pubescens*, venin, flavonoïdes, extraction.

الملخص

تشكل لدغة الأفاعي " ذوات القرون "مشكلا كبيرا على الصحة العامة , خاصة في المناطق الصحراوية الجزائرية. سم الحيات ذات الرأس المثلث عبارة عن مواد كيميائية ذات نوع بروتيني يحتوي على نوعين أساسيين: التوكسينات و الأنزيمات. بالمقابل , يوجد في منطقتنا الصحراوية العديد من الأنواع النباتية التي تملك خصائص علاجية و تمنح فائدة علاجية , من ضمن هذه النباتات : القرطوفة الغنية بمختلف المكونات الطبيعية .

الهدف من هذه الدراسة هو اكتشاف تأثيرات سم الأفاعي من نوع *Cerastes cerastes* على الأرانب البيضاء , أيضا من أجل تحديد الخصائص الطبية للقرطوفة وتأثيراتها على لدغة الأفعى و تأثير القرطوفة على سم هذه الأفعى. لهذا قمنا باستخلاص سم الأفعى و فلافونويدات القرطوفة اللذان سنقوم بحقنهما في الأرانب . بعد الذبح قمنا بعمل تحاليل كيميائية و مقطع نسيجي على مستوى بعض الأعضاء : الكبد , الرنتان , المخ و الكليتان , وكنتيجة ؛ تحصلنا على تغيرات في المعايير الكيميائية (السكر , الكرياتين , TGO و TGP وتغيرات في معايير التخثر TP ... إلخ) , و لاحظنا هنا التخريب على مستوى الأنسجة.

بعد هذه الدراسة , نستطيع القول أن فلافونويدات القرطوفة لها تأثير فعال ضد تأثيرات السم على المعايير البيولوجية الأيضية (ارتفاع السكر, انخفاض الكلسترول) لكن ليس لها تأثير على تخثر الدم الناتج من اللدغة .

الكلمات المفتاحية : الأفعى ذات القرون , القرطوفة , سم , فلافونويدات , استخلاص.

Sommaire

Remerciement	
Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviation	
Introduction	1

PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Venins du *Cerastes cerastes*

I.1.1. Vipère à cornes <i>Cerastes cerastes</i>	3
I.1.2. Classification.....	3
I.1.3. Répartition.....	4
I.1.4. Anatomie de la vipère à cornes.....	4
I.1.4.1. Appareil Venimeux.....	4
I.1.4.3. Glandes venimeuses.....	4
I.1.4.4. Système d'injection.....	5
I.1.5. Composition et propriétés physico-chimiques des venins de serpents.....	5
I.1.5.1. Enzymes.....	6
I.1.5.2. Toxine.....	7
I.1.6. Symptômes de l'envenimation du vipère à cornes <i>Cerastes cerastes</i>	8
I.1.6.1. Envenimation	8
I.1.6.2. Réponse inflammatoire dans le syndrome vipérin.....	8
I.1.6.3. Troubles de l'hémostase dans le syndrome vipérin.....	9
I.1.6.4. Signes neurologiques.....	12

Chapitre 2: *Matricaria pubescens*

I.2.1. Histoire du <i>Matricaria</i> (camomille).....	14
I.2.2. Systématique de <i>Matricaria pubescens</i>	14
I.2.3. Répartition géographique.....	15
I.2.4. Description botanique de la plante.....	15
I.2.5. Utilisation traditionnel du <i>Matricaria pubescens</i>	16
I.2.6. Etude phytochimique de <i>Matricaria pubescens</i>	16
I.2.6.1. Principaux métabolites secondaires.....	16

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

II. Matérielles et méthodes	21
II.1. Matériel biologique.....	21
II.1.1. Plante.....	21
II.1.2. Venin.....	22
II.1.3. Lapins.....	22
II.2. Réactifs.....	22
II.3. Méthodes d'extraction	22
II.3.1. Méthode d'extraction des flavonoïdes.....	22
II.3.2. Méthodes d'extraction du venin.....	24
II.4. Injection du venin et des flavonoïdes.....	25
II.5. Réalisation des coupes histologiques.....	26
II.5.1. Etapes de coupe histologie	27
II.6. Prélèvement sanguines.....	27
II.6.1. Méthode de dosage de la Glycémie.....	27
II.6.2. Méthode de dosage des Triglycérides.....	28
II.6.3. Méthode de dosage du Cholestérol.....	30
II.6.4. Méthode de dosage de l'Urée.....	32
II.6.5. Méthode de dosage de la Créatinine.....	33
II.6.6. Mesure de l'activité de l'Alanine aminotransférase.....	34
II.6.7. Mesure de l'activité de l'Aspartate aminotransférase	35
II.6.8. Méthode de dosage du Fibrinogène.....	36
II.6.9. Mesure de Temps de Céphaline active (Cephaline – Kaolin).....	37
II.6.10. Méthode de mesure le taux de prothrombine (TP).....	37
II.7. Analyses statistiques.....	38

PARTIE III : RESULTAT ET DUSCUSSION

III.1. Résultats.....	39
III.1.1. Extraction de flavonoïdes.....	39
III.1.2. Effet du venin et des flavonoïdes sur les métabolismes des lapins.....	39
III.1.2.1. Glycémie.....	39
III.1.2.2. Cholestérol total.....	44
III.1.2.3. Triglycéride.....	40
III.1.2.4. Activité de TGP.....	41
III.1.2.5. Activité de TGO.....	42

III.1.2.6. Urée.....	42
III.1.2.7. Créatinine.....	43
III.1.2.8. Fibrinogène.....	44
III.1.2.9. Temps de Céphaline -Kaolin (TCK).....	44
III.1.2.10. Taux de prothrombine (TP).....	45
III.1.3. Résultat des coupes histologiques.....	46
III.2. Discussion.....	50
Conclusion	54
Références bibliographiques.....	55
Annexes.....	61



***LISTE DES
FIGURES***

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Vipère à cornes <i>Cerastes cerastes</i>	3
Figure 2	Distribution du <i>Cerastes cerastes</i>	4
Figure 3	Denture et appareil venimeux des serpent	5
Figure 4	Crochet de <i>Cerastes cerastes</i> (solénoglyphes)	5
Figure 5	Site d'action de la phospholipases A2	6
Figure 6	Structure de Hyaluronidase	7
Figure 7	Réponse inflammatoire dans le syndrome vipérin	9
Figure 8	Action du venin sur l'hémostase primaire	10
Figure 9	Action du venin sur la coagulation et la fibrinolyse	12
Figure 10	Mécanisme d'action des neurotoxines	13
Figure 11	Plante du <i>Matricaria pubescens</i>	15
Figure 12	Structures chimiques des principaux polyphénols	17
Figure 13	Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	17
Figure 14	Structure générale des flavonoïdes	18
Figure 15	Structure chimique des quelques flavonoïdes	19
Figure 16	Photo représente la plante de <i>Matricaria Pubescens</i>	21
Figure 17	Photo présente les lapins albinos	22
Figure 18	Photo représente l'étape de la macération et la filtration	23
Figure 19	Photo représenter la séparation de phase liquide-liquide	23
Figure 20	Photo représente le phase de séchage par un évaporateur rotatif (Rotavapor R.210/215)	24
Figure 21	Photo représente l'extraction du venin	24
Figure 22	Photo représente la quantité du venin extrait	25
Figure 23	Photo représente l'injection du venin et flavonoïdes	25
Figure 24	Photo représente le sacrifice des lapins	26
Figure 25	Photo représente l'appareil de microtome	27
Figure 26	Effet du venin et des flavonoïde sur la Glycémie	39
Figure 27	Effet du venin et des flavonoïde sur le Cholestérol	40
Figure 28	Effet du venin et des flavonoïdes sur la Triglycéride	40
Figure 29	Effet du venin et des flavonoïdes sur l'activité de TGP	41
Figure 30	Effet du venin et des flavonoïdes sur l'activité de TGO	42

Figure 31	Effet du venin et des flavonoïdes sur l'Urée	42
Figure 32	Effet du venin et des flavonoïdes sur la créatinine	43
Figure 33	Effet du venin et des flavonoïdes sur la fibrinogène	44
Figure 34	Effet du venin et des flavonoïde sur le Temps de Céphaline active	44
Figure 35	Effet du venin et des flavonoïdes sur le taux de prothrombine (TP)	45
Figure 36	Coupe histologique dans le foie	46
Figure 37	Coupe histologique dans les reins	46
Figure 38	Coupe histologique dans les poumons	47
Figure 39	Coupe histologique dans les muscles	48
Figure 40	Coupe histologique dans le cerveau	49



***LISTE DES
TABLEAUX***

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Représente la couleurs et le rendements des flavonoïdes.	41



***LISTE DES
ABRIVIATIONS***

Liste d'abréviation

µg: microgramme

µl: microlitre

ADP: adénosine diphosphate

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

Ca: calcium

cm: centimètre

Co: cobalt

Cu: cuivre

EDTA: ethylenediaminetetraacetate

ERO: espèces réactives de l'oxygène

g: gramme

h: heur

H: hydrogène

KDa: kilodalton

Kg: kilogramme

L: litre

min: minute

ml: millilitre

MO: microscope optique

mmol: millimole

nm: nanomètre

O: oxygène

PH: potentiel hydrogène

Phe: phénylalanine

TCK: Temps de Cephaline – Kaolin

TGO: Glutamooxaloacétate Transférerase

TGP: Glutamopyruvate Transférerase

TNF- α: Tumor Necrosis Factor-α

TP: Taux de prothrombine

Zn: zinc

%: pour cent



INTRODUCTION

Introduction

Les vipères sont des animaux relativement pacifiques qui préfèrent la fuite qu'à l'attaque. L'agressivité de la vipère ne se manifeste vis-à-vis de l'homme que lorsqu'elle se sent menacée (**Mermode, 1970**).

Cerastes cerastes est la vipère la plus emblématique des régions sahariennes. C'est un serpent venimeux potentiellement dangereux pour l'homme (**Metnez, 2016**).

Les venins de serpents ne sont que l'un des composants de ce qui se nomme "l'appareil venimeux". Celui-ci est constitué essentiellement de deux glandes venimeuses produisant le venin et d'un système d'injection composé de dents modifiées en crochets permettant au serpent de faire pénétrer son venin dans les tissus de sa proie ou de son agresseur (**Chippaux et al., 2006**). C'est ce qui explique que les « morsures » Les envenimations dues aux vipéridés constituent un problème de santé publique important. Ces envenimations sont souvent à l'origine des complications hématologiques systémiques, coagulation de sang...(Mion et al., 2010).

Dans la région saharienne, la flore spontanée et les relations entre l'homme et les espèces végétales, méritent une attention particulière. Certaines de ces plantes possèdent des propriétés pharmacologiques qui leur donnent un intérêt médicinal. Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales ont été pendant longtemps le principal, voire l'unique recours de la tradition orale pour soigner les pathologies, en même temps que la matière première pour la médecine moderne (**Ould El Hadj et al., 2003**).

La famille *Matricaria* est riche en composantes naturelles diverses. On y trouve des terpénoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes (**Boutaoui, 2012**).

Nos ancêtres ont utilisé le "Guretoufa" *Matricaria pubescens* comme traitement à l'envenimations des serpents.

Le but de notre étude est de savoir les effets du venin de *Cerastes cerastes* sur les paramètres et les perturbations biologiques observées lors des envenimations vipérines, et aussi pour montrer les propriétés médicinales de la *Matricaria pubescens* sur cette envenimation.

La première partie est une synthèse bibliographique sur l'espèce de *Cerastes cerastes* et la composition de leur venin puis les effets qui peuvent apparaître par l'envenimation sur l'organisme, aussi sur la plante du *Matricaria pubescens* et sa compositions phytochimique ainsi que les effets biologiques des flavonoïdes.

La deuxième partie c'est la partie pratique où se fait l'injection du venin de *Cerastes cerastes* après la dilution, et l'injection de l'extrait (les flavonoïdes) de la plante *Matricaria pubescens* aux lapins.



PARTIE I
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1
VENIN DU
CERASTES CERASTES

I.1.1. Vipère à cornes *Cerastes cerastes*

Parmi les espèces dangereux de serpents en Algérie, la vipère à cornes *Cerastes cerastes*. Cette vipère se caractérise par la présence de deux cornes au dessus des yeux d'où son appellation «vipère à corne». Elle a une taille maximale de 60 cm. La couleur de fond des vipères à corne est brune, de grands carrés gris étant dessinés la queue est assez courte, la tête est triangulaire, le cou est fortement marqué, et les yeux sont en fente (**Ringwold, 2001**).

La dentition *Cerastes cerastes* est doté de dents solénoglyphes comme les autres espèces appartenant à la famille des vipéridés (**Brix, 2010**), le corps est recouvert de petit écailles oblongues fortement carénées, qui donnent un aspect très mat et les muscles transversaux développés permettant une reptation latérale rapide et un enfouissement particulièrement efficace (**Ulrich, 2009**).

I.1.2. Classification

Classe: Reptilia Ordre: Squamata Super famille: Colubroidea Famille: Viperidae
Genre: *Cerastes* (**Chippaux, 2006**).



Figure 1: Vipère à cornes *Cerastes cerastes* (Photo originale).

I.1.3. Répartition

Les serpents du *Cerastes cerastes* localisent dans les régions sablonneuses et surtout les ergs et s'enfoncent laissant uniquement ses yeux à l'extérieur (**Chafiq et al., 2011**).

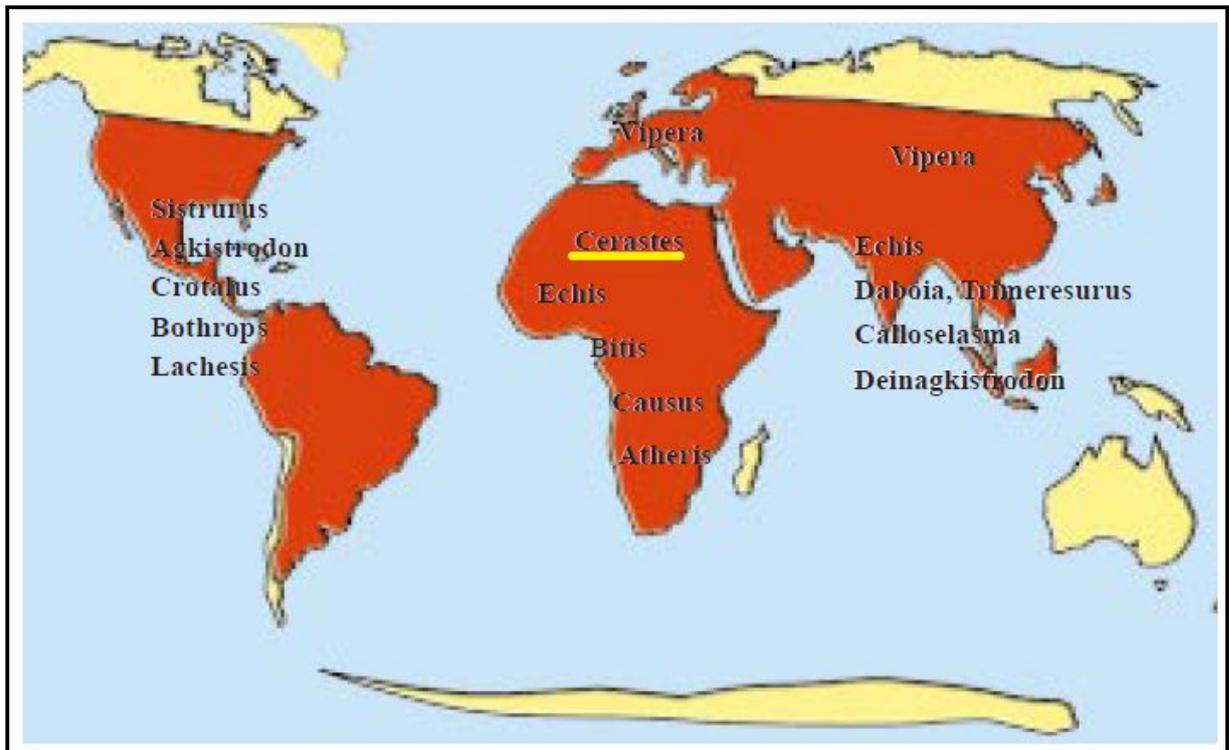


Figure 2 : Distribution de la *Cerastes cerastes* (**Chippaux, 2006**).

En Algérie, la vipère à cornes est rencontrée dans tout le Sahara (**Slavtchev et al., 1969**).

I.1.4. Anatomie de la vipère à cornes

I.1.4.1. Appareil Venimeux

L'appareil venimeux est constitué de glandes à venin (uni- ou pluricellulaire) et d'un appareil vulnérant capable d'injecter son contenu (toxicité parentérale), constitué soit d'un dispositif à injection (poire à injection, seringue à piston) soit d'un dispositif de pénétration (aiguille, pointe de harpon, mors, dard, soies) (**Chippaux et al., 2006**).

I.1.4.2. Appareil inoculateur

L'appareil inoculateur est un dispositif qui ouvre une brèche suffisante dans le tégument ou le revêtement extérieur de la paroi (peau, cuticule, ...etc) pour permettre la passage du venin, dont l'expulsion est souvent assurée par la contraction d'une couche musculaire entourant la glande à venin (**Chippaux et al., 2006**).

I.1.4.3. Glandes venimeuses

Les glandes venimeuses se situent en arrière de la région orbitaire. Il s'agit en fait de glandes salivaires qui se sont spécifiées. Elles sont compartimentées en lobes et lobules. Au centre, il se forme un réservoir qui débouche sur un canal excréteur (**Goyffon et al., 1994**).

I.1.4.4. Système d'injection

On distingue quatre groupes des serpents en fonction de l'anatomie de la denture sont les aglyphe, les opisthoglyphes, les protéroglyphes, les solénoglyphes (Chippaux et al., 2006).

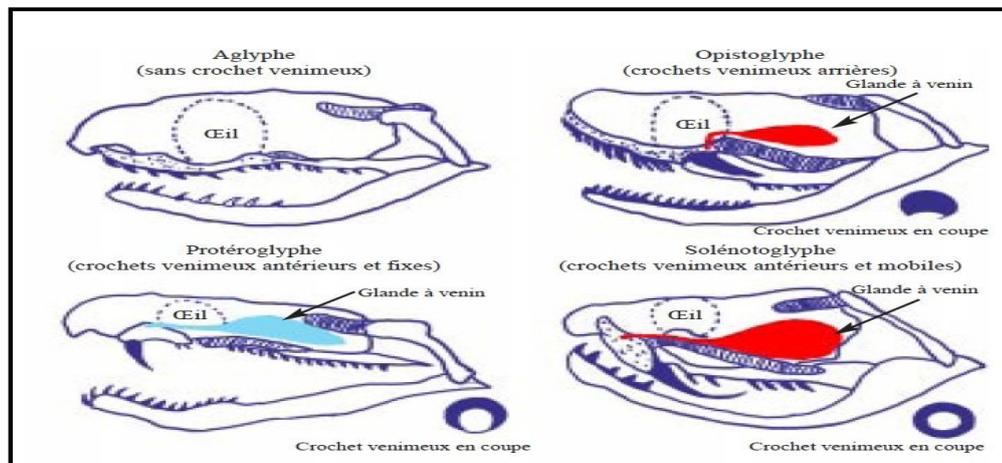


Figure 3: Denture et appareil venimeux des serpent (Chippaux et al., 2006).

Pour les vipères possèdent des crochets à venin sont pointus et creusés d'un canal tubulaire à l'intérieur, un peu comme l'aiguille d'une seringue. Ils sont mobiles, se dresser à la verticale au moment de l'ouverture de la bouche, ce qui autorise leur longueur accrue. Au repos, ils sont repliés dans leur fourreau et plus ou moins plaqués contre le plafond buccal. Lors de la morsure, ils sont plongés avec violence dans les chairs de la proie et l'injection de venin à lieu aussitôt. Les crochets sont ensuite retirés libérant la proie dont la mort est déjà programmée (Christelle, 2006).

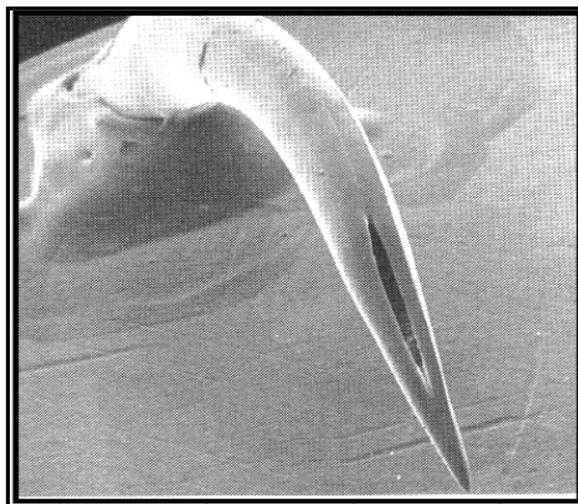


Figure 4 : Crochet de *Cerastes cerastes* (solénoglyphes) (Slavtchev et al., 1969).

I.1.5. Composition et propriétés physico-chimiques des venins de serpents

Le venin de serpent est un liquide jaune ambré ou blanchâtre, il est un mélange de composition complexe, sécrètes pour l'immobilisation et la digestion de la proie. Ils présentent une viscosité de 1,5 à 2,5 et une densité de 1030 à 1050. Leur PH varie de 5,5 à

7 (Boquet, 1966). L'eau présente 70 à 80 % du poids total du venin. Les molécules organiques (protéines bio-actives, polypeptide à faible poids moléculaire) constituent 90 à 95 % de son poids sec (Raaf et al., 1999), et remarquer de certains venins contiennent aussi des ions (Zn, Ca, Cu ou Co) (Bon, 1991). La complexité du venin de serpent, riche en enzymes et en toxines (Chippaux, 2006).

I.1.5.1. Enzymes

Les venins des vipéridés sont caractérisés par des grandes concentrations des enzymes qui sont à l'origine des troubles locorégionaux sévères et des troubles de la coagulation mettant en jeu le pronostic vital (Chafiq, 1991).

a. Phospholipase A2

Constituent une superfamille des enzymes qui catalysent en présence de calcium (Hadjamet et al., 2008), hydrolyse la liaison ester en position deux des glycérophospholipides (Raaf et al., 1999), libérant un acide gras et un lysophospholipide (Ikram, 2009). Les phospholipases A2 interviennent sur plusieurs systèmes physiologiques en fonction du type de phospholipides hydrolysés, hémostasie, transmission neuro-musculaire et réaction inflammatoire notamment (Chippaux, 2002).

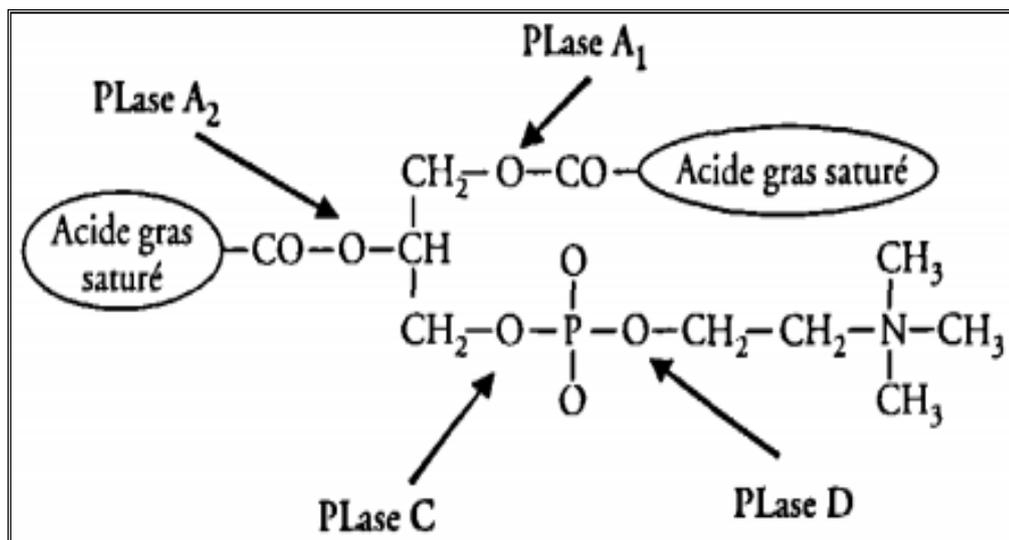


Figure 5 : Site d'action de la phospholipases A2 (Mansouri et al., 2013).

b. Protéase

Sont des glycoprotéines mono ou bicaténaires de 20 à 100 KDa qui se lient à leur substrat grâce à une serine (Chippaux, 2002), elle représentent jusqu' à 20% de protéine totale du venin (Hadjam et al., 2008). Les venins des vipères *Cerastes* sont riches en protéines de type thrombine (protéases à sérine) Parmi les sérines protéinases thrombine-like, on peut citer la cérastocytine issue du venin de *Cerastes cerastes* (Christelle, 2006). La thrombine, protéase à sérine glycosylée, joue un rôle central dans l'hémostasie (Blomback et al., 1967).

Les protéases hydrolysent différents substrats naturels (caséine, gélatine, et hémoglobine) (Labib et al., 1981) et possèdent une activité arginine hydrolase et amidase (Laraba et al., 1992).

c. Hyaluronidases

Cette enzyme est très fréquente dans la plupart des venins (Chippaux, 2002). L'activité de hyaluronidase a été révélée au niveau d'une fraction protéique (Raaf et al., 1999), du poids moléculaire 75 KDa (Hadjam et al., 2008). Elle hydrolyse l'acide hyaluronique ou le sulfate de chondroïtine, qui sont des mucopolysaccharides responsables de la cohésion du tissu conjonctif (Chippaux, 2002). Ce qui facilite la diffusion du venin dans les tissu sous-cutanés (Lakhdar, 2001).

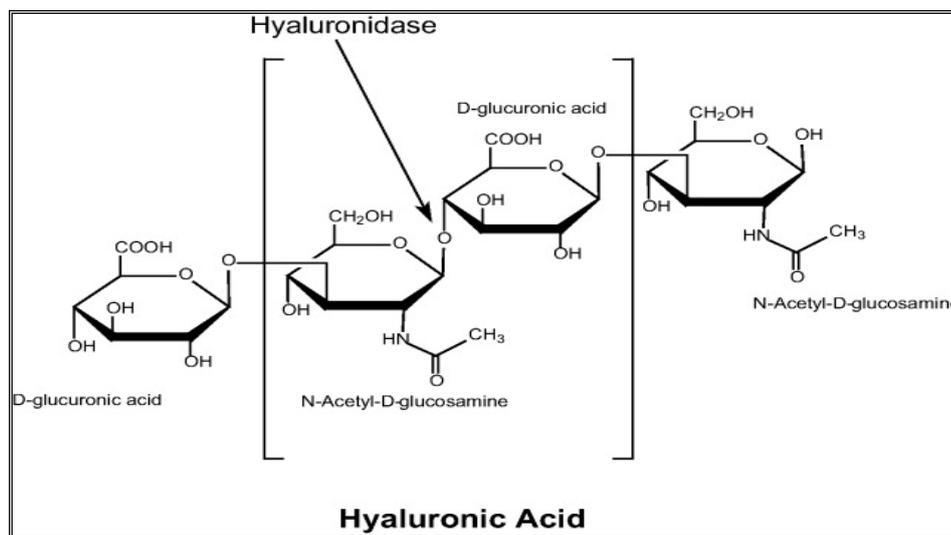


Figure 6: Structure de Hyaluronidase (Lakhdar, 2001).

d. Acides amino-oxydase

Ce sont des oxydo- reductase de nature glycoprotéique (Raaf et al., 1999). Cette enzyme provoque la désamination puis l'oxydation des acides aminés qui sont transformés en acide (X-cétonique) (Chippaux, 2002), de poids moléculaire 135 KDa et un PHi de 4.5 (Hadjam et al., 2008). La traduction clinique et toxicologique est négligeable ; elle représente moins de 1% de la toxicité totale du venin, ce qui s'explique par la faible concentration de cette enzyme. Cette enzyme donne sa couleur jaune au venin (Raaf et al., 1999).

I.1.5.2. Toxine

Ce sont des protéines de poids moléculaire variable, généralement assez faible (Chippaux, 2006), inférieurs à 30 KDa, se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques le plus souvent membranaire (Kassogue, 2006), dont elles inhibent ou perturbent le fonctionnement (Goyffon et al., 2006). Le tropisme des toxines peut être neurologique, cardio-vasculaire, musculaire ou indifférencie selon la distribution anatomique des récepteurs

reconnus (**Kassogue, 2006**). L'effet toxicologique obtenu va être essentiellement dépendant de la quantité de toxine inoculée et du nombre de récepteurs ciblés ainsi que d'autres facteurs comme la constante d'affinité de la toxine pour son récepteur (**Quinton, 2006**), notamment la vitesse de diffusion de la toxine, elle-même fortement dépendante de sa taille, et l'affinité de la toxine pour son récepteur, dont la toxicité. On peut classer les toxines en huit familles principales en fonction de leur structure et/ou de leur mode d'action : les Neurotoxines postsynaptiques, les Myotoxines, les Neurotoxines presynaptiques, (**Kassogue, 2006**).

I.1.6. Symptômes de l'envenimation du vipère à cornes *Cerastes cerastes*

I.1.6.1. Envenimation

L'envenimation est représentée par l'ensemble des manifestations locales et générales induites par la pénétration dans l'organisme d'une substance toxique produite par un animal venimeux (**Mion et al., 2010**).

L'injection du venin se fait sous pression et en profondeur par pénétration hypodermique des crochets de vipère, lesquels sont creusés des canalicules où s'écoule le venin. L'appareil venimeux des vipéridés est le système d'injection du venin le plus efficace. (**Marsh et al., 2000**).

Cette morsure n'est pas toujours synonyme d'inoculation de venin. La glande à venin est entourée de muscles striés, la vipère possède donc la faculté de mordre sans injecter son venin, c'est la morsure blanche ou morsure sèche (**Mion et al., 2010**).

I.1.6.2. Réponse inflammatoire dans le syndrome vipérin

Le syndrome vipérin se traduit par l'association des signes locaux tels que douleur, œdème, nécrose résultant d'une cascade inflammatoire (**Mion et al., 2002**).

Les enzymes présentes dans le venin de vipéridé sont fortement hydrolytiques, afin d'aboutir à la destruction des tissus avec lesquels elles sont en contact (**Stoebner et al., 2001**).

L'activation de la coagulation entraîne l'extravasation secondaire à la destruction des endothéliums aboutissant à un syndrome œdémateux plus au moins associé à des phlyctènes. De plus la formation de plasmine par ce phénomène met en jeu le système des kinines aboutissant à la formation de bradykinine, kinine vasodilatatrice et allogène amplifiant l'œdème. L'activation du complément secondaire à la morsure conduit elle aussi à la formation de bradykinine et d'histamine entraînant un relâchement des fibres lisses artériolaires ainsi qu'une contraction des veinules efférentes provoquant une stase capillaire et une extravasation. L'activation des cellules immunocompétentes conduit à la libération des cytokines proinflammatoires (**Chippaux, 1999**).

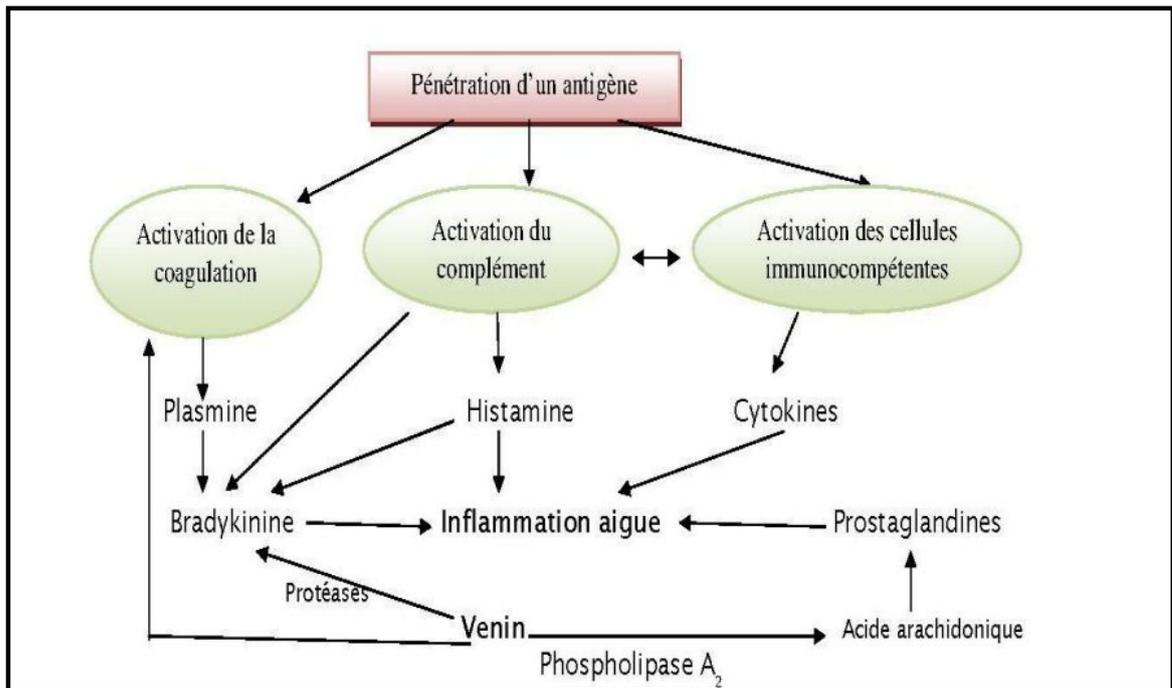


Figure 7: Réponse inflammatoire dans le syndrome vipérine (Mion *et al.*, 2000).

I.1.6.3. Troubles de l'hémostase dans le syndrome vipérin

Les protéines qui agissent sur l'hémostase peuvent être classées en quatre groupes

- Celles qui induisent des troubles de la perméabilité capillaire.
- Celles qui perturbent l'hémostase primaire.
- Celles qui interfèrent avec la coagulation.
- Celles qui activent la fibrinolyse (Mion *et al.*, 2010).

a. Action vasculaire

Des métalloprotéases zinc-dépendantes, appelées hémorragies, détruisent les membranes basales de l'endothélium capillaire (Choumet *et al.*, 2003), et sont responsables du développement de l'œdème, des phlyctènes, de la nécrose, mais aussi d'hémorragies locales ou systémiques (Mion *et al.*, 2002). Les hémorragies sont également responsables d'une inhibition plaquettaire, de la dégradation de facteurs de la coagulation et d'une production du TumorNecrosis Factor- α (TNF- α) (Clemetson *et al.*, 2005).

b. Action plaquettaire

De nombreuses protéines isolées de venins sont capables *in vitro* d'activer ou d'inhiber les plaquettes, deux activités qui peuvent coexister dans le même venin. Le résultante de l'activation, qui provoque une thrombopénie, et de l'inhibition, qui réduit l'activité des plaquettes, est un risque hémorragique (White, 2005).

Elles inhibent l'agrégation plaquettaire en bloquant les intégrines des classes $\beta 1$ et $\beta 3$, protéines de liaison au sous-endothélium. C'est une séquence peptidique des désintégrines,

dite RGD, qui bloque l'interaction entre fibrinogène et séquence RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) des récepteurs GPIIb/IIIa, exprimés en surface des plaquettes activées par l'ADP ou la thrombine (Zingali et al., 1991).

Enzymes interférant avec les plaquettes, certaines phospholipases A2 sont capables d'activer les plaquettes sanguines, tandis que d'autres inhibent l'agrégation plaquettaire. Les phospholipases A2 inhibitrices provoquent l'altération du cytosquelette plaquettaire et l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc (Chippaux, 2002). Certaines phospholipases A2 activatrices libèrent de l'acide arachidonique, d'autres activent les plaquettes par un mécanisme distinct. Les activités phospholipasiques ne sont dans l'ensemble neutralisées que par un sérum spécifique du venin incriminé, ce qui confirme l'hétérogénéité des phospholipases provenant d'espèces différentes (Detrait, 1989). Les protéases se répartissent entre sérine-protéases et métalloprotéases. La plupart des sérine-protéases sont capables de provoquer simultanément l'agrégation et la dégranulation plaquettaire (Chippaux, 2002). Certaines métalloprotéases, comme catrocollastine et la crovidisine, se lient au collagène ou à son récepteur par l'intermédiaire de leur domaine riche en cystéine ou désintégrine-like et provoquent une inhibition de l'agrégation plaquettaire. De nombreuses enzymes thrombine-like entraînent une activation plaquettaire soit en clivant les récepteurs d'activation plaquettaire, soit en se liant à GPIb (Clemetson, 2005).

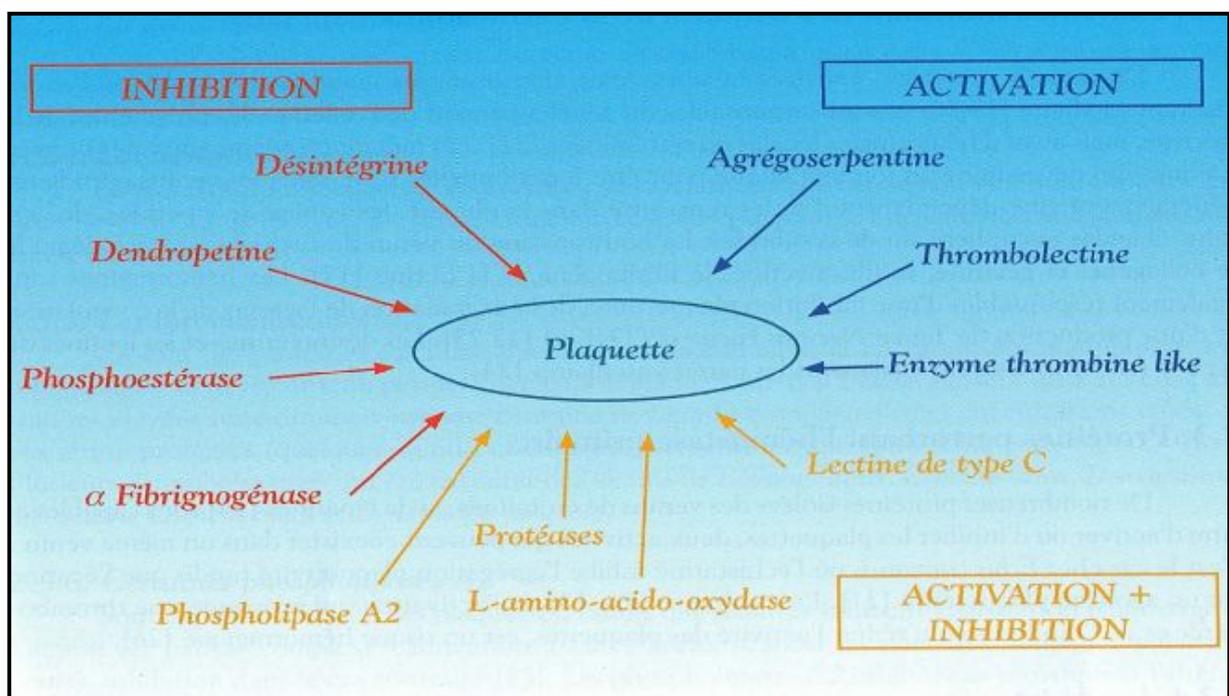


Figure 8 : Action du venin sur l'hémostase primaire (Mion et al., 2010).

c. Action sur la coagulation

Les venins ophidiens agissent sur l'ensemble des étapes de la coagulation. Chaque protéase procoagulante possède des propriétés analogues à l'un des facteurs de la coagulation dont elle prend la place: c'est le principe de substitution. Lorsque le processus de coagulation est activé, il persiste jusqu'à épuisement d'un ou plusieurs facteurs de la coagulation (consommation) et conduit à un syndrome hémorragique dû le plus souvent, à une afibrinogénémie (**Mion et al., 2002**). La thrombocytine, possède des propriétés plus étendues, outre le facteur V, elle hydrolyse les facteurs XIII et VIII, la prothrombine, le fibrinogène et elle active les plaquettes. Décrites chez la plupart des familles de serpents venimeux, elles hydrolysent les phospholipides qui jouent rôle de support indispensable à différents niveaux de la coagulation, en particulier la transformation de la prothrombine en thrombine(**Chippaux, 2002**). Certaines phospholipases peuvent également entrer en compétition avec les facteurs de la coagulation (**Clemetson et al., 2005**). Enzymes thrombine-like ou thrombiniques, ces sérine-protéases, hydrolysent directement le fibrinogène en fibrine (**Mion et al., 2002**).

d. Action fibrinolytique

Associées aux hémorragies, les protéines ophidiennes qui activent la fibrinolyse peuvent être à l'origine de saignements dramatiques (**Braud et al., 2003**). Elles stimulent les activateurs du plasminogène d'origine tissulaire principalement, notamment l'urokinase, sérine-protéase qui favorise la libération de plasmine naturelle, dont l'activation permet l'hydrolyse de la fibrine et du fibrinogène. Des enzymes fibrinolytiques isolées dans les venins de vipéridés sont capables, comme la plasmine, d'hydrolyser directement le fibrinogène et la fibrine (**Clemetson, 2005**). Certaines d'entre elles ont une action antiagrégante.

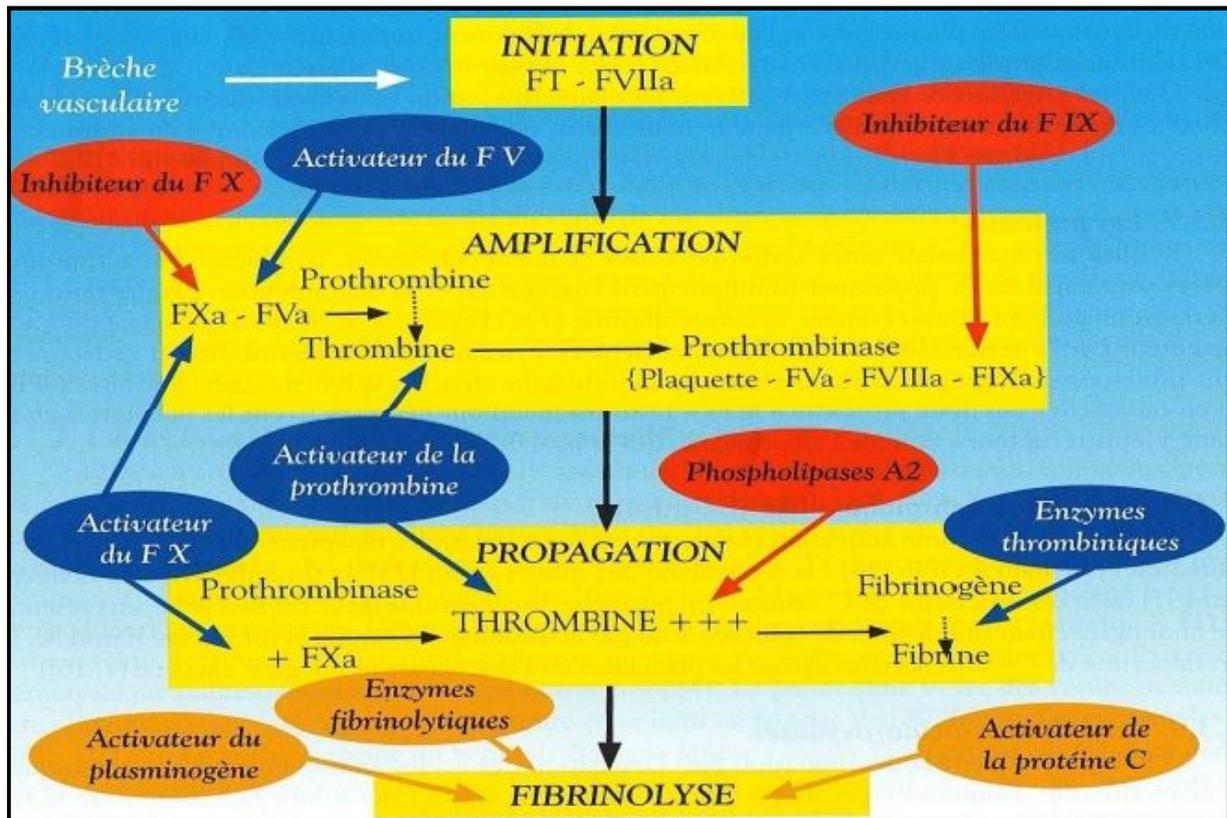


Figure 9: Action du venin sur la coagulation et la fibrinolyse (Mion *et al.*, 2010).

I.1.6.4. Signes neurologiques

Les envenimations par le venin des vipéridés donnent rarement des signes neurologiques. Des symptômes pouvant être liés à un effet neurotoxique peuvent survenir. Ces signes sont dus à des phospholipases A2 neurotoxiques présentes dans le venin de certaines vipères (Jose *et al.*, 2002).

La physiopathologie est liée à des neurotoxines qui se fixent de façon rapide et irréversible au niveau de la plaque motrice, les α -neurotoxine, post- synaptiques, coiffent le récepteur nicotique, bloquant ainsi l'accès à l'acétylcholine, et entraînant une paralysie similaire à celle induite par le curare. L' α -bungarotoxine est bien connue des médecins anesthésistes car il s'agit de l'antagoniste expérimental de référence pour les récepteur nicotinique de type 2.

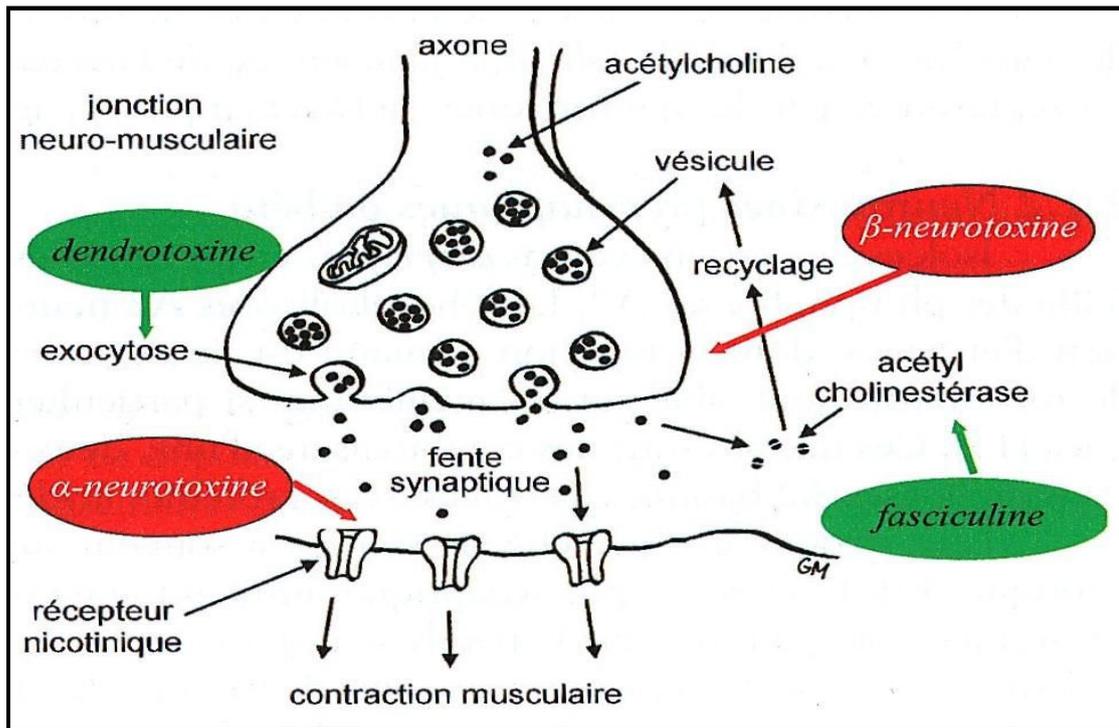


Figure 10: Mécanisme d'action des neurotoxines (Ouahbi, 2013).

Les neurotoxines agissent sur la jonction neuromusculaire et ont donc une action périphérique. Il s'agit surtout de neurotoxines présynaptiques ou de neurotoxines β appartenant à la famille des phospholipases A2. Elles inhibent le recyclage de l'acétylcholine dans les vésicules synaptiques pouvant aboutir à une paralysie respiratoire (Mion et al., 2010).

I.2.1. Histoire du *Matricaria* (camomille)

Le nom de la plante est issu du grec. Il fait référence au fait que la camomille pousse près du sol.

Diverses espèces de camomille ont fait l'objet de nombreux usages médicaux depuis l'Antiquité. On rapporte que le pharaon Ramsès II fut embaumé avec de l'huile essentielle de camomille romaine. À la suite des Égyptiens, les Grecs et les Romains auraient adopté cette espèce de camomille dont l'usage s'est répandu en Europe lors de l'expansion de l'Empire romain. Chez les Anglo-Saxons, la camomille (vraisemblablement la romaine) était considérée comme l'une des sept plantes sacrées.

La camomille a été utilisée en Égypte ancienne pour traiter la fièvre et l'insolation. Au VI^e siècle, elle employait, pour soulager l'insomnie, les maux de dos, les rhumatismes et l'indigestion.

La camomille fait actuellement partie intégrante de la pharmacopée de 26 pays. Elle entre dans la composition d'une multitude de préparations pharmaceutiques populaires, surtout en Europe. Dans le monde plus d'un million de tasses de camomille se boit chaque jour (**Abana et al., 2014**).

I.2.2. Systématique de *Matricaria pubescens*

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)

Embranchement : Phanerogamae (Phanérogames)

Sous-embranchement : Magnoliophytina (Angiospermes)

Classe : Magnoliopsida (Dicotyledones)

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae (Compositae)

Genre : *Matricaria*

Espèce : *Matricaria pubescens*

➤ Noms usuels

Français : Camomille

Vernaculaire (Arabe) : Guretoufa , Ouazouza (**Mahdjar, 2013; Zarrour, 2012**).

I.2.3. Répartition géographique

La plupart des matricaires sont très fréquents dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie, et en Amérique, ainsi que dans le nord et le sud de l'Afrique, et certaines sont naturalisées en Australie. *Matricaria pubescens* est largement distribué dans tout le Sahara, il s'agit d'une espèce endémique nord-africaine; Algérie, Maroc, Tunisie, qu'elle pousse en abondance dans les régions sahariennes. On rencontre particulièrement dans tout le Sahara septentrional et central (Abana et al., 2014).

I.2.4. Description botanique de la plante

Matricaria pubescens est une plante spontanée, c'est une plante à 10-20 cm de haut, atteignant rarement 40 cm (Makhloufi, 2010).



Figure 11: La plante du *Matricaria pubescens* (Zarrou, 2012).

Les tiges a nombreuses couchées puis redressées et sous forme de touffes, à couleur vert foncé minces sont seulement très légèrement. Les feuilles découpées et velues sont d'un vert sombre, chaque lobe se finissant en un bout blanc, sont légèrement charnues et sont entre 10 et 20 mm de long. Involucre à bractées et ayant une marge membraneuse large, les fleurs sont toutes en tubes, groupées dans hémisphère de coloration jaune, sont groupées en capitules dont le diamètre est de 5 à 8 mm. Les fruits sont des akènes avec une petite aigrette membraneuse pour aider la dispersion. La floraison a lieu au printemps à tout monument après la pluie au Sahara algérien central. Il est entièrement rassemblée fraiche au printemps (Metrouh et al., 2015).

I.2.5. Utilisation traditionnel du *Matricaria pubescens*

Dans une large mesure, l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle est très variée. Selon le nombre des personnes provenant de différentes parties du désert, elle est préparée comme une poudre et utilisée intérieurement, et utilisée pour traiter la dysménorrhée les douleurs des maladies infectieuses et de l'abdomen, et la sécheresse, la dentition, les allergies, et la morsure des scorpions, et calculs biliaires (**Zarrou, 2012**). *Matricaria pubescens* a versé dans l'oreille recommande pour l'otite et utilise dans le massage avec l'oleum pour le rhumatisme, la névralgie et sciatique (**Benhouhou, 2010**). Les tiges écrasées avec les feuilles sont utilisées comme un filtre pour le beurre de la chèvre, donnant un arôme agréable au beurre et aidant pour la conserver. Elle est aussi ajoutée à la soupe traditionnelle et donne une odeur très agréable à la nourriture, elle peut être ajoutée au thé (**Makhloufi et al., 2012**).

I.2.6. Etude phytochimique de *Matricaria pubescens*

I.2.6.1. Principaux métabolites secondaires

A l'exception des alcaloïdes, les recherches phytochimiques ont permis de mettre en évidence, dans le genre *Matricaria*, tous les composés. Ces dernières, lors des études chimio systématiques, ont montré une grande variété de métabolites secondaires et des procédés biosynthétiques différents. Des travaux réalisés sur l'espèce *Matricaria pubescens* ont permis d'isoler des métabolites secondaires divers tels que polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines, ...etc (**Mahdjar, 2013**).

a. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal, ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Les polyphénols comportant au moins 8000 composés connus différentes (**Collin et al., 2011**), la structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques (noyau benzénique) (Figure 13) auquel portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (**Boubekri, 2014; Zeghad, 2009**).

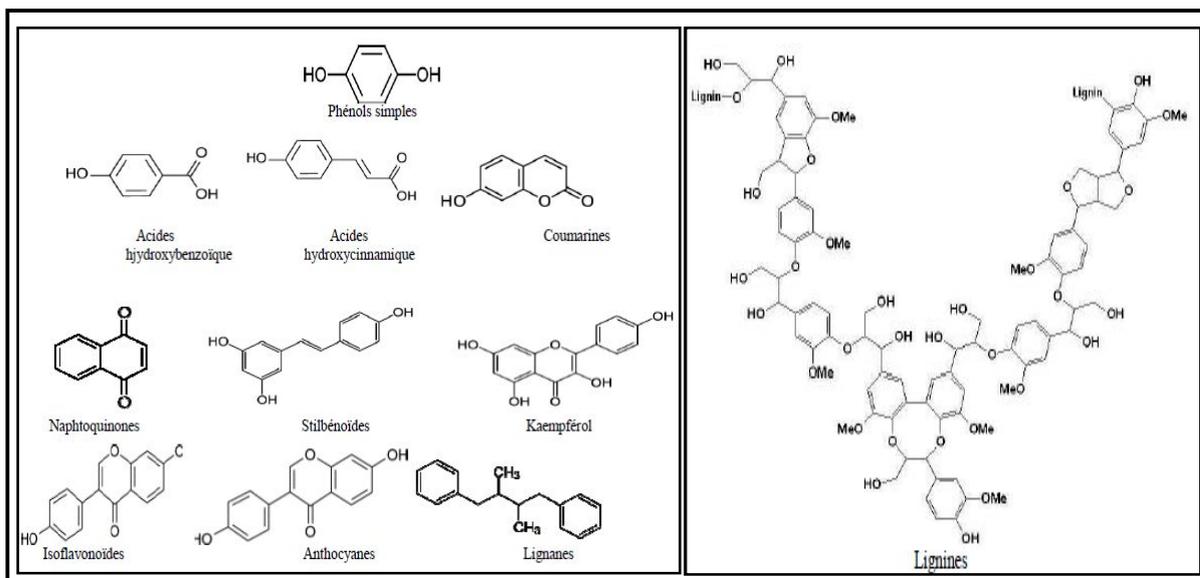


Figure 12: Structures chimiques des principaux polyphénols (Scalbert et al., 2000).

❖ Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relie. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes. Aussi les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (Figure 14) (Manallah, 2012).

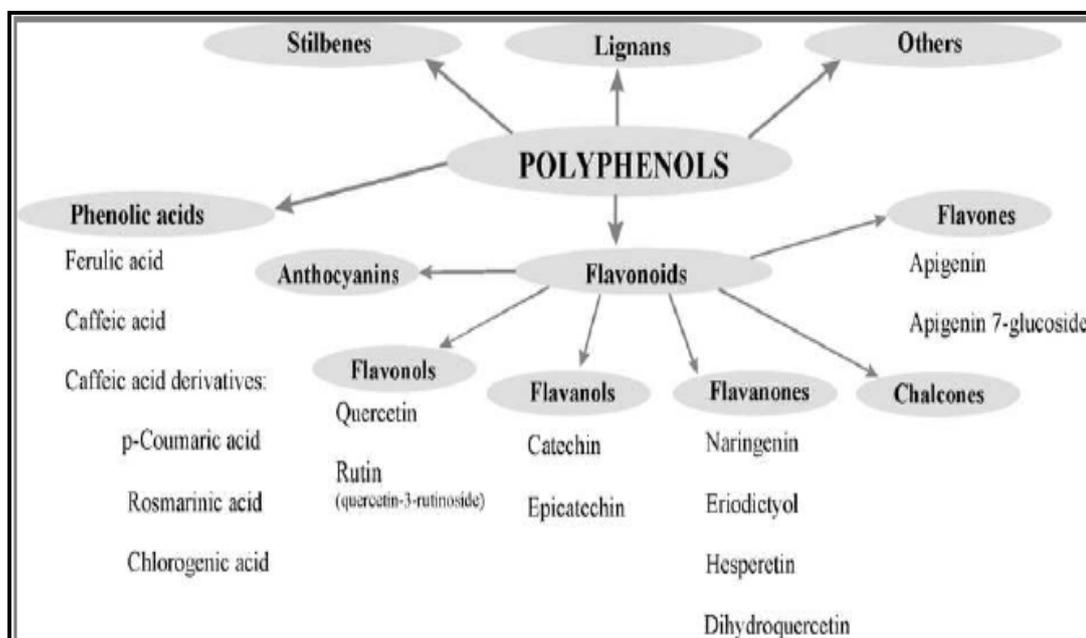


Figure 13: Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe. (Boros et al., 2010).

- Les phénols simples (C6): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6–C1).

- Les flavonoïdes (C6-C3-C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les stilbènes (C6-C2-C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes: 2 unités de phénylpropane.
- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols (Collin et al., 2011).

b. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont des pigments quasiment universels des végétaux, et qui sont la partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Lenoir, 2011). Les flavonoïdes (Figure 15) sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), correspondant à la structure du diphenylpropane, les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Collin et al., 2011).

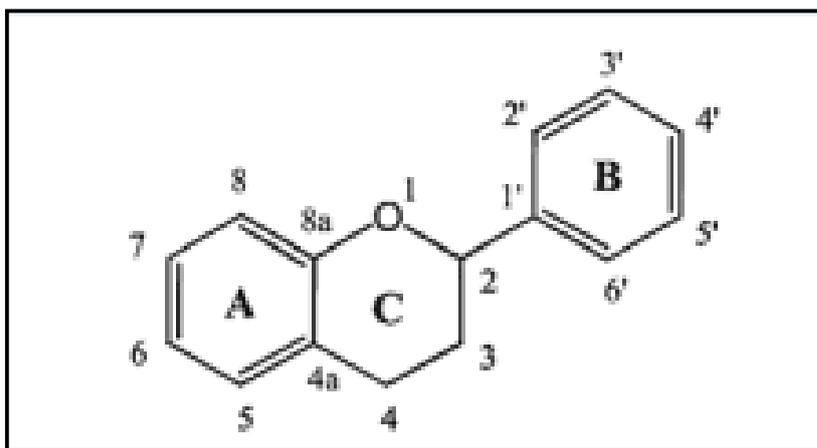


Figure 14: Structure générale des flavonoïdes (Zeghouane, 2014).

On distingue différentes structures des flavonoïdes parmi lesquels se trouvent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan-3-oles, les flavylum, les chalcones, les auronnes, les isoflavones, les isoflavonols, les isoflavanes, les ptérocarpanes, les coumaronochromones, les 3-arylcoumarines, les coumestanes, les roténoïdes (Muanda, 2010).

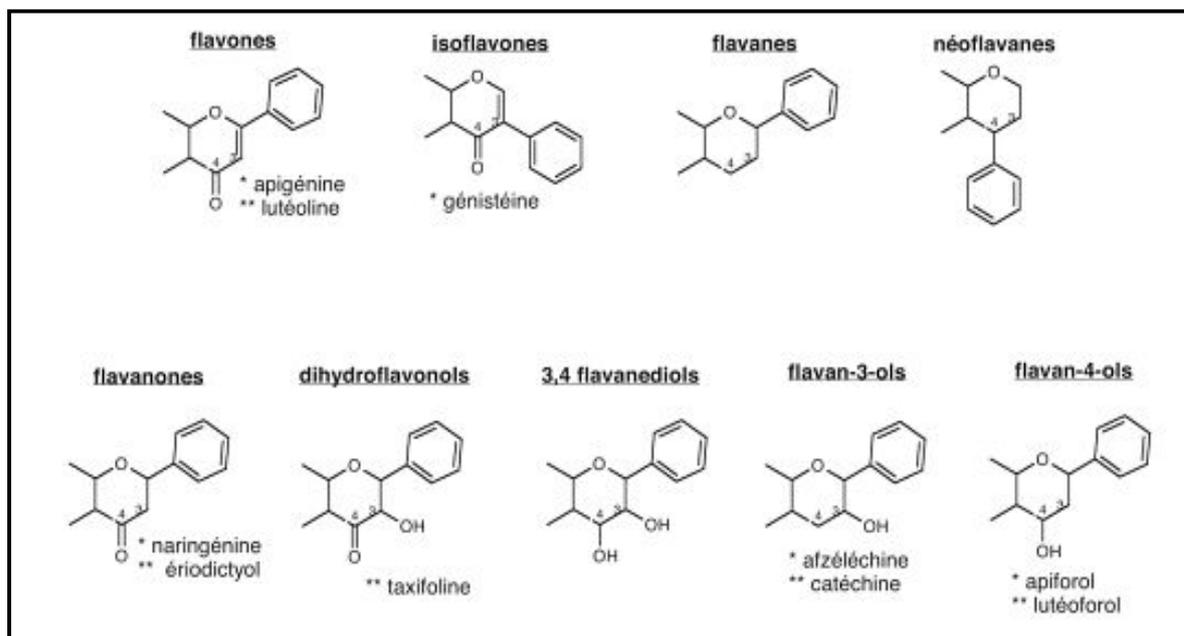


Figure 15: Structure chimique des quelques flavonoïdes (Scalbert et al., 2000).

- **Propriétés biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes. Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes. Les flavonoïdes, en particulier, sont impliqués chez les plantes dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse, et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant. Les flavonoïdes empêchant de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (Zarrou, 2012).

Les flavonoïdes seraient impliqués dans la prévention des cancers, ajoutés au régime de divers animaux de laboratoire, ils limitent le développement de tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse (Petti et al., 2009), aussi les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase A2 (Bentabet, 2008). Parmi les propriétés biologique essentielle des flavonoïdes sont:

❖ Effets antioxydant

Un antioxydant peut être défini comme étant un principe oxydable qui introduit dans le cycle de l'auto-oxydation, en détourne le cours et en neutralise les effets tant qu'il existe. Les antioxydants biologiques étant considérés comme les composés qui protègent le système biologique contre les dommages ou les réactions liés à une oxydation excessive (**Zga, 2010**).

Les flavonoïdes en agissant comme antioxydant, ils expriment les propriétés antioxydantes par; le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, et la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (**(Manallah, 2012; Metrouh-Amir et al., 2015)**).

La propriété antioxydante des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante (**Bentabet, 2008**).



❖ Effets anti inflammatoires

Une inflammation est une réaction de défense immunitaire non spécifique, qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur (**Henrotin et al., 2001**).

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes (la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase) qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation, en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego et al., 2007**) d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim et al., 2004**).



CHAPITRE 2

MATRICARIA PUBESCENS



PARTIE II
MATERIEL ET
METHODES

II. Matériels et méthodes

Dans ce volet, nous allons voir le matériel biologique, et les méthodes utilisées dans laboratoire concernant la plante et le vipère, suivi par les coupes histologiques et en fin l'exploitation des résultats par les différentes analyses.

II.1. Matériels biologiques

II.1.1. Plante

La plante étudiée (*Matricaria pubescens*) a été récolté au début du mois de mars au mois de mai 2015, dans la zone de Taleb El Arbi, cette zone situe au Nord -Est de la wilaya d'El-Oued.

Les différents organes du matériel végétal ont été séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité à une température ambiante pendant quelques jours.



Figure 16: Photo représente la plante étudiée (*Matricaria pubescens*).

II.1.2. Venin

Dans notre étude, nous avons extrait le venin des trois individus des serpents de *Cerastes cerastes*, les serpents étudiés ont été colletés, mâtinés, à la fin du mois de septembre et au début du mois d'octobre, dans la région du souf exactement dans la commune de Regueba.

II.1.3. Lapins

L'étude a été réalisée sur 10 lapins Albinos de sexe mal, fournis par l'institut de Pasteur à Alger, leur poids varie entre 1,5 Kg à 2 Kg.



Figure 17: Photo présente les lapins albinos.

On divise nos lapins en trois lot, le premier lot est le témoin (deux lapins), le deuxième lot à été injecté par le venin (quatre lapins) et le troisième à été injecté par le venin et après par l'extrait de la plante (quatre lapins).

II.2. Réactifs

Dans notre étude, les kit des réactif que nous avons utilisé pour faire l'analyse biochimique sont synthétisés par BIOMAGHREB.

II.3. Méthodes d'extraction

II.3.1. Méthode d'extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée par la méthode décrite par **Bekkara et al., 1998**. Le solvant que nous avons employé pour le partage liquide-liquide est l'acétate d'éthyle.

On prend 200 g de la plante *Matricaria pubescens* qu'on met dans deux erlenemeyer qui contiennent 1000 ml de méthanol, pendant 24 h pour faire la macération et (on refait cet étape trois fois), après filtration par papier de filtre, les solutions méthanoliques sont évaporées sous pression réduite dans un évaporateur rotatif type Rotavapor R.210/215 sous pression réduite à 60°C.



Figure 18: Photo représente l'étape de la macération et la filtration.

Les résidus secs obtenus de la plante étudiée, sont mélangés avec 100 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter.

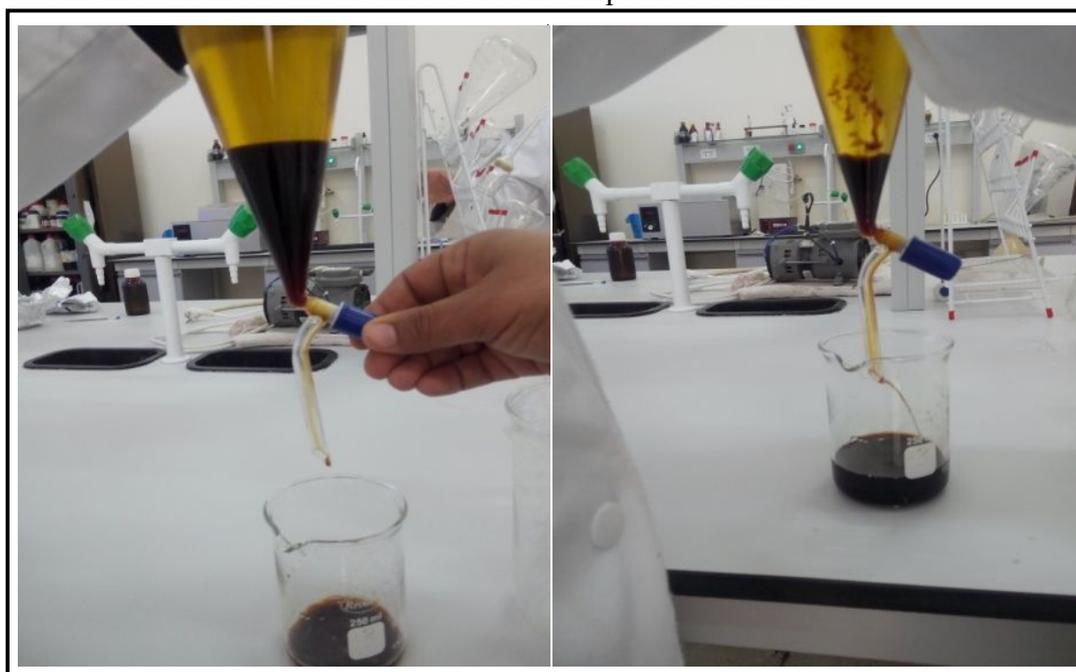


Figure 19: Photo représentant la séparation de phase liquide-liquide.

Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau mélangée avec 100 ml d'acétate d'éthyle. phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif (Rotavapor R.210/215) sous pression réduite à 60°C. Le résidu sec est pesé pour calculer le rendement des flavonoïde de cette plante étudiée.



Figure 20: Photo représente le phase de séchage par l'évaporateur rotatif (Rotavapor R.210/215).

On prend quelques millilitres d'eau physiologique qu'on ajoute aux résidus secs et qu'on le conserve à une température de 4°C.

II.3.2. Méthodes d'extraction du venin

L'extraction du venin se fait manuellement à la main, on presse sur la tête et sur la queue de serpent pour stimuler l'extraction du venin; cette opération est faite par Monsieur Makkaoui Maamer, au laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université d'Echahid Hamma Lakdhar, au mois de novembre 2015.



Figure 21: Photo représente la méthode de l'extraction du venin.

On a obtenu 38 μ l de venin. Après on fait la dilution du venin à 1/100 μ l et on le conserve à 4°C.



Figure 22: Photo représente la quantité du venin extraite.

II.4. Injection du venin et des flavonoïdes

Les doses de l'injection sont préparées selon le protocole de **Laraba et al., 2009**, on injecte 25 μ g du venin pour 20 g du poids du lapin, et pour l'extrait de la plante on injecte 100 μ l pour 200 g du poids du lapin. L'injection est sous cutané. Pour le premier groupe qui est le témoin, on n'injecte rien, pour le deuxième groupe, nous avons injecté le venin selon l'ordre des lapins et on a attendu 24 heures pour faire les égorger.



Figure 23: Photo représente l'injection du venin et flavonoïdes.

Nous avons injecté aussi au dernier groupe des lapins le venin, après 30 min on a injecté l'extrait de la plante (flavonoïde) et on attendu 24 heures, pour égorger des lapins , pour faire les analyses biochimique et les coupes histologique.



Figure 24: Photo représente l'égorgement des lapins.

II.5. Réalisation des coupes histologiques

Après avoir égorger des lapins, les organes vitaux (foie, reins, cerveau, poumons, muscle) ont été, lavées dans l'eau physiologique, et conserves dans le formol 36% .

II.5.1. Etapes de coupe histologie

a. Fixation

Pour la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol. La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements .

b. Inclusion

Pour permettre la réalisation des coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur du quel la pièce prélevée est incluse.

c. Coupes

Le coupage du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 μm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.



Figure 25: Photo représente l'appareil de microtome.

d. Colorations

Les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les colorations les plus utilisées: l'Hématoxyline-Eosine (H.E.)

e. Montage

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » prête à être observée au MO.

II.6. Prélèvement sanguins

Après le prélèvement, on observe que le sang a été coagulé mais on a essayé de faire les bilans biologiques possibles:

Glycémie, Créatinine, Transaminases(TGO/TGP), Urée, Cholestérol, Triglycérides, Fibrinogène, Temps de Cephaline–Kaolin ou Céphaline active (TCK), Taux de prothrombine (TP).

II.6.1. Méthode de dosage de la Glycémie

✓ Principe

La glycémie est dosée selon la méthode de (**Trinder et al., 1969**), La détermination enzymatique du glucose est selon les réactions suivantes:





✓ Réactifs

Réactif 1	Tampon Tris pH=7	100 mmol/l
Solution tampon	phénol	0,3 mmol/l
Réactif 2	Glucose oxydase	10 000 U/ L
Enzymes	Peroxydase	1000 U/L
Amino-4-antipyrine	2,6 mmol/l	
Réactif 3	Glucose	100 mg/dl
Standard		1g/l
	5,56 mmol/l	

✓ Mode opératoire

Longueur d'onde : 505 nm (490-550)

Température : 37°C (20-25°C)

Cuve : 1 cm d'épaisseur

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10µl

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

On mélanger selon le tableau ci-dessus. En suite, on peut lire les DO après une incubation de 10 minutes à 37°C ou 30 mn à 20-25 °C la coloration est stable durant 30 minutes.

✓ Calcul:
$$\text{Glucose} = \frac{D.O \text{ Echantillon}}{D.O \text{ Standard}} \times n$$

$$n = 1 \text{ g/l}$$

II.6.2. Méthode de dosage des Triglycérides

✓ Principe

Les triglycérides sont déterminés selon la méthode de (Fossati, 1982), qui est basée sur les réactions suivantes :

Triglycérides $\xrightarrow{\text{Lipoprotéine lipase}}$ Glycérol + Acides gras

Glycérol + ATP $\xrightarrow{\text{GlycéroKinase}}$ glycérol-3-P + ADP

Glycérol-3-Phosphate + O₂ $\xrightarrow{\text{Glycérol-3-Phosphate oxydas}}$ H₂O₂ + Dihydroxyacétone-P

H₂O₂ + amino-4-antipyrine + chloro -4-phénol $\xrightarrow{\text{Péroxydase}}$ Quinone rose + H₂O

✓ **Réactifs**

Réactif 1	Tampon Pipes pH7.2	50 mmol/l
Solution tampon	Chloro-4-Phenol	2 mmol/l
Réactif 2	Lipoprotéine lipase	150000U/l
	Glycérokinase	800U/l
	Glycérol 3-P-Oxydase	4000U/l
	Amino-4-antipyrine	0.7 mmol/l
	ATP	0.3 mmol/l
Réactif 3	Standard glycérol	200 mg/dl
	standard (en trioléine)	2 g/l
	2.28 mmol/l	

✓ **Echantillons**

Sérum , plasma recueilli sur héparine.

✓ **Mode opératoire**

Longueur d'onde 505nm (490-510)

Température..... 37°C

Cuve 1cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 m	1ml

Mélanger et lire les densités optiques après une incubation de 5 min . à 37 °C ou de 10 min à 20-25°C . La coloration est stable après 30 minutes .

✓ **Calcul** Triglycérides = $\frac{D.O \text{ Echantillon}}{D.O \text{ Standard}} \times n$

$$n = 200 \text{ Mg/dl}$$

$$n = 2 \text{ g/l}$$

$$n = 2.28 \text{ Mmol/l}$$

II.6.3. Méthode de dosage du Cholestérol

✓ Principe

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation selon la méthode de (Fasce, 1982), L'indicateur quinone- imine est formé à partir du peroxydase d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence de phénol et de peroxydase.

Détermination enzymatique selon les réactions suivantes :



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol

✓ Réactifs

Réactif 1	Pipes pH6.9	90 mmol/l
	Solution tampon	Phénol 26 mmol/l
Réactif 2	Cholestérol oxydase	300U/l
	Peroxydase	1250U/l
	Cholestérol esterase	300U/l
	Amino-4-antipyrine	0.4 mmol/l
Réactif 3		200 mg/dl
	standard	2 g/l
		5.17 mmol/l

✓ Préparation et stabilité

Dissoudre le contenu d'un flacon de R2 avec un flacon de tampon R1.

Le réactif de travail est stable : 1 mois à 20-25°C et 4 mois à 2-8°C.

✓ Echantillons Sérum plasma recueilli sur héparine.

✓ Mode opératoire

Longueur d'onde505nm (490-510)

Température.....37°C

Cuve1 cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 m	1ml
Mélanger et lire les densités optiques après une incubation de 5 min . à 37 °C.			
La coloration est stable 30 minutes .			

✓ Calcul $\text{Cholestérol} = \frac{D.O \text{ Echantillon}}{D.O \text{ Standard}} \times n$

$$n = 200 \text{ Mg/dl}$$

$$n = 2 \text{ g/l}$$

$$n = 5.17 \text{ Mmol/l}$$

II.5.4. Méthode de dosage de l'Urée

✓ Principe

L'urée est dosée en cinétique selon la méthode de (**Berthelot, 1859**), par la réaction suivante:



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

✓ Réactifs

Réactif	Tampon	
Réactif 2	EDTA	2 mmol/l
	Salicylate de sodium	60 mmol/l
	Nitroprussiate de sodium	32 mmol/l
	Uréase	30000U/l
	Phosphate pH 6.7	60 mmol/l
Réactif 3	Etalon urée	0.50 g/l
		8.325 mmol/l
Réactif 4	Hypochlorite de sodium	40 mmol/l
10 × []	Hydroxyde de sodium	150 mmol/l

✓ Echantillons

Sérum , plasma recueilli sur héparine.

Urine diluée au 1/50 avec de l'eau distillée.

✓ Mode opératoire

Longueur d'onde590nm (578 Hg)

Température.....25-30-37°C

Cuve1 cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail A	1 ml	1 m	1 ml
Mélanger , incuber 5 min . à 37 °C ou 10 min à 20-25°C . Ajouter ensuite.			
Réactif 4	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger , incuber 5 min . à 37 °C ou 10 min à 20-25°C . Lire contre le blanc . Stabilité de la coloration 2 heures à l'abri de la lumière			

✓ **Calcul:**
$$\text{Urée} = \frac{D.O \text{ Echantillon}}{D.O \text{ Standard}} \times n$$

n= 0.50 g/l

n= 8.325Mmol/l

II.6.5. Méthode de dosage de la Créatinine

✓ Principe

La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine selon la méthode de (**Larsen et al., 1972**).

✓ Réactifs

Réactif 1	Hydroxyde de sodium	1.6 mol/l
Réactif 2	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif 3	Créatine	2 mg/dl
Standard		20mg/l
		176.8 µmol/l

✓ Echantillons

Sérum, plasma recueilli sur héparine.

Urine diluée au 1/20 dans l'eau distillée (tenir compte de la dilution pour le calcul).

✓ **Mode opératoire**

Longueur d'onde492nm (490-510)

Température.....25-30-37°C

Cuve1cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

	Standard	Echantillon
Standard	100 µl	--
Echantillon	--	100 µl
Réactif de travail	1ml	1ml
Mélanger et lire les densités optiques DO1 après 30 sec .		
Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après.		

✓ **Calcul**Calculer $\Delta DO = DO2 - DO1$ pour le standard et les échantillons.

$$\text{Créatinine} = \frac{\Delta D.O \text{ Echantillon}}{\Delta D.O \text{ Standard}} \times n$$

$$n=20 \text{ Mg/l}$$

II.6.6. Mesure de l'activité de l'Alanine aminotransférase✓ **Principe**

La mesure de l'activité de TGP est selon La méthode de (**Bergmeyer et al., 1976**), la détermination cinétique de l'activité Alanine amino transférase selon les réaction suivants :



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

TGP: transaminase Glutamate pyruvate.

LDH: lactate Déshydrogénase.

✓ Réactifs

Réactif1	Tampon Tris PH 7.5 à 30 °C	100mmol/l
Solution Tampon	Alanine	500mmol/l
Réactif2	NAD	0.18mmol/l
substrat	LDH	1200U/l
	Oxoglutarate	15mmol/l

✓ Echantillon

Sérum ou plasma héparine sans hémolyse.

✓ Mode opératoire

Longueur d'onde 340nm

Température.....25-30-37°C

Cuve1cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

Volume de travail	1ml	3ml
Pré incuber à la température choisie (25,30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute . Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		

✓ Calcul

$$A_{340 \text{ nm}} \quad \Delta \text{DO}/\text{min} \times 1750 = \text{UI/L}$$

II.6.7. Mesure de l'activité de l'Aspartate aminotransférase

✓ Principe

La mesure de l'activité de TGO est selon La méthode de (**Bergmeyer et al., 1976**) , la Détermination cinétique de l'activité Aspartat amino transférase selon les réaction suivants :



✓ Calcul

$$A_{340 \text{ nm}} \quad \Delta \text{DO}/\text{min} \times 1750 = \text{UI/L}$$

II.6.8. Méthode de dosage du Fibrinogène

✓ Principe

En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma préalablement dilué est inversement proportionnel à la quantité de fibrinogène plasmatique.

✓ Réactifs

Réactif 1	Thrombine bovine
Thrombine	
Réactif 2	Tampon veronal pH = 7,35
Diluents	

✓ **Echantillon** : Sérum ou plasma héparine sans hémolyse.

✓ Mode d'opérateur

Diluer le plasma au 1/10 dans le tampon R2. Cette dilution permet d'obtenir habituellement un temps de coagulation compris entre 8 et 25 secondes. (fibrinémie comprise entre 1,5 et 4 g/l).

Si le temps de coagulation est inférieur à 8 secondes répéter test sur une dilution au 1/20 ou éventuellement au 1/30. Dans ces derniers cas le résultat obtenu sera multiplié par 2 ou 3 respectivement.

Si le temps est supérieur à 25 secondes refaire le test sur une dilution au 1/5 ou éventuellement au 1/2. Dans ces derniers cas les résultats obtenus sont divisés par 2 ou 5 respectivement.

Dans la cuve de l'appareil distribuer	
Plasma dilué	100µl
Incuber 1 min à	37°C
R1 non incubé	50µl
Noter le temps de coagulation	
Faire une double détermination par dosage	

✓ Calcul

Le taux de fibrinogène est obtenu en multipliant le résultat trouvé sur le tableau

$$\text{par : } \frac{10 - (9\text{hte}^*)}{9 - (9\text{hte})} \quad * \text{ Hte} = \text{Hématocrite}$$

II.6.9. Mesure de Temps de Céphaline active (Céphaline – Kaolin)

✓ Principe

La Céphaline, extrait de lipides cérébraux, utilisée comme substitut des facteurs plaquettaires, permet de mesurer globalement les déficits en facteurs plasmatiques de la thromboplastino-formation endogène. Le Kaolin est employé comme activateur des facteurs de la phase contact.

✓ Réactifs

Céphaline Kaolin: Reprendre le flacon par 3 ml d'eau distillée. Laisser 15 minutes à la température ambiante (20-25°C). Agiter fréquemment avant toute utilisation. Chlorure de Calcium 0,025 M, prêt à l'emploi.

✓ **Echantillon:** Sérum ou plasma héparine sans hémolyse.

✓ Mode opératoire

Toute détermination doit être faite en double Dans un tube placé au bain marie à 37°C mettre successivement.

Plasma du malade ou plasma témoin	0,1 ml
Céphaline-Kaolin	0,1 ml
Après incubation de 3 mn, ajouter en déclanchant simultanément le chronomètre.	
Ca Cl ₂ 0.025 M pré-incubé à 37°C	0,1 ml
Noter le temps de coagulation.	

II.6.10. Méthode de mesure le taux de prothrombine (TP)

✓ Principe

Le taux de prothrombine est la transformation d'un temps de coagulation (temps de Quick) en pourcentage. Le temps de Quick est réalisé en mettant en présence un plasma citraté (donc anticoagulé par chélation des ions calcium) avec un réactif : la thromboplastine calcique, qui joue le rôle d'activateur tissulaire de la coagulation. Le plasma coagule et le temps obtenu s'appelle le temps de Quick. On réalise les temps de Quick pour des plasmas témoins que l'on dit avoir un taux de prothrombine (TP) à 100 % et les temps de Quick pour des plasmas dilués (TP à 50 % et 25 %). On obtient ainsi une droite qui permet ensuite de transformer chaque TQ en TP.

✓ Calcul

Il est calculé comme suit
$$INR = \left(\frac{TQ_{\text{Patient}}}{TQ_{\text{Témion}}} \right) ISI$$

Avec :

- TQ_{patient} : le temps de Quick mesuré pour le plasma du patient à tester .
- TQ_{témoin} : le temps de Quick témoins (TP = 100 %) .
- ISI : l'indice de sensibilité international spécifique du réactif thromboplastine utilisé.
- INR : rapport international normalisé.

II.7. Analyses statistiques

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel statistique informatisé EXEL 2007 et MiniTab13Fr. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les témoins, les lapins dont on a injecté le venin et les lapins dont on injecté le venin et les flavonoïdes, est réalisée par le test « t » de Student; les différences sont significative à * $P < 0.05$; très significative à ** $P < 0.01$; hautement significative à *** $P < 0.001$ et non significative à $P > 0.05$, pour donner les résultats pour les différents paramètres.



PARTIE III
RESULTAT ET
DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Extraction de flavonoïdes

La plante *Matricaria pubescens* ont été soumise à une macération dans un mélange hydro-alcoolique chaud; après évaporation de l'alcool, une extraction liquide- liquide est faite pour la phase aqueuse avec l'acétate d'éthyle, après l'évaporation à sec, les extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur.

Tableau 1: Représente la couleurs et le rendements des flavonoïdes.

L' extraits	Couleur de l'extrait	Rendement (%)
Acétate d'éthyle	jaune	11

III.1.2. Effet du venin et des flavonoïdes sur les métabolismes des lapins

III.1.2.1. Glycémie

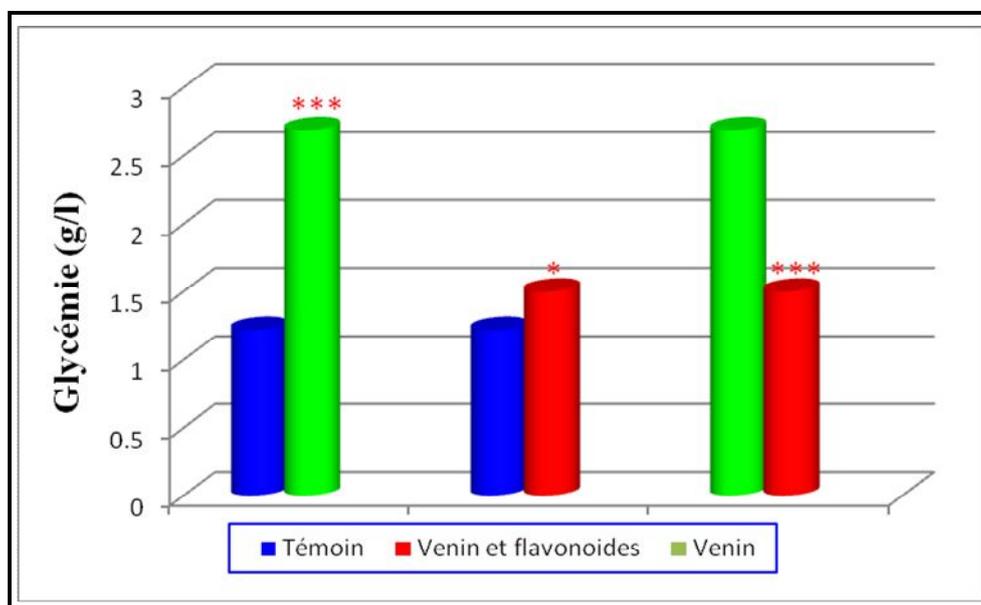


Figure 26 : Effet du venin et des flavonoïdes sur la glycémie.

A partir la figure 28 on remarque qu'il y a augmentation hautement significative ($P < 0.001$) de glycémie, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et une augmentation significative ($P < 0.05$) chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes par apport aux témoin.

Aussi il y a une diminution hautement significative ($P < 0.001$) de glycémie, chez les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes) par rapport aux lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.2. Cholestérol total

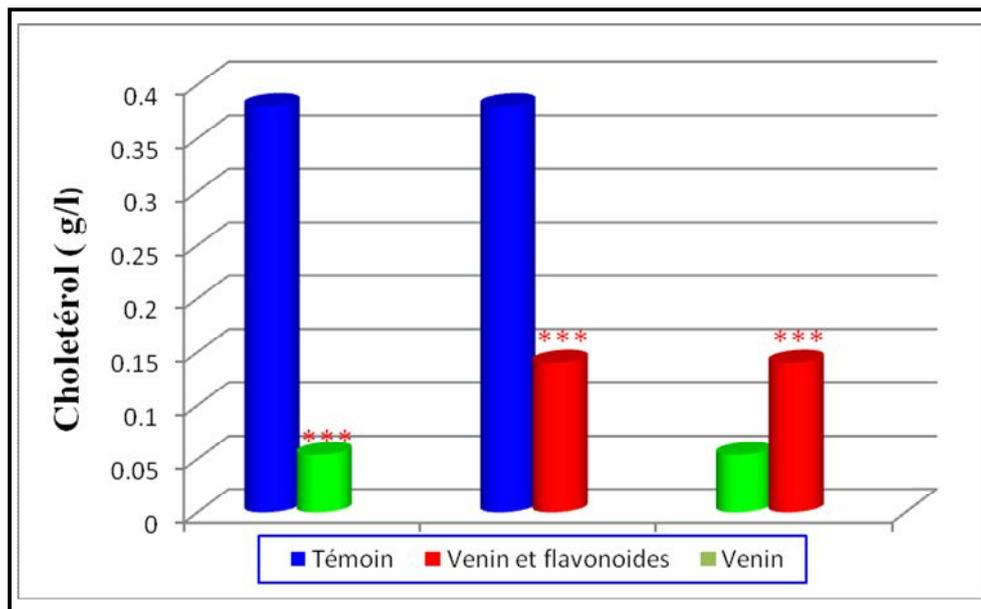


Figure 27 : Effet du venin et des flavonoïdes sur le cholestérol.

On observe qu'il y a une diminution hautement significative ($P < 0.001$) de cholestérol total, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; même observation chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins (fig. 29).

Pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), il y a une augmentation hautement significative ($P < 0.001$) de cholestérol total, par rapport aux lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.3. Triglycéride

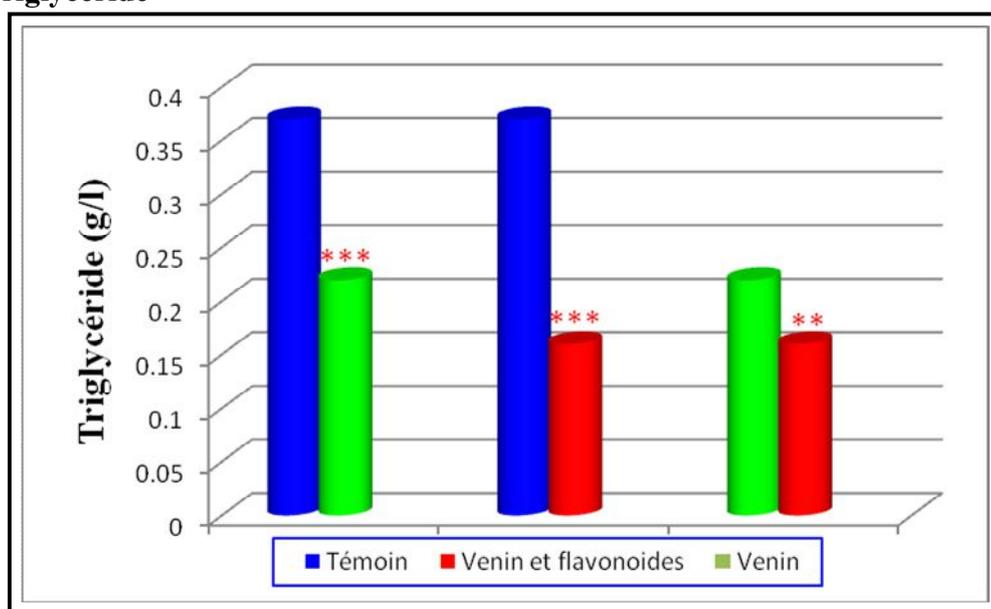


Figure 28: Effet du venin et des flavonoïdes sur la triglycéride.

L'analyse de triglycéride (figure 30) montre qu'il y a une diminution hautement significative ($P < 0.001$), chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et aussi une

diminution hautement significative ($P < 0.001$) chez les lapins qui sont injectés, par le venin et les flavonoïdes par rapport aux témoins.

Aussi montre qu'il n'y a pas de diminution très significative ($P < 0.01$) de triglycéride chez les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), par rapport aux lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.4. Activité de TGP

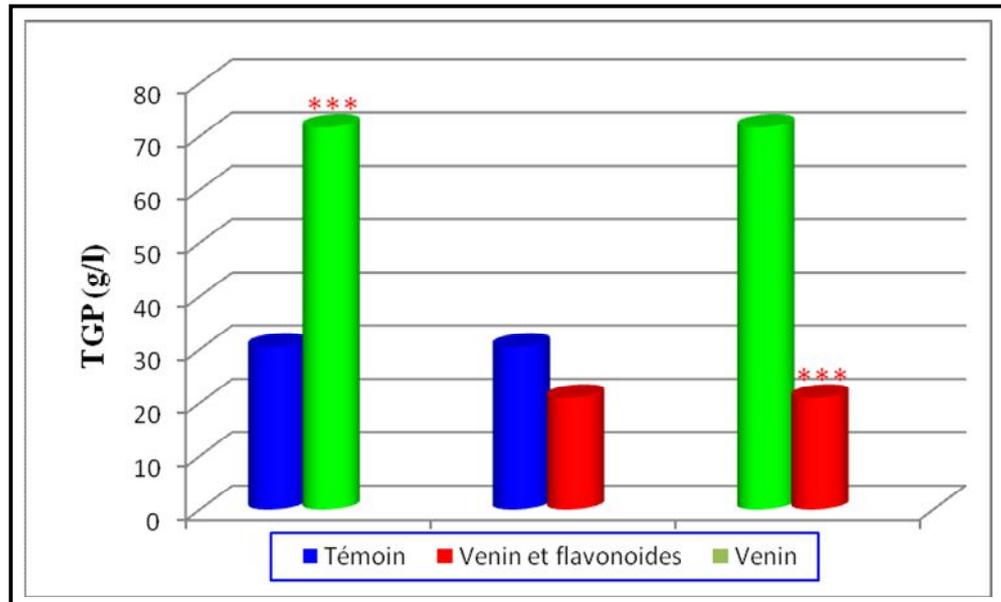


Figure 29: Effet du venin et des flavonoïdes sur l'activité de TGP.

On observe qu'il y a une augmentation hautement significative ($P < 0.001$) de l'activité de TGP, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et il n'y a pas de signification ($P > 0.05$) chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Mais on observe une diminution hautement significative à ($P < 0.001$) de TGP pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), par rapport aux lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.5. Activité de TGO

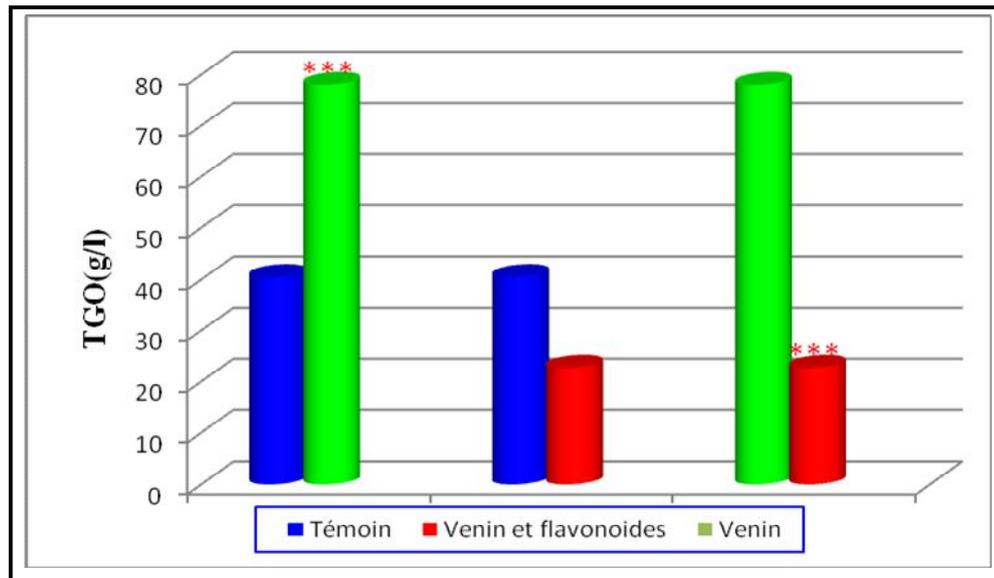


Figure 30: Effet du venin et des flavonoïdes sur l'activité de TGO.

On observe qu'il y a une augmentation hautement significative ($P < 0.001$) de l'activité de TGO, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport les témoins; et il n'y a pas de signification ($P > 0.05$) de TGO chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins (fig. 32).

Mais il y a une diminution hautement significative ($P < 0.001$) de l'activité de TGO, pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), par rapport les lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.6. Urée

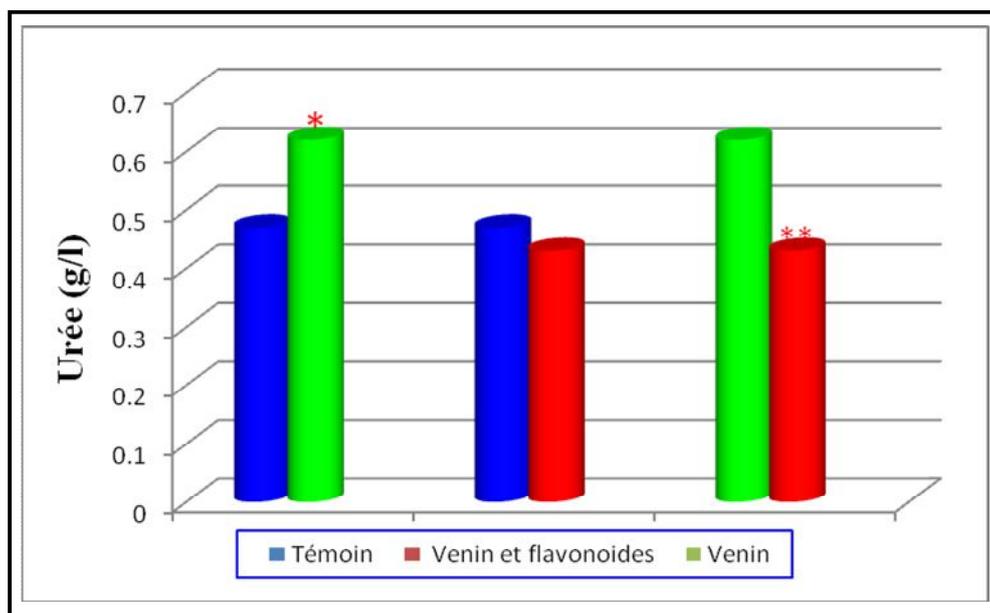


Figure 31: Effet du venin et des flavonoïdes sur l'urée.

Il y a une augmentation significative ($P < 0.05$) d'urée, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et pas de signification ($P > 0.05$) d'urée chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Aussi il y a une diminution très significative ($P < 0.01$) pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), par rapport les lapins qui sont injectés par le venin (fig. 33).

III.1.2.7. Créatinine

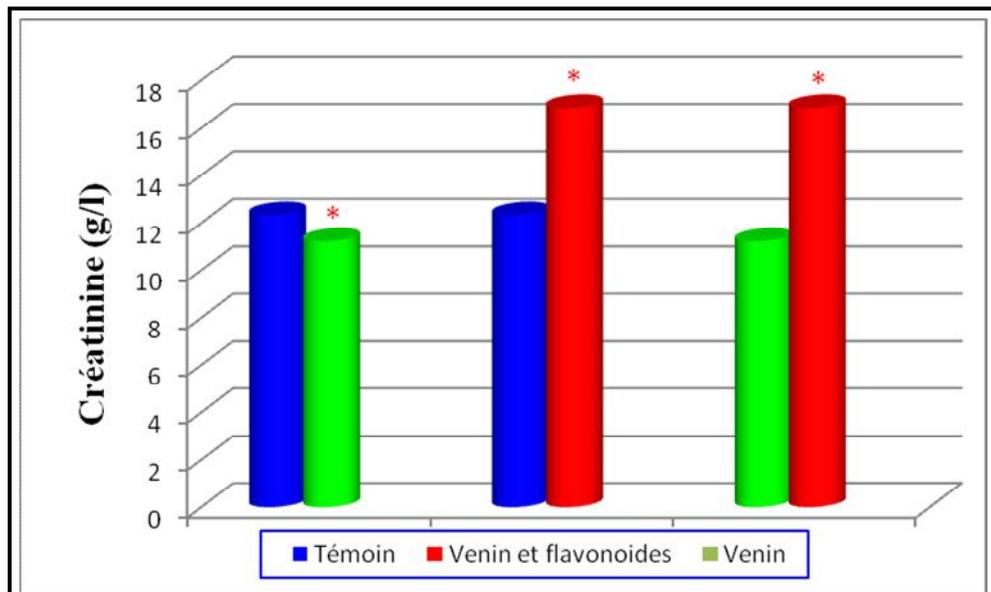


Figure 32: Effet du venin et des flavonoïdes sur la créatinine.

D'après le résultat il y a une diminution significative ($P < 0.05$) de créatinine, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et une augmentation significative ($P < 0.05$) chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Le résultat montre aussi une augmentation significative ($P < 0.05$) de créatinine pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), par rapport les lapins qui sont injectés par le venin (fig. 34).

III.1.2.8. Fibrinogène

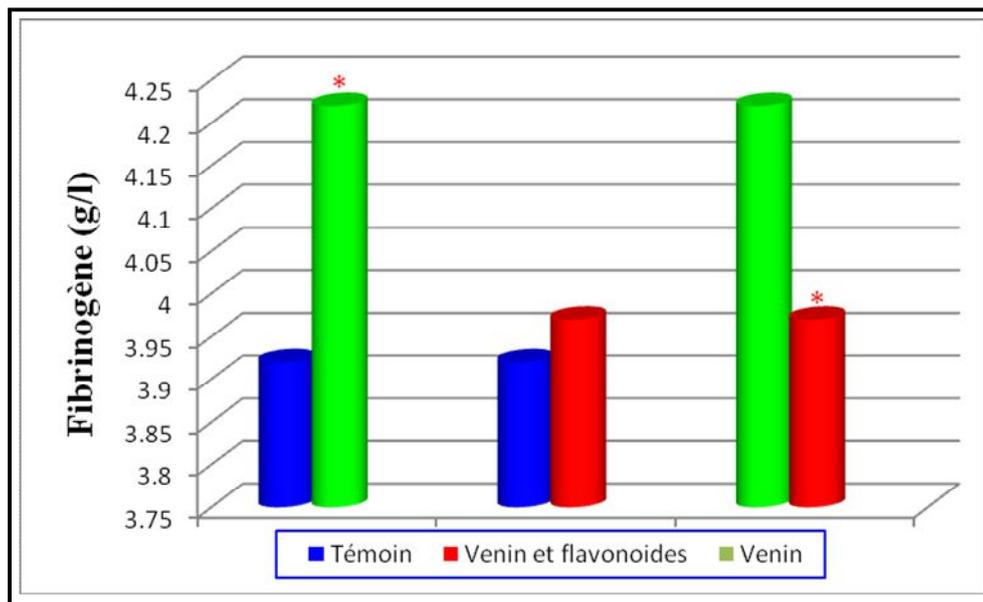


Figure 33: Effet du venin et des flavonoïde sur la fibrinogène.

Le résultat montre une augmentation significative ($P < 0.05$) de la fibrinogène, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et montre qu'il n'y a pas de signification chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Mais une diminution significative ($P < 0.05$) d'urée pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes) par rapport les lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.2.9. Temps de Céphaline -Kaolin (TCK)

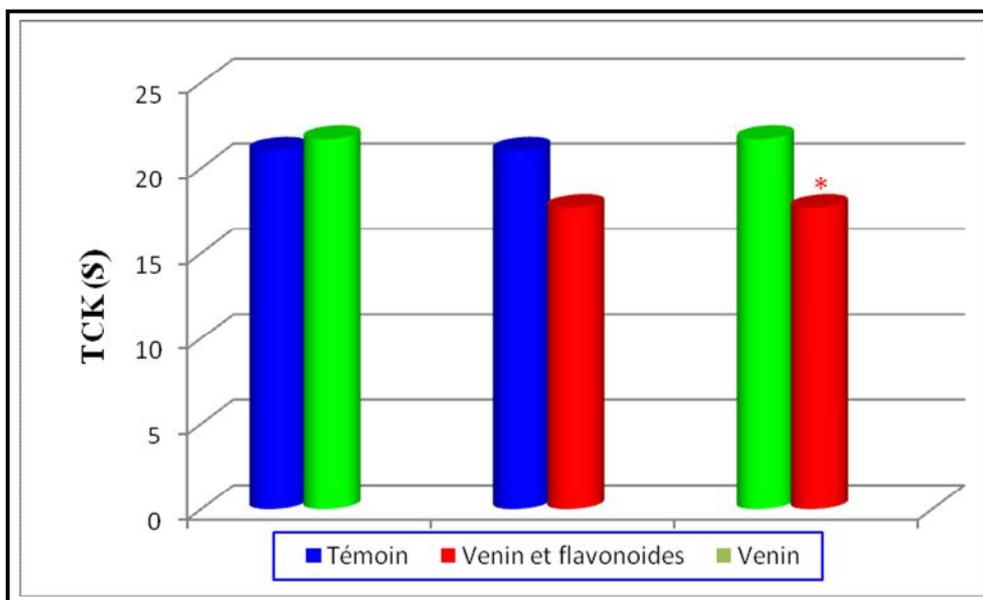


Figure 34: Effet du venin et des flavonoïde sur le temps de Céphaline – Kaolin.

Il n'y a pas de signification ($P > 0.05$) dans le Temps de Céphaline – Kaolin, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et aussi pas de signification de TCK chez les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Mais pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), il y a une diminution significative ($P < 0.05$) dans le Temps de Céphaline – Kaolin, par rapport les lapins qui sont injectés par le venin (fig. 36).

III.1.2.10. Taux de prothrombine (TP)

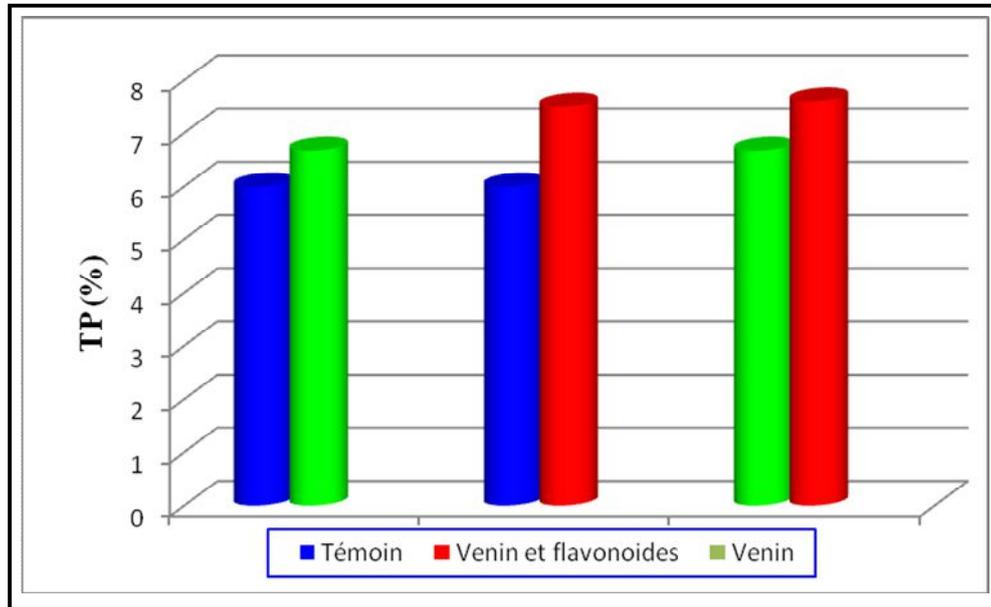


Figure 35: Effet du venin et des flavonoïde sur le taux de prothrombine (TP).

Le résultat dans la figure 37 montre qu'il n'y a pas de signification ($P > 0.05$) pour le taux de prothrombine, chez les lapins qui sont injectés par le venin par rapport aux témoins; et pour les lapins qui sont injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux témoins.

Même aussi pour les lapins qui sont injectés par le venin et l'extrait de la plante (flavonoïdes), pas de signification de TP par rapport aux lapins qui sont injectés par le venin.

III.1.3. Résultat des coupes histologiques

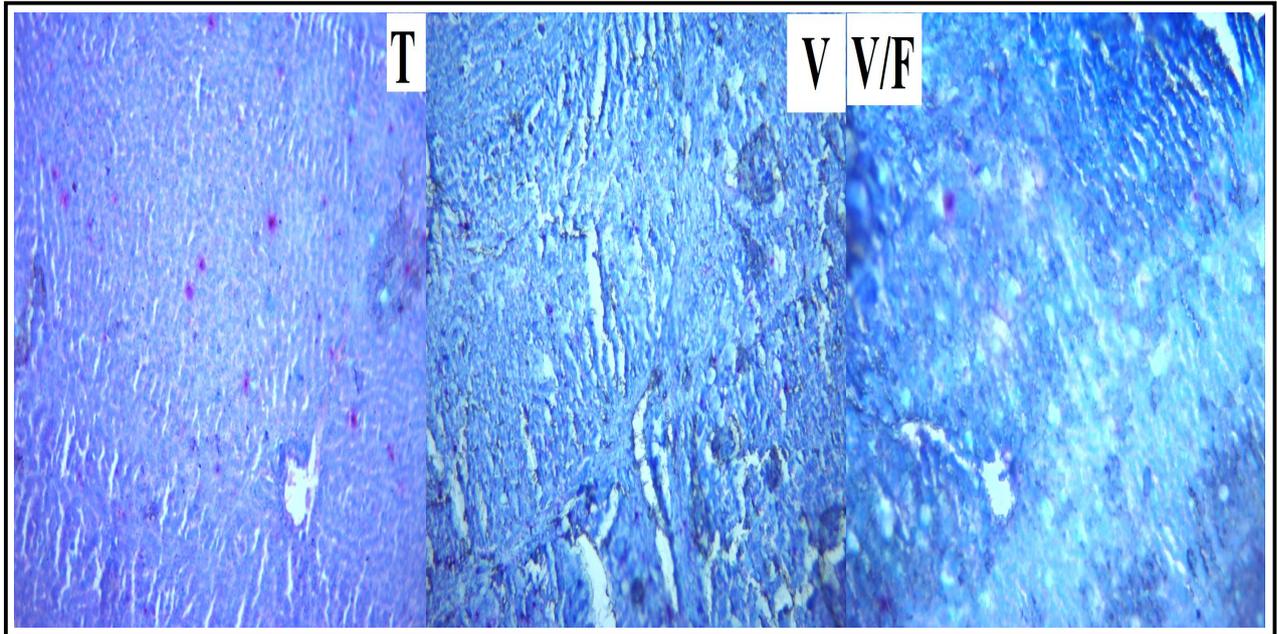


Figure 36: Coupe histologique dans le foie (T: Témoin V: Injecter par le venin V/F: Injecter par le venin et flavonoïdes).

A partir l'observation des coupes histologique du foie de lapin témoin T permis de constater une structure normal, mais chez le foie du lapin qui injecte par le venin nous observons une modification dégénérative, des lésion tissulaire, et des dilatations sinusoïde . pour le coupe histologique du lapin qui est traité par l'extrait de la *Matricaria pubscens* on observe une lésion cellulaire.

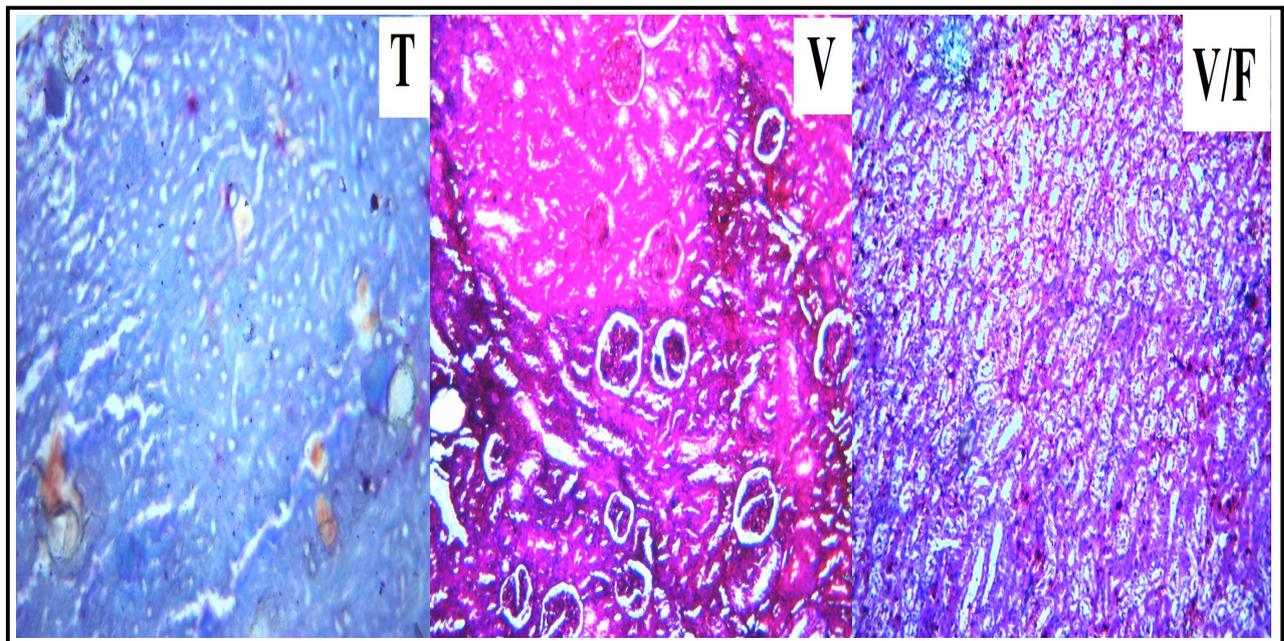


Figure 37: Coupe histologique dans les reins (T: Témoin V: Injecter par le venin V/F: Injecter par le venin et flavonoïdes).

L'observation de coupe histologique du rein du lapin témoin montre une structure normale, par contre le coupe histologique du rein de lapin qui est injecté par le venin, montre une nécrose et une dilatations glomérulaire; pour le coupe histologique du rein de lapin qui est traité par l'extrait de la plante, nous observons un cytolysse des cellulaire.

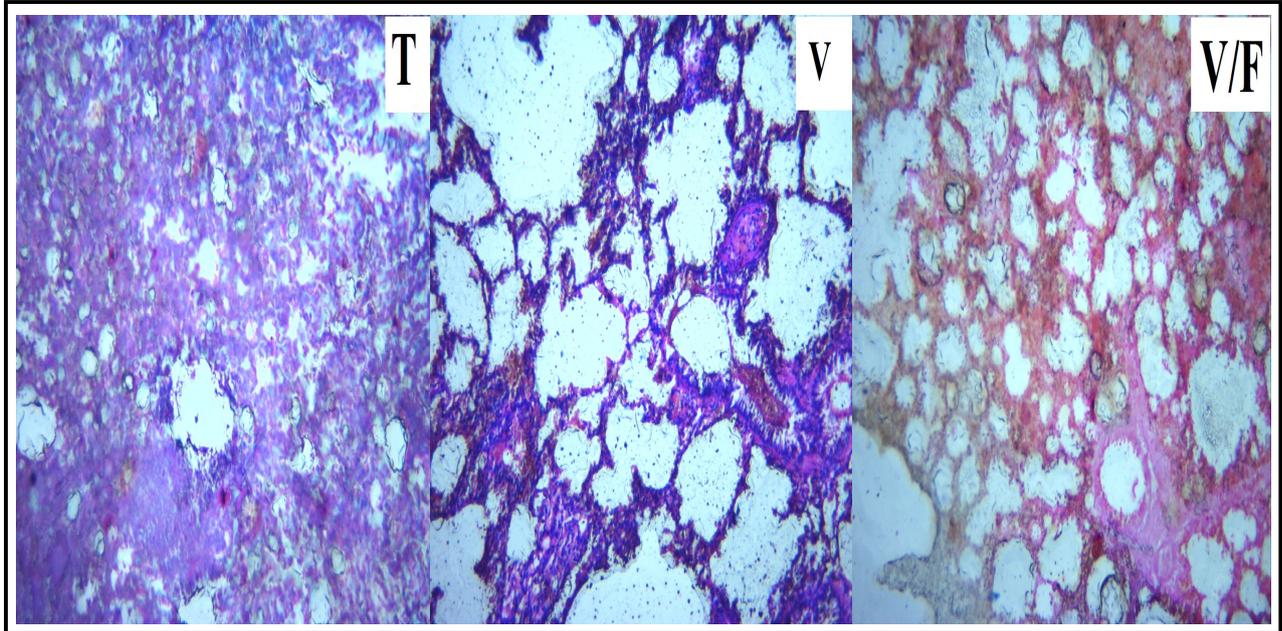


Figure 38: Coupe histologique dans les poumons (**T:** Témoin **V:** Injecter par le venin **V/F:** Injecter par le venin et flavonoïdes).

Le coupe histologique du poumon de lapin témoin montre une structure normale, mais l'observation du coupe histologique du poumon de lapin qui est injecté par le venin présente un grandissement des alvéoles du poumon, par contre les alvéoles du poumon de lapin qui est traité par les flavonoïdes sont contractés.

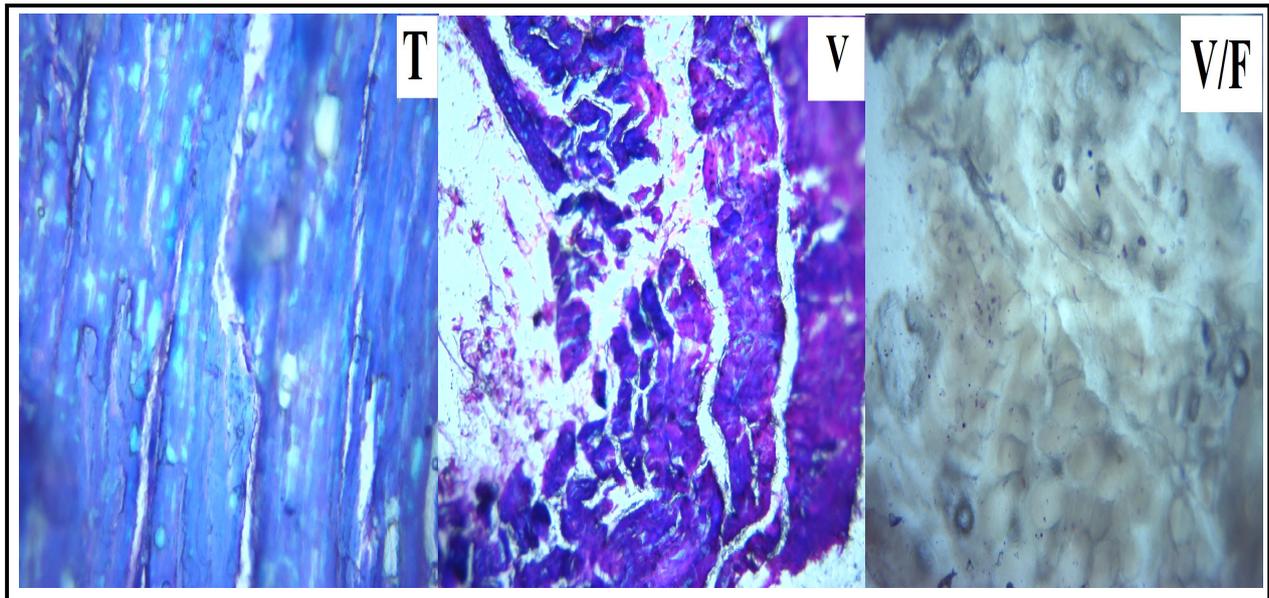


Figure 39: Coupe histologique dans les muscles (T: Témoin V: Injecter par le venin V/F: Injecter par le venin et flavonoïdes).

A partir l'observation de coupe histologique de muscle du lapin témoin, montre un architecteur normale c'est-à-dire la présence des noyaux et des fibres musculaire. Pour le muscle du lapin qui est injecté par le venin, nous avons observés la présence des fibres dissociées; aussi pour le muscle du lapin qui est traité par les flavonoïdes on observe une destruction au niveau les fibres du muscle.

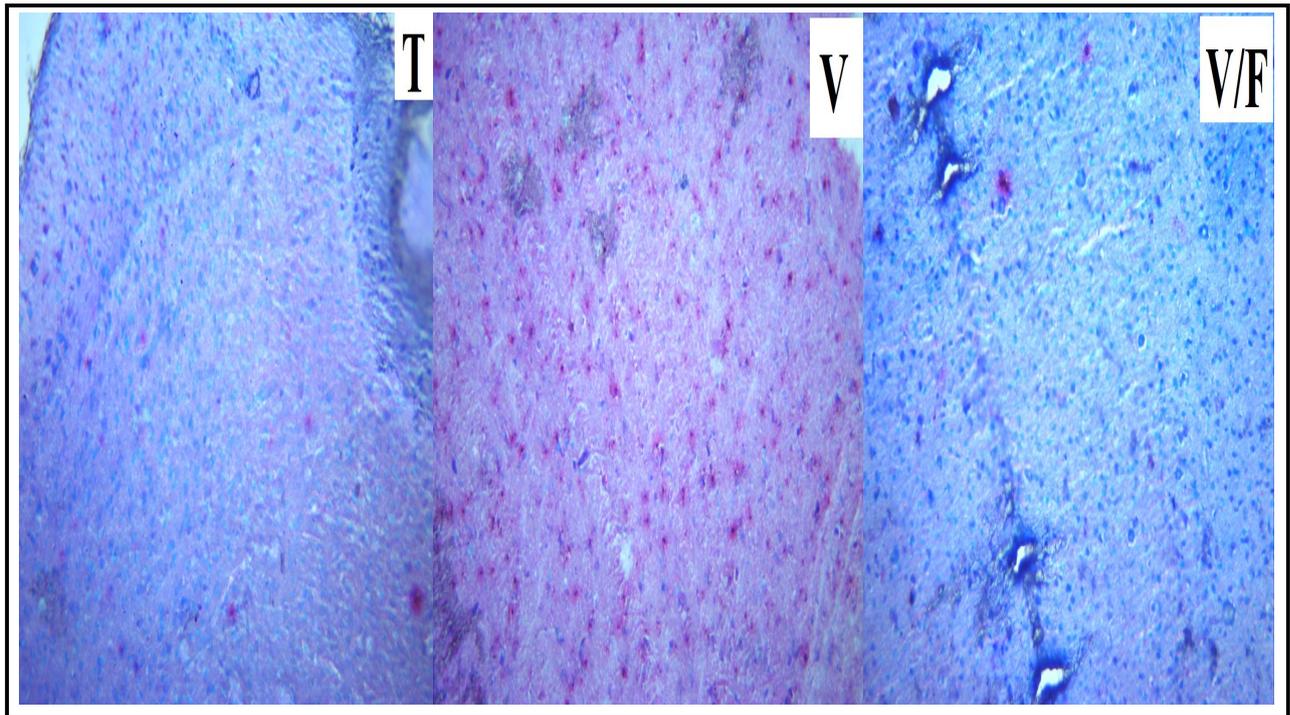


Figure 40: Coupe histologique dans le cerveau (T: Témoin V: Injecter par le venin V/F: Injecter par le venin et flavonoïdes).

L'observation de coupe histologique du cerveau du lapin témoin, montre une structure normal par la conservation de l'architecteur cellulaire, et des vaisseaux normaux ; mais la coupe histologique du cerveau du lapin qui est injecté par le venin présente des halo- clair prévasculaire autour les vaisseaux. Pour le cerveau du lapin qui est traité par les flavonoïdes, nous avons observons l'absence des halo- clair.

III.2. Discussion

Le but de notre étude est de montrer les effets du venin sur les perturbations biologiques observées lors des envenimations vipérines, les signes cliniques et biologiques de la gravité des morsures, et aussi pour montrer les propriétés médicinales de la *Matricaria pubescens* sur l'envenimation. Pour cela nous avons fait l'extraction des flavonoïdes de la plante (*Matricaria pubescens*) à partir du méthanol, nous avons trouvé que le rendement des flavonoïdes est 11%, ce résultat présente une quantité moyenne des flavonoïdes dans *Matricaria pubescens* (Djellouli et al., 2013).

Pour montrer l'effet du venin de *Cerastes cerastes* sur l'organisme, on a injecté le venin dans les lapins et nous avons fait des analyses sur quelques paramètres biochimiques.

Après l'égorgeage des lapins, on observe que le sang était coagulé parce que le venin agit sur les facteurs de coagulation et sur les plaquettes. Les venins des vipères *Cerastes cerastes* sont riches en protéines de type thrombine (protéases à sérine). Ces protéines agissent sur la cascade de la coagulation sanguine et sur le fonctionnement plaquettaire (Marrakchi et al., 1998).

Le réseau de fibrine s'organise sous l'action d'une enzyme, la thrombine, son activation qui déclenche la cascade de réactions enzymatiques permettant la coagulation du sang (Marrakchi et al., 1998).

L'adhésion des plaquettes, ou thrombocytes, entre elles et à l'endothélium vasculaire est provoquée par une lésion de ce dernier. Une fois agrégées, les plaquettes libèrent leurs granules qui contiennent des facteurs vasoconstricteurs et des agents renforçant l'adhésion cellulaire donc l'agrégation plaquettaire (Kassogue, 2006).

Dans notre étude, il y a une hyperglycémie chez tous les lapins injectés par le venin par rapport aux lapins témoins, le venin de *Cerastes cerastes* détériore les métabolismes de pancréas et du foie, ce changement est accompagné par des variations de concentration de l'insuline et du glucagon plasmatiques. Selon Al Jammaz (2002), le venin du serpent provoque l'hyperglycémie chez les animaux expérimentaux. Cette augmentation peut être due à :

L'effet du venin sur les hormones glycémiantes, soit par modification structurelle des hormones (inactives) (Jaen, 2001); soit par l'influence sur les cellules pancréatiques responsables de la sécrétion des hormones, le venin attaque les cellules β et α du pancréas. Donc le venin provoque des problèmes métaboliques. Aussi le venin attaque les récepteurs de l'insuline Gut2 et Gut4 qui permettent de l'entrée de glucose dans les tissus musculaires et hépatiques, par la fixation sur les récepteurs, ou par la dégradation.

Dans notre travail, nous constatons que la concentration des lipides (cholestérol et triglycéride) est diminuée chez les lapins injectés par le venin par rapport aux lapins témoins. Donc le venin influe sur des métabolismes des lipides. Ces résultats peuvent être dus au:

En cas d'insuffisance pancréatique causée par l'effet du venin, l'absorption intestinale est très diminuée, les cellules intestinales empêchent l'assemblage des chylomicrons ou leur excrétion, dans ce cas, l'intestin grêle est chargé de lipides qu'il ne peut excréter dans l'organisme.

Dans le foie, le venin provoque l'insuffisance hépatocellulaire entraînant donc une baisse importante du cholestérol. L'hypocholestérolémie est aggravée par la synthèse des hormones dérivées, peu diminuées malgré la malabsorption, et par l'utilisation de l'acétyl CoA à la synthèse d'autres substrats. La baisse du cholestérol est-elle cause un risque direct pourrait être lié à une baisse des défenses immunitaires. L'hypotriglycémie se manifeste par des troubles neurologiques, et une malabsorption digestive des lipides.

Les résultats de notre étude montrent que le hypocréatininémie et l'augmentation de l'urée dans le sang chez les lapins injectés par le venin par rapport aux témoins; le venin du *Cerastes cerastes* attaque la fonction des reins. L'atteinte rénale la plus fréquente est l'insuffisance rénale fonctionnelle, se manifestant par une oligo-anurie transitoire avec augmentation de l'urée et de la créatinine sanguine (**Harris et al., 1976**). Le venin peut avoir une toxicité directe sur la membrane basale glomérulaire (**Sipriya et al., 1980**).

Les résultats obtenus dans notre travail montrent, qu'il n'y a pas de signification aux niveaux des paramètres de coagulation (TCK, TP) sur les lapins injectés par le venin par rapport aux témoins; mais il y a une augmentation significative de fibrinogène, chez les lapins injectés par le venin par rapport aux témoins. La cérastocytine du *Cerastes cerastes* se lie en présence de fibrinogène, sur un site distinct de celui reconnu par la thrombine. Les L-amino-acido-oxydases provoquent la désamination, puis l'oxydation des acides aminés en acides α -cétoniques avec production d'ammonium et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhibe la liaison entre le récepteur GPIIb/IIIa et le fibrinogène (**Zingali et al., 1991**). Cette opération augmente le fibrinogène dans le sang.

Pour le TGO et TGP, on observe qu'il y a une augmentation hautement significative de l'activité de TGO et TGP, chez les lapins injectés par le venin par rapport aux témoins, on peut expliquer ces résultats, que le venin peut agir sur les cellules hépatiques et les cellules rénales par des éclatements (dégradation) de la membrane cellulaire ce qui provoque la sécrétion de la quantité des enzymes TGO et TGP augmente dans le sang.

Pour les coupes histologiques des poumons, cœur et cerveau, les venins du serpent *Cerastes cerastes* contiennent des cytotoxines. La principale propriété des cytotoxines est de provoquer la lyse

des membranes cellulaires. L'hypothèse actuelle est la formation du complexe entre les cytotoxines et certains phospholipides. La présence du complexe dans la couche superficielle de la membrane cellulaire induit une fragilisation de la membrane par le mécanisme encore inconnu. Toutefois, l'augmentation de volume de la cellule qui se gorge d'eau semble liée à une perturbation des échanges ioniques de part et d'autre de la membrane, ce qui permet de supposer que les cytotoxines agissent au niveau des canaux ioniques, sodium notamment. Les cytotoxines dépolarisent la membrane cytoplasmique (**Kassogue, 2006**).

Dans notre étude les troubles de la fonction rénale à type d'oligo-anurie, nous pensons que cette insuffisance rénale était due à l'action directe du venin. Les lésions rénales sont probablement dues à l'activité enzymatique des protéases et des phospholipases A2 du venin qui agissent au niveau des cellules épithéliales du tubule proximal, conduisant à leur destruction complète (**Christelle, 2006**).

Le coupe histologique de muscle, montre des fibres dissociées puisque le venin de serpent *Cerastes cerastes* est responsable d'une nécrose musculaire due à la fonction phospholipase des neurotoxines-b et les protéases provoquent une destruction des fibres musculaires striées (**Naciri, 2012**).

Après l'injection du venin et l'extrait de la plante de *Matricaria pubescens* chez les lapins, pour voir les propriétés médicinales des flavonoïdes nous avons fait un bilan biologique des quelques paramètres.

L'analyse de la glycémie montre qu'il y a une diminution dans le taux de glucose dans le sang des lapins injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux lapins injectés par le venin; puisque l'activité des flavonoïdes agit en effet en améliorant la sensibilité des cellules de l'organisme à l'insuline (**Ndomou et al., 2014**), donc a un effet positif sur l'insulinosécrétion des cellules β (**Kebièche et al., 2011**); mais cette propriété n'est pas très efficace à la présence du venin car ce que la glycémie reste augmentée par rapport à la glycémie des témoins. Aussi dans ce résultat qu'on a obtenu, présente une diminution au niveau des triglycérides et de cholestérol total chez les lapins injectés par le venin et flavonoïdes, par rapport aux lapins injectés par le venin et aux témoins. Cette diminution est due à l'activité antioxydante des flavonoïdes, puisqu'ils inhibent l'oxydation de LDL et limitent les lipides sanguins en général (**Boubekri, 2014**), même l'amélioration de l'insulinosécrétion à partir des flavonoïdes restaure le stock en triglycérides (**Zidi, 2010**).

Nous avons trouvé une diminution au niveau des enzymes TGP et TGO pour les lapins qui sont traités par l'extrait de la plante, par rapport aux lapins injectés par le venin et aux témoins; dans ce cas on peut dire qu'il y a une lésion des cellules hépatiques et nous avons confirmé à

travers l'étude histologique, l'observation des coupes (figure 38) met en évidence des lésions hépatiques, donc on peut dire que l'extrait de la plante (les flavonoïdes), pas un efficacité contre les toxines qui sont des composés du venin de *Cerastes cerastes* qu'ils induit la lyse.

On observe une diminution hautement significative dans l'urée des lapins injecter par le venin et l'extrait de la plante, par apport les lapins injecter par le venin. En revanche, on remarque une augmentation significative dans la créatinine des lapins injecter par le venin et les flavonoïdes, par apport les lapins injecter par le venin. Ces deux paramètres sont des marqueurs significatifs de la fonction rénale, et l'élévation de la concentration de ces deux paramètres est à relier au dysfonctionnement rénal (**Zidi, 2010**), résulte à lésion des cellules rénal et le coupe histologique présente une détériorations au niveau les cellules rénale (figure 39), qui sont fait a partir les composés enzymatiques et toxiques du venin.

Pour les facteurs du coagulation, notre résultat montre qu'il y a une augmentation au niveau du TP, et de fibrinogène chez les lapins injecter par le venin et flavonoïdes par apport les lapins injecter par le venin. Cette résultat n'indique pas l'effet des flavonoïdes sur les facteurs du coagulation, a partir **Munad (2010)**, qui dit les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Mais on trouve une diminution significative au niveau du TCK chez les lapins injecter par le venin et l'extrait de la plante par apport les lapins injecter par le venin, donc cet extraits n'exercent pas une activité anticoagulante importante pour les deux voies de coagulation (**Tlili, 2015**).

Conclusion

L'envenimation ophidienne est un sérieux problème de santé dans le monde entier. Les espèces qu'on trouve le plus en Algérie sont: *Cerastes vipera* et *Cerastes cerastes*.

Les morsures de ces dernières sont très graves voire même mortelles, elles entraînent des hémorragies, des oedèmes et des myonécrose. La toxicité du venin des vipéridés est difficile à corrélér avec les diverses activités enzymatiques de leurs composés.

L'envenimation est l'ensemble des manifestations locales et générales, induites par l'absorption d'une substance venimeuse dans l'organisme. Nos ancêtres ont utilisé des plantes spontanées comme des traitements contre les envenimations, parmi ces plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle saharienne, la *Matricaria pubescens*, qui est une plante spontanée qui pousse dans la région d' El-oued.

L'extraction du venin de *Cerastes cerastes* et les flavonoïdes de *Matricaria pubescens*, qu'on injecte aux les lapins. Après avoir égorger les lapins, nous passons aux analyses biochimiques et nous avons fait des coupes histologiques des quelques organes. Nous avons obtenu les résultats suivant:

Hyperglycémie, augmentation de TGP, TGO, l'hypocholestérolémie, l'hypotriglycéridémie, et hypocréatinine, hyprefibrinogénémie, mais il y a pas de variation au niveau de TP, et TCK. et une distribution au niveau tissulaire , le foie, les poumons, le cerveau, les reins et les muscles.

D'après notre étude, on peut dire que les flavonoïdes de *Matricaria pubescens* ont un effet positif contre l'effet du venin sur les paramètres des métabolismes biologiques (l'heperglycémie, l'hypocholestérolimie). Mais ces flavonoïdes n'ont pas un effet sur la coagulation sanguine, qui se fait à cause de l'envenimation.

L'extraction du venin des serpents a posé un grand problème pour les membres du groupe.

Dans le futur, faire une autre étude pour préciser l'origine de ces effets au niveau cellulaire et moléculaire, aussi pour déterminer le type de flavonoïde le plus efficace contre l'effet du venin.



REFERANCES
BIOBLOGRAHPIQUES

- Abana, L., Mahmoudi, B., Mehellou, M T. (2014).** *Matricaria pubescens* L et son huile essentielle : Contrôle botanique, physicochimique, chromatographique (CPG-SM). Thèse de doctorat en Pharmacie, Université El-Hadj Lakhdar, Batna. p 4
- Al Jammaz., Ibrahim A. (2002).** Envenimation by céastes vipera crud venom on plasma and tissuef métabolite of rats, Thèse de doctorat, Université Riyadh .9p.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203: p 27-36.
- Benhouhou, S. (2010).** *Aaronsonia pubescens* (Dasf.) K. Bremer& Humphries. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. P 7-8
- Bentabet, O. (2008).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de *santolina chamaecyparissus* L. Mémoire de magister. Universite Mentouri, Costantine. P 29
- Blomback, B., Blomback, M., Hessel, B., Iwanaga, S. (1967).** Structure of N-termina fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. 215p.
- Bon, C. (1991).** Venins de serpents et serums antivenimeux . *Bull. Soc. Herp .Paris.* p 72
- Boquet, P. (1966).** Immunité anti venimeuse. *Toxicon.* p 4.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A*, pp772–780.
- Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat en sciences, Université Mohamed Khider, Biskra.
- Boutaoui, N. (2012).** Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae) Etude de la phase acétate d'éthyl. Mémoire de magister, Universite Constantine I. p 21
- Bruneton, J. (1999),** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales, p. 647-673.
- Chafi, F., Fekhaoui, M., Mataam, A., Rhalem, N., Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R. (2011).** Toxicologie Maroc. Ed. Rés. Alia, 9p .
- Chippaux, J.P. (1999).** Les serpents d'Afrique occidentale et centrale. Ed: IRD. Paris. 280 p.
- Chippaux, J.P. (2006).** Les serpents d'Afrique occidental et contral, Ed: IRD213, Paris. 329 p.
- Chippaux, J.P., (2002).** Venins de serpents et envenimations. Paris. IRD. Coll. Didactiques. Paris. 288 p.

- Chippaux, J-P. (2006).** Envenimations et intoxications par les animaux venimeux ou vénéneux. Venin Trop. Médecine Tropicale. La Paz, Bolivie. pp 423-428
- Chippaux, J-P., Goyffon, M. (2006).** Envenimation et intoxication par les animaux venimeux ou vénéneux. Paris, France . 220 p.
- Chippaux, JP., Goyffon, M. (2016).** Venin. Encyclopédie Universel.
- Chippaux, J-P., Goyffon, M., (2006).** Envenimation et intoxication par les animaux venimeux ou vénéneux. Paris, France . 220 p.
- Choumet, V., Goyffon, M. (2003).** Les morsures de vipères. Concours Med. 125 p.
- Christelle, R. (2006).** L'action des venins ophidiens sur l'hémostase. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré- Nancy 1. 174p.
- Clemetson, J.M., Clemetson, K J. (2005).** Snake venoms and hemostasis. US National library of Medicine. National Institutes of Health. Journal Thromb Haemost. hémorragiques. Bull Soc Pathol Exot. 132 p
- Collin, S., Grouzet, J. (2011).** Polyphénols et procédés. Ed. Lavoisier. France.
- Detrait, J. (1989).** Composition chimique de venin immunologie .SHd, editor. Lyon .Ed Fondation Marcel Mérieux . France. 77-78 P.
- Djellouli, M., Moussaoui, A., Benmehdi, H., Ziane, L., Belabbes, A., Badraoui, M., Slimani, N., Hamidi, N. (2013).** Ethnopharmacological Study and Phytochemical Screening Of Three Plants (Asteraceae Family) From The Region Of South West Algeria. Asian Journal Of Natural et Applied Sciences. Vol. 2. N° 2. Japan. pp 59-65.
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. et Tuñón, M. J. (2007).** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. Nutricion hospitalaria. pp 287-293.
- Goyffon, F., Heurtaut J. (1994).** La fonction venimeuse-Ed. Masson, Vol. 284.
- Hadjam, A., Hassen, Z. (2008).** Effet de la variation du débit de dose d'irradiation gamma sur l'activité myotoxique du venin de *Cerastes cerastes*. Mémoire de licence en U.S.T.H.B. 29 p.
- Harris, A.C., Hurst, P.E., Saher, M.B. (1976).** Renal failure after snakebite. Méd. J. Aust. 411 p.
- Henrotin, Y., Deby-Dupant, G., Reginster, J Y. (2001).** Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. Med liege (56). pp 433-442
- Ikram, J. (2009).** La phospholipase A₂ Sécrétée de groupe X : Maturation protéolytique et rôles fonctionnels. Thèse de doctorat, Université de Sophia-Antipolis, Nice. 115p.

- Jean, M., Bruno, V. (2001).** Effets hypoglycémisants et antidiabétique des nifedipines. revues: Médecine thérapeutique .vol.7. Journal: John Libbey Eurotext.
- Jose, M. P., Amya, A., Carmen, C., Jose, B. (2002).** Aphasia in a farmer following viper bite. The Lancet. 359 p.
- Kassogue A., (2006).** Complication Renales Desenvenimation Par Morsure Deserpent au Suc Hgtde Janvier à Décembre 2004. Thèse de doctorat en médecine, Université de Bamko, Mali, 82 p .
- Kassogue, A. (2006).** Complication Renales Desenvenimation Par Morsure Deserpent au Suc Hgtde Janvier à Décembre 2004. Thèse de Médecine. Université de Bamko. 82p.
- Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R. (2011),** Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. Pharmacognosie Phytothérapie, Vol .9, pp 274-282.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. et Kang S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. Journal of Pharmacological Sciences., 96 (3) : pp 229-245.
- Labib, R.S., Awad, E.R., Faragm N.W. (1981).** Proteases of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) and *Cerastes vipera* (sahara sand viper) snake venoms .Toxicon.Vol 19. pp73-83.
- Lakhdar, A. (2001).** Etude de la fonction venimeuse chez les serpents de autochtones et exotiques en France métropolitaine. these de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier, Toulouse. 56p .
- Laraba, B., Chelghom, H., Cherifi, F., Sebia-Amrane, F., Bennacef-Chaou, N., Boukhalfa-Abib, Sac, A., Oussedik-Oumehdi, H. (2009).** Envenimation vipérine et réponse inflammatoires: Effet de traitement anti-inflammatoire sur l'activité dermonécrotique et oedématisante des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. Université d'Alger Boumadienne, Alger. 57p.
- Laraba, D., Marchot P., Euclaire, M.F. (1992).** A fibrinogen-clotting serine from *cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis* hector: caractérisation biochimique et pharmacologique. These de doctorat U.S.T.H.B, Alger. 60p.
- Lenoir, L. (2011).** Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de doctorat. Université d'Auvergne. France. 56p.

- Madi, A. (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister, Université Mentouri, Constantine.
- Mahdjar, S. (2013).** Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante. Mémoire de master academique, Universite kasdi merbah, Ouargla. 102 p.
- Makhloufi, A. (2010).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat d'état en biologie, Universite Aboubaker Belkaid.80 p.
- Makhloufi, A., Moussaoui, A., Lazouni, H.A. (2012).** Antibacterial activities of essential oil and crude extracts from *Matricaria pubescens* (Desf.) growing wild in Bechar, South west of Algeria. Medicinal Plants Research. Vol. 6, pp 3124-3128
- Manallah, A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas.112p.
- Mansouri, Ch., Ben amara, M., Zerrouk S. (2013).** Herpeto-terario (serum antivenimeux et immunotherapie). Mémoire de licence, Université El-Oued. 55p.
- Marrakchi, M., El Ayeb, M. (1998).** Les thrombine-like, serine-proteases presents dans les venins du genre *cerastes* (*cerastes cerastes* et *cerastes vipera*).Ed .Archs. Inst. Pasteur Tunis. Pp1-8.
- Marsh, N., Williams, V. (2000).** Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Toxicon. 117 p.
- Mermod, C. (1970).** Domaine vital et déplacements chez Cérastes vipera (L) et Cérastes cérastes (L), Reptila, Viperidae. Journale. Revue Suisse de zoologie. 557 p.
- Metrouh, H A., Catarina, M.M., Duarte, F M. (2015).** Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, andantibacterial activities of *Matricaria pubescens*. Industrial Crops and Products. pp249-256.
- Mion, G., Larréché, S., Goyffon, M. (2010).** Envenimations par vipéridés R syndrome vipérin. Paris.Urgence Pratique Publications. 89 p.
- Mion, G., Olive, F., Hernandez, E., Martin, Y N., Vieillefosse, A S., Goyffon, M. (2002).** Action des venins sur la coagulation sanguine: diagnostic des syndromes hémorragiques. Bull Soc Pathol Exot. 132p .

- Muanda, F N. (2010).** Identification de polyphenols, evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz. 77 p.
- Nacri, F. (2012).** Les morsures de serpents : aspects epidemiologiques, cliniques, et prise en charge. Thèse de doctorat en médecine, Université Mohammed V, Maroc. 129p.
- Ndomou, M., Kammege Djidjou, P., Ntah Ayong, M., Gouado, I., Tchiegang, C. (2014).** Evaluation de l'activite antidiabetique des extraits de feuilles de *Gnetum africanum* et *Gnetum bulchozzianum* (Gnétacées), Sciences, Technologies et Développement, Vol 15, pp 60-65.
- Ouahbi, H. (2013).** Les envenimations vipérine en réanimation. Thèse de doctorat en médecine, Université de Sidi Abdellah. 98p.
- Ould El Hadj, M. D., Hadj-mahammed, M., Zabeirou, H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de ouargla (Sahara septentrional Est). Courrier du Savoir. N°03. pp47-51.
- Pierrette, B N. (2010).** Etude de la faune ophidienne de l'Egypte ancienne, Tome 2 les monographies ophidiennes. Thèse de doctorat, Université Strasbourg 2 . 538p.
- Quinton, L. (2006).** Caractérisation de toxines peptidiques par spectrométrie de masse à haute résolution. These de doctorat. 50p .
- Raaf, L., Boudi, A. (1999).** Caractérisation immunoenzymatique d'une fraction immunodominante du venin de la vipère *Cerastes cerastes* par Dot-ELISA et préparation d'un sérum neutralisant. Mémoire de licence. U.S.T.H.B. 39 p.
- Ringwold, J C. (2001).** Les serpents venimeux. Les amis de l'Aquarium 192p.
- Sarmi, M.P., Cheymer, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. pp2 - 10.
- Sassolas, A., Cartien, R. (1999).** Hypocholestermie: a cause et diagostique. revues: Médecine. Vol 57. Journal: Joho libbey eurotext
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal of Nutrition, pp 2073-2085.
- Sipritya, V., Boonpuchnaving, V. (1980).** Extracapillary proliferative glomerulonephritis in Russel's viper bite. Br. Med. J. 1417p.
- Stocker, K F. (1990).** Medical use of snake venom proteins. CRC Press, Boca Raton.
- Stoebner, P., Cabot, C., Jarry, D., Meunier, L. (2001).** Envenimation neurotoxique par morsure de vipère. La presse médicale. 220p

- Tlili, M L. (2015).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de Magister en Biologie, Université kasdi Merbah, Ouargla. 78p.
- Treki, A. (2002).** Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales *Ranunculus repens* et *Thymus hirtus* sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies. Thèse de magistère, Université de Constantine.
- White, J. (2005).** Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 951 p.
- Zarrou, B. (2012).** Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens* (*Astéracées*) et évaluation de leur activité antioxydante. Mémoire de master académique, Université kasdi Merbah, Ouargla. 103 p.
- Zeghad, N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister, Université Mentouri, Constantine. 456p.
- Zeghouane, H. (2014).** Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien. Mémoire de master. Université Kasdi Merbah, Ouargla. 122 p.
- Zga, N. (2010).** Purification et identification de polyphénols stilbeniques présents dans la vigne. Thèse de doctorat en chimie organique, Université Badji Mokhtar, Annaba. 120 p.
- Zidi, S. (2010).** Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique potentiel d'un extrait aqueux de *Crataegus azarolus* Chez des rats Wistar avec un diabète induit à l'alloxane. Mémoire de magistère, Université Badji-Mokhtar, Annaba. pp 73-74
- Zingali, R B., Bon C. (1991).** Les protéines de venins des serpents agissant sur les plaquettes sanguines. Institut Pasteur Alger. 94p

Web consults

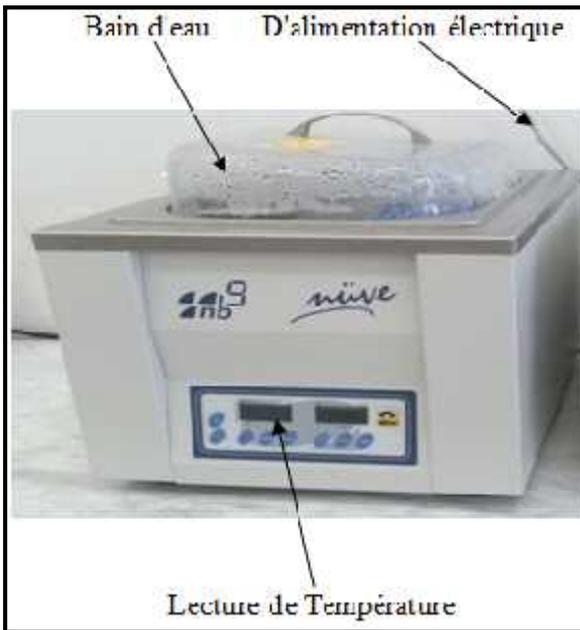
Site web 1: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/venin> 2015

Site web 2: <http://serpent.cheloniphilie.com> 2016



Annexes

Annexes



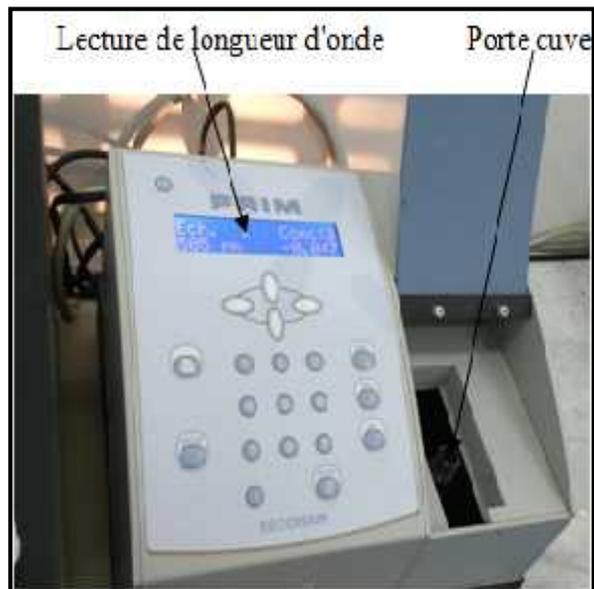
Bain marin



Centrifugeuse



Incubateur



Spectrophotomètre



Rota vape



Microtome



Plaque chauffante



Microscope optique