

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira- Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de

Magister

En Biochimie Appliquée aux substances végétales bioactives

Thème

**«Etude des activités inflammatoire, analgésique,
toxiques et antioxydants des extraits de
Thapsia garganica»**

Par :

M^{elle} BERRI Yasmine

Devant le jury :

Présidente : M^{me} Benabdesselam F. MCA U.A.M.B

Examineurs : M^r Iguerouada M. Pr. U.A.M.B

M^r Belhamel K. Pr. U.A.M.B

Promotrice : M^{me} Bedjou F. MCA U.A.M.B

Invitée : #####M^{elle} Bougoffa K. MAA U.A.M.B

« Année 2011 »

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier Dieu Miséricordieux de m'avoir donné la force d'achever ce travail.

Je tiens à remercier ma promotrice Mme Bedjou Fatiha pour m'avoir guidée, soutenue et encouragée tout au long de mon travail. Que celui-ci lui témoigne l'expression de ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, d'avoir accepté de juger mon travail :

Mme BENABDESSELAM F. pour l'honneur qu'elle me fait d'avoir accepté de présider le jury ;

Mr IGUEROUADA M. et Mr BELHAMEL K, pour l'honneur qu'ils me font d'examiner mon mémoire ;

Melle Bougoffa K, pour son aide, son soutien et de m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury.

Je remercie le directeur de SAIDAL filiale du CRD (Centre de Recherche et du Développement) de m'avoir accueillie au sein de ses laboratoires, comme je remercie l'ensemble de son équipe pour leur aide et leurs conseils.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Lalaoui K, de m'avoir permis d'effectuer mes analyses biochimiques.

Sans oublier les membres du laboratoire de Biologie Moléculaire et tous les enseignants qui ont contribué à notre formation qu'ils retrouvent à travers ce mémoire le fruit de leurs longues années de travail.

Et que ces lignes soient le témoignage de mes sincères reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Yasmine B.

Dédicaces

Je tiens tout d'abord à dédier ce travail, à remercier et à exprimer ma profonde gratitude à mes chers parents qui n'ont jamais cessé de me soutenir et sans qui, je ne serai pas arrivée à mes fins.

Une dédicace particulière à Abid, que je remercie pour son soutien et sa présence.

Mes dédicaces et remerciements sont également adressés :

A mon adorable « grand » frère Yacine ;

A mes frères : Azzedine et Lamine, leurs conjoints et leurs enfants ;

A toute ma famille ;

A ma belle famille ;

A mes amies et amis.

Yasmine B.

Liste des abréviations

- AIF** : Apoptosis-inducing factor
- ALAT** : Alanine Aminotransférase
- ASA** : Acide Acétylsalicylique
- ASAT** : Aspartate Aminotransférase
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BHA** : Butylated hydroxyanisole
- Ca²⁺** : Calcium ionique
- COX** : Cyclo-oxygénase
- DL50** : Dose Létale à 50%
- DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- FGF** : Fibroblast Growth Factor
- HPLC** : High-performance liquid chromatography
- IC50** : Concentration inhibitrice à 50%
- IL-1** : Interleukine 1
- IL-6** : Interleukine 6
- LOX** : Lipo-oxygénase
- nM** : Nanomolaire.
- PDGF** : Platelet Derivated Growth Factor
- PG** : Prostaglandines
- PMCA** : Plasma membrane calcium ATPase
- PSA** : Prostate specific antigen
- SERCA** : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.
- SNC** : Système Nerveux Central
- TGF-β** : Transforming Growth Factor B
- TNF** : Tumor Necrosis Factor
- NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène (forme réduite)

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Structure des phénylpropanoïdes isolés à partir de <i>Thapsia garganica</i>	7
II	Structure du squelette des thapsigargines du genre <i>Thapsia</i>	8
III	Structures des lactones sesquiterpéniques majoritaires de <i>Thapsia garganica</i>	9
IV	Structure de guaianolide isolé à partir de <i>Thapsia garganica</i>	10
V	IC ₅₀ des extraits phénoliques de <i>Thapsia garganica</i> et des standards pour le DPPH	61
VI	Résultats de l'étude de la toxicité aigüe	62
VII	Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943)	64
VIII	Bilan rénal et hépatique des 04 lots mis en place	65
IX	Résultats de l'activité inflammatoire	69
X	Résultats de l'activité antalgique	71

Liste des Figures

Figure 1 : Photographies des différentes parties aériennes de <i>Thapsia garganica</i>	5
Figure 2 : Photographies des parties étudiées de <i>Thapsia garganica</i>	30
Figure 3 : Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux.....	32
Figure 4 : Photo d'administration des extraits par voie orale chez la souris	39
Figure 5 : Photo de la contention manuelle du rat	40
Figure 6 : Photo d'administration des extraits par voie orale chez le rat	40
Figure 7 : Photo du prélèvement oculaire chez le rat.....	41
Figure 8 : Photo d'injection de la carragénine	46
Figure 9 : Photo du découpage de la patte	47
Figure 10 : Photo de souris subissant une crampe	48
Figure 11 : Taux d'humidité des trois parties de <i>Thapsia garganica</i>	50
Figure 12 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux.....	51
Figure 13 : Teneurs en composés phénoliques totaux des trois parties de <i>Thapsia garganica</i>	51
Figure 14 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	53
Figure 15 : Teneurs en flavonoïdes des trois parties de <i>Thapsia garganica</i>	53
Figure 16 : Teneur en anthocyanines des trois parties de <i>Thapsia garganica</i>	55
Figure 17 : Courbe d'étalonnage des tannins condensés.	56
Figure 18 : Teneur en tannins condensés des trois parties de <i>Thapsia garganica</i>	56
Figure 19 : Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse.....	57
Figure 20 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques de <i>Thapsia garganica</i>	58
Figure 21 : Activité scavenging du radical DPPH par les antioxydants de synthèse	59
Figure 22 : Activité scavenging du radical DPPH par les extraits méthanoliques	60

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : *Thapsia garganica*

I.1. Généralités sur les apiacées	3
I.2. Caractéristiques des apiacées.....	3
I.3. Le genre <i>Thapsia</i>	3
I.3.1. Classification botanique	4
I.3.2. Description de l'espèce <i>Thapsia garganica</i>	4
I.4. Métabolites secondaires	6
I.4.1. Composés phénoliques.....	6
I.4.2. Composés terpéniques	7
I.5. Propriétés biologiques de <i>Thapsia garganica</i>	10
I.5.1. Introduction.....	10
I.5.2. Cytotoxicité.....	11
I.5.3. Thapsigargine, libération d'histamine, réponse inflammatoire et promoteur tumoral	11
I.5.4. Action de la thapsigargine sur le métabolisme du calcium	12
I.5.4.1. Importance du calcium	12
I.5.4.2. Transport du calcium.....	12
I.5.4.3. Mode d'action de la thapsigargine.....	13
I.5.5. Cancer de la prostate et thapsigargine.....	13
I.5.5.1. Rôle de la thapsigargine dans l'induction de l'apoptose.....	14
I.5.5.2. Conception de pro-médicament	15

Chapitre II : Oxydants et Antioxydants

II.1. Les radicaux libres.....	16
II.2. Toxicité cellulaire des radicaux libres	18
II.3. Le stress oxydatif.....	18

II.4. Les antioxydants.....	18
II.4.1. Antioxydants endogènes	18
II.4.2. Antioxydants exogènes	19
II.4.2.1. Les composés phénoliques.....	19
II.4.2.2. Les flavonoïdes	20
II.4.2.3. Les anthocyanines	20
II.4.2.4. Les tannins.....	21

Chapitre III : Physiologie de l'Inflammation

III.1. Définition.....	22
III.2. Les étapes de la réaction inflammatoire	22
III.2.1. L'initiation	22
III.2.2. L'amplification.....	23
III.2.3. La stabilisation.....	24
III.2.4. La résolution.....	24
III.3. Les Anti-Inflammatoires	25
III.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens	25
III.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	25

Chapitre VI : Physiologie de La Douleur

IV.1. Définition	27
IV.2. Mécanisme.....	27
IV.3. Différents types de douleur	27
IV.3.1. La douleur physiologique	27
IV.3.2. La douleur "inflammatoire"	28
IV.3.3. La douleur neuropathique	28
IV.4. Les Antalgiques.....	29
IV.4.1. Les analgésiques morphiniques (à opium).....	29
IV.4.2. Les analgésiques non morphiniques.....	29

Partie Expérimentale

I/Matériel et Méthodes

I.1. Préparation de la poudre végétale.....	30
I.1.1. Récolte du matériel végétal.....	30
I.1.2. Séchage et broyage.....	30
I.2. Test d'humidité.....	31
I.2.1. Principe de la méthode.....	31
I.2.2. Mode opératoire.....	31
I.3. Préparations des extraits.....	31
I.3.1. Extraction des composés phénoliques.....	31
I.4. Dosage des différents groupes de composés phénoliques.....	33
I.4.1. Dosage des composés phénoliques totaux.....	33
I.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	34
I.4.3. Dosage des anthocyanines.....	34
I.4.4. Dosage des tannins condensés.....	35
I.5. Evaluation de l'activité antioxydant.....	36
I.5.1. Pouvoir réducteur.....	36
I.5.2. Activité « scavenging » du radical DPPH.....	37
I.6. Evaluation de la toxicité.....	38
I.6.1. Toxicité aiguë par voie orale.....	38
I.6.2. Toxicité subaiguë par voie orale.....	39
Prélèvement.....	40
Dosages biochimiques.....	41
a) Urée sanguine.....	41
b) Créatinine.....	42
c) Bilirubine.....	42
1- Bilirubine totale.....	43
2- Bilirubine conjuguée.....	43
3- Bilirubine non conjuguée.....	44
d) Alanine amino-transférase.....	44
e) Aspartate amino-transférase.....	44
f) Phosphatase alcaline.....	45
I.7. Détermination de l'activité anti-inflammatoire.....	46

I.8. Détermination de l'activité antalgique	48
---	----

II/Résultats et Discussion

II.1. Taux d'humidité	50
II.2. Dosage des différents groupes de composés phénoliques	51
II.2.1. Les composés phénoliques totaux	51
II.2.2. Les flavonoïdes	53
II.2.3. Les anthocyanines	54
II.2.4. Les tannins condensés.....	55
II.3. Pouvoir réducteur	57
II.4. Activité « scavenging » du radical DPPH.....	59
-Détermination des IC ₅₀	60
II.5. Activités biologiques <i>in vivo</i>	62
II.5.1. Toxicité aiguë	62
II.5.2. Toxicité subaiguë	65
Bilan rénal :	65
Bilan hépatique :	66
La bilirubine	66
Phosphatases alcalines	67
Les transaminases	68
II.5.3. Activité inflammatoire	69
II.5.4. Activité antalgique	71
Conclusion et perspectives.....	73
Références Bibliographiques.....	76

Synthèse
Bibliographique

Introduction

Les plantes médicinales sont une source inépuisable de substances douées de propriétés thérapeutiques diverses. La flore algérienne est riche et hautement variée. Elle renferme un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales utilisées en couramment en médecine traditionnelle.

Thapsia garganica occupe une place privilégiée dans le traitement de certaines pathologies, celle-ci appartient à la famille des apiacées. Ces dernières sont une famille de plantes dicotylédones très homogène, une des plus faciles de la flore à reconnaître, grâce à ses inflorescences en ombelles (**Guignard, 1998**).

Le genre «*Thapsia* » comprend environ 41 espèces, originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe. *Thapsia garganica* est une espèce répandue en Algérie, connue surtout pour l'utilisation de ses racines en cuisine et en médecine traditionnelle (**Gómez, 2007**).

Son nom vernaculaire en kabyle est « Adéryés » et en français « Thapsie ou Faux fenouil ».

Ses extraits de racines sont connus, pour leurs propriétés irritantes sur la peau et sont utilisés pour soulager des inflammations articulaires (**Sabala et al., 1993**).

Deux composés majoritaires ont été isolés à partir de *Thapsia garganica* par **Rasmussen et al.** en **1978**, la thapsigargine et la thapsigargicine : deux lactones sesquiterpènes dont la principale propriété est le blocage des ATPases responsables du transport de calcium dans le réticulum sarco-endoplasmique. Cette propriété a été exploitée en médecine pour le traitement du cancer de la prostate.

Des propriétés toxiques ont été attribuées aux deux substances (**Liu et al., 2006**).

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant » causé par la présence en excès de radicaux libres oxygénés, impliqués dans de nombreuses maladies.

Les métabolites secondaires d'origine végétale font l'objet de nombreuses recherches dans la lutte du stress oxydatif, notamment dans la recherche de nouvelles molécules telles que les composés phénoliques, huiles essentielles et alcaloïdes auxquels on attribue des propriétés biologiques diverses.

Le présent travail a porté sur certaines activités biologiques *in vitro* et *in vivo* des extraits de *Thapsia garganica*.

Les principales parties de cette étude sont traitées selon le plan suivant :

- Une synthèse bibliographique,
- L'extraction des composés phénoliques des différentes parties (racines, feuilles et fleurs) de *Thapsia garganica* suivi d'une série de dosage spectral des différentes classes de polyphénols,
 - Détermination de l'activité antioxydante et antiradicalaire des extraits obtenus,
 - Détermination des toxicités aiguë et subaiguë des infusions préparées à partir des racines, des feuilles et des fleurs de *Thapsia garganica*,
 - L'étude du pouvoir inflammatoire et antalgique des infusions préparées à partir des racines, des feuilles et des fleurs de *Thapsia garganica*.

Chapitre I :
Thapsia garganica

I.1. Généralités sur les apiacées

La famille des Apiacées (*Apiaceae*), appelées aussi Ombellifères (*Umbelliferae*), est une famille de plantes dicotylédones, qui comptent près de 3 000 espèces qui se répartissent essentiellement dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle. Une seule espèce a une importance économique notable, la carotte, plusieurs fournissent des condiments appréciés (anis, fenouil), certaines sont toxiques comme la grande ciguë (**Guignard, 1998 ; Judd et al., 2002**).

I.2. Caractéristiques des apiacées

Ce sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Les feuilles sont alternes, composées, pennées, palmées ou simples. Elles peuvent être profondément découpées ou lobées, entières ou dentées-serrées à nervation parallèles ou pennées ; à pétioles plus au moins engainants ; stipulés ou exstipulés.

Les inflorescences sont organisées en ombelles composées (ou simples) parfois en cymes.

Les fleurs sont blanches, jaunâtres, verdâtres ou rosées, généralement hermaphrodites, mais parfois unisexuées.

Les racines, tiges et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essence et de résine.

Les tiges sont à entre-nœuds souvent creux, à canaux sécréteurs contenant des huiles essentielles et des résines, des saponines triterpéniques, des coumarines, des polyacétylènes falcarinone, des monoterpènes et des sesquiterpènes ; à umbelliférose (trisaccharide) comme élément de réserve (**Gaussen et al., 1982 ; Guignard, 1998 ; Judd et al., 2002 ;**).

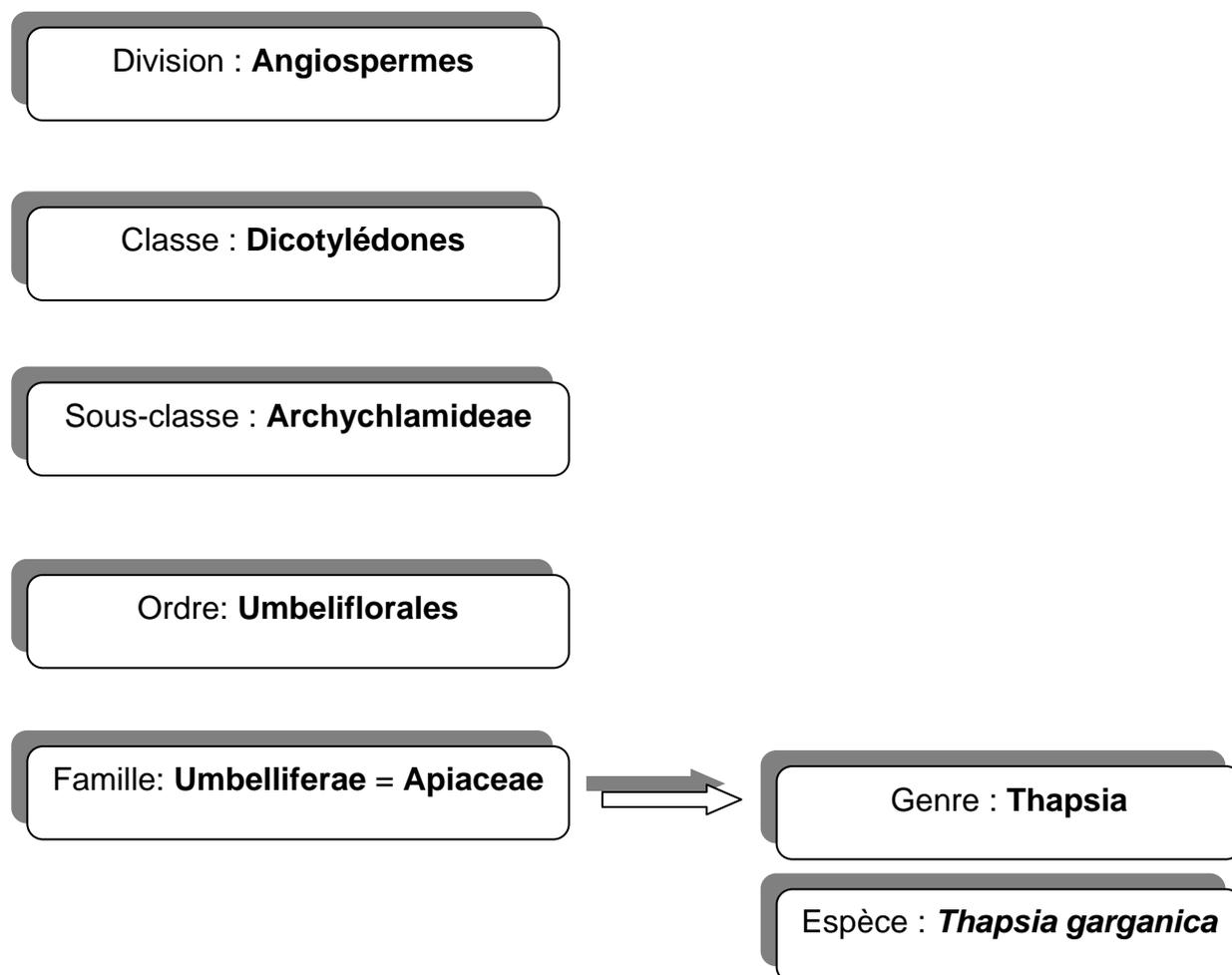
I.3. Le genre *Thapsia*

Thapsia est un genre de plantes à fleurs avec 41 espèces, appartenant à la famille des apiacées. Ils sont originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe.

Thapsia garganica L. est une espèce répandue dans le bassin méditerranéen, qui a pour habitat le bord des routes et les champs (**Gómez, 2007**).

I.3.1. Classification botanique

La systématique botanique permet de classer *Thapsia garganica* parmi les systèmes du règne végétal en se référant à la classification de **Gómez (2007)**.



I.3.2. Description de l'espèce *Thapsia garganica*

C'est une Plante vivace, à tige florifère dressée, peu ramifiée, atteignant environ 1,50 m de haut. Elle possède de grandes feuilles en touffes, très découpées, à division linéaires pourvues d'un pétiole en gaine à la base, les supérieurs sont réduits à la gaine épaisse, d'un vert grisâtre comme la tige. Les fleurs sont petites, jaunes disposées en grandes ombelles presque sphériques. Les fruits sont ovales, atteignent plus de 2 cm de long, largement ailés. Les racines sont en forme de rhizomes (figure 1). La floraison a lieu entre avril et juillet (**Meftah et al., 2001**).



Figure 1 : Photographies des différentes parties aériennes de *Thapsia garganica*.

I.4. Métabolites secondaires

I.4.1. Composés phénoliques

Djeridane *et al.* (2007) ont révélé que la composition phénolique des extraits éthanoliques de *Thapsia garganica* était relativement faible, soit de 2,5 mg équivalent d'acide gallique par 1g de matière sèche.

Lors de cette même étude, ils se sont intéressés à la nature des composés phénoliques. L'analyse HPLC de ces extraits a révélé que les flavonoïdes représentent 98% (m/m) des composés phénoliques totaux avec détection de la quercétine, que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique représentent 2%(m/m) des composés phénoliques totaux et que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont inexistantes.

L'étude cytotoxique de substances bioactives extraites de *Thapsia garganica* a permis d'isoler des esters de phénylpropanoïdes, connus sous le nom de neohelminthicine A,B,C et D. La différence entre ces composés est l'acyle lié au squelette 1,2 dihydroxy-phénylpropanoïde. Ces acyles sont : angeloyl, octanoyl, hexanoyl et butanoyl qui correspondent respectivement aux neohelminthicines A,B,C et D (Tableau n° I) (**Liu *et al.*, 2006**).

Les phénylpropanoïdes sont des dérivés de la phénylalanine qui subit l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) pour donner l'acide cinnamique. Ce dernier est ensuite converti par des séries d'hydroxylation, méthylation et réductions enzymatiques en différents précurseurs de chacune des classes de phénylpropanoïdes : les coumarines, les flavonoïdes, les stilbénoloïdes, ainsi que les monolignols, les monomères de la lignine et de la lignane.

Ils possèdent une grande variété de fonctions telles que la défense contre les herbivores et les attaques microbiennes, et sont une composante structurale des parois cellulaires (**Hahlbrock & Scheel, 1989**).

Tableau n° I : Structure des phénylpropanoïdes isolés à partir de *Thapsia garganica* (Liu *et al.*, 2006).

Phénylpropanoïdes		
R = Angeloyl		Neohelmanthicine A
		Neohelmanthicine B
		Neohelmanthicine C
		Neohelmanthicine D

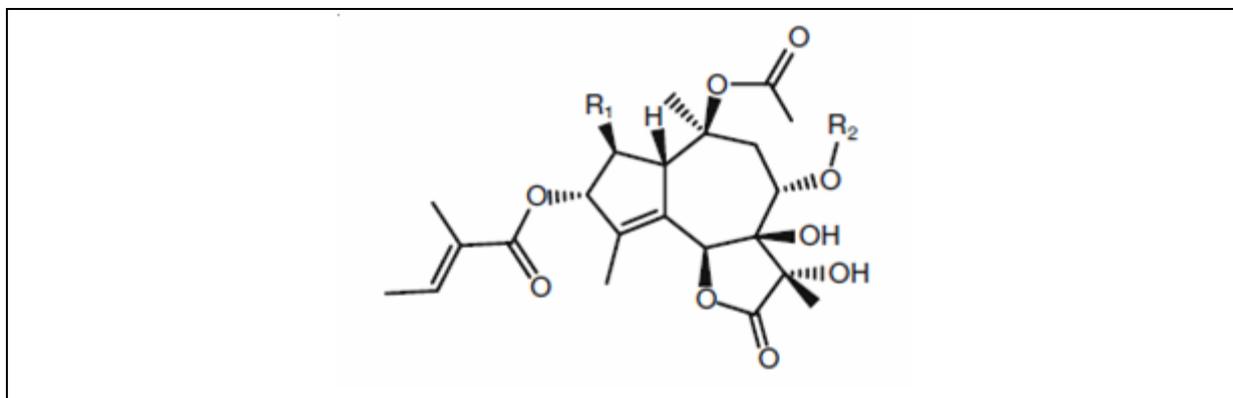
I.4.2. Composés terpéniques

Les composés terpéniques que l'on retrouve essentiellement chez le genre *Thapsia* sont des lactones sesquiterpéniques.

Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe numériquement important de substances - environ 3 000 structures connues – qui étaient décrites, dans les anciens traités de Matière Médicale, sous le nom évocateur de « principes amers ». Leurs structures sont très variées, mais se rattachent toutes au produit de cyclisation, cyclodécadiénylique du pyrophosphate farnésyle (FPP) (Bruneton, 1993).

Les lactones sesquitépéniques de l'espèce *Thapsia garganica* appartiennent au groupe des guaianolides. Les composants dominants de cette plante sont des thapsigargines (Tableau n° II) et deux composés majoritaires sont caractérisés dans cette plante. Ce sont la thapsigargine et la thapsigargicine, qui possèdent des propriétés biologiques importantes, et ont été exploités en médecine. La toxicité cellulaire fait partie des propriétés biologiques de ces substances (**Drew et al., 2009**).

Tableau n° II : Structure du squelette des thapsigargines du genre *Thapsia* (**Andrews et al., 2007; Christensen et al., 1997**) in (**Drew et al. 2009**).



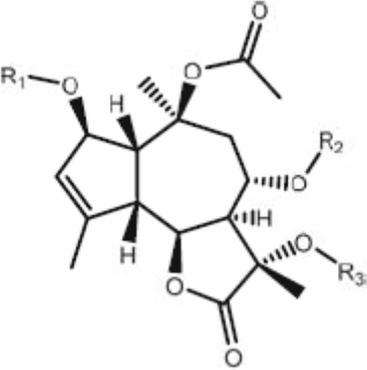
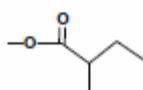
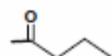
Les structures des thapsigargines de *Thapsia garganica* dépendent de la nature des radicaux R1 et R2 (Tableau n° III).

Tableau n° III : Structures des lactones sesquiterpéniques majoritaires de *Thapsia garganica* (Drew *et al.* 2009).

Nom	R1	R2	Référence
Thapsigargine			Rasmussen <i>et al.</i> (1978) Rasmussen <i>et al.</i> (1981) Christensen <i>et al.</i> (1997)
Trilobolide	H		Rasmussen <i>et al.</i> (1981)
Nortrilobolide	H		Christensen <i>et al.</i> (1984a) Christensen <i>et al.</i> (1997)
Thapsgargicine			Rasmussen <i>et al.</i> (1978) Christensen <i>et al.</i> (1997)
Thapsivillosine C			Rasmussen <i>et al.</i> (1981) Christensen <i>et al.</i> (1984b)
Thapsivillosine D			Rasmussen <i>et al.</i> (1981) Christensen <i>et al.</i> (1984b)
Thapsivillosine E			Rasmussen <i>et al.</i> (1981) Christensen <i>et al.</i> (1984b)
Thapsivillosine I			Christensen <i>et al.</i> (1984b)
Thapsivillosine J			Christensen <i>et al.</i> (1984b)
Thapsivillosine L			Liu <i>et al.</i> (2006)
		H	Falsone <i>et al.</i> (1986)
		H	Falsone <i>et al.</i> (1986)

D'autres guaianolides n'appartenant pas aux thapsigargines sont isolés à partir de plusieurs espèces du genre *Thapsia* dont la structure est représentée dans le tableau n° IV (Drew *et al.* 2009).

Tableau n° IV : Structure d'un guaianolide isolé à partir de *Thapsia garganica* (Drew et al., 2009).

	R1	R2	R3	Référence
			H	Christensen et al. (1997)

I.5. Propriétés biologiques de *Thapsia garganica*

I.5.1. Introduction

Les extraits de racines de *Thapsia garganica* étaient utilisés dans la médecine traditionnelle européenne et arabe pour le traitement des affections pulmonaires, les rhumes et soulagement des douleurs rhumatismales (French, 1971 in Gomez, 2007).

Ses extraits contiennent de puissants irritants pour la peau, constituant, une importante cause de dermatite de contact qui se manifeste par un érythème, des démangeaisons et la formation de petites vésicules. Les principaux composés actifs majoritaires des extraits de racines, responsables de ces effets ont été identifiés par Christensen et al. (1981) comme étant des sesquiterpènes connus sous le nom de thapsigargine et thapsigargicine.

Des recherches visant la connaissance des propriétés biologiques des composants majoritaires de *Thapsia garganica* ont été menées dès le début des années 70. Elles ont révélé que la thapsigargine est un puissant stimulant de la libération d'histamine, inhibitrice des ATPases du réticulum sarco-endoplasmique et participant à la réponse inflammatoire. Elles sont également connues pour favoriser la tumorigenèse sur la peau de souris.

La thapsigargicine possède également la capacité d'inhiber les ATPases du réticulum sarco-endoplasmique.

I.5.2. Cytotoxicité

Liu et al. (2006) ont mené une étude sur la cytotoxicité de la thapsigargine et des esters des phénylpropanoïdes isolés à partir des fleurs de *Thapsia garganica*. Les tests ont été effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses de la leucémie, du carcinome et du sein. Les IC50 ont révélé que la thapsigargine possède un potentiel cytotoxique plus élevé par rapport aux esters phénylpropanoïdes.

I.5.3. Thapsigargine, libération d'histamine, réponse inflammatoire et promoteur tumoral

Ali et ses collaborateurs (1985) ont montré que la thapsigargine était capable d'induire l'activation des mastocytes et des leucocytes, provoquant la libération d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité et de la réponse inflammatoire. L'histamine est un vasodilatateur puissant, préformé, sécrété essentiellement par les mastocytes, polynucléaires, basophiles et les plaquettes, en réponse à plusieurs stimuli parmi eux la fixation de la thapsigargine sur les récepteurs des mastocytes, provoquant une vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire, signe d'une réponse inflammatoire. Cette induction est du type dose dépendante, type cellulaire dépendante et même pour un seul type cellulaire, cette réponse varie en fonction de l'espèce et du degré de purification. Un effet similaire a été observé avec la thapsigargine, mais n'étant pas autant efficace.

Pour vérifier l'implication de la thapsigargine et la thapsigargine dans l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique, elles ont été comparées au composé TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Les trois substances stimulent la production des prostaglandines E2 et des leucotriènes à de faibles doses. Néanmoins, il a été constaté qu'à la même dose, la thapsigargine et la thapsigargine montrent le plus grand taux d'induction du métabolisme de l'acide arachidonique (**Ohuchi et al., 1987 ; Ohuchi et al., 1988**).

Sachant que la réponse inflammatoire est impliquée dans le développement de tumeurs, des recherches ont été dirigées dans cet axe. Les résultats confirment les propriétés pro-tumorales à long terme de la thapsigargine (**Jackson et al., 1988 ; Pincemail et al., 1999**).

Cependant, il a été démontré que cette dernière n'est pas du type TPA (12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate) car elle induit l'activité de l'histidine décarboxylase (HDC) et non celle de l'ornithine décarboxylase (ODC). Elle induit le métabolisme de l'acide arachidonique tout comme les promoteurs tumoraux du type TPA mais pas de la même manière, elle l'active par activation de la LOX et de la COX, contrairement aux promoteurs type TPA qui activent la protéine kinase C (PKC) (**Hakii et al., 1986 ; Blumberg,1988 ; Koivunen et al., 2005**).

I.5.4. Action de la thapsigargine sur le métabolisme du calcium

I.5.4.1. Importance du calcium

L'ion calcium est un second messager universel, utilisé par tous les types cellulaires dans les étapes précoces de la réponse à de nombreux stimuli. Les influx calciques ont une provenance, une fréquence, une amplitude et une étendue qui sont autant de paramètres permettant d'affiner le signal afin de lui donner une spécificité. En fonction de ces paramètres, la cellule va élaborer une réponse par l'entremise de protéines liant le calcium, qui ainsi activée va déclencher une cascade d'événements conduisant au comportement cellulaire approprié (**Coulon & Blanchard, 2001**).

I.5.4.2. Transport du calcium

La nature lipidique des membranes biologiques restreint fortement le type de molécules qui diffusent de part et d'autres. Cette imperméabilité permet d'avoir une concentration intracellulaire de l'ion Ca^{2+} environ 20 000 fois inférieure que celle du milieu extracellulaire. L'omniprésence de phosphate inorganique (Pi et PPI) à des concentrations milli-molaires dans le cytosol impose une concentration en Ca^{2+} très basse, car ce dernier se combine avec le phosphate inorganique pour donner les phosphates de calcium insolubles.

C'est pour cela, que la concentration intracellulaire du calcium doit être régulée par accumulation dans le réticulum endoplasmique (réticulum sarcoplasmique dans le muscle), servant ainsi de réserve et de mécanisme de contrôle de cet ion (**Carafoli, 1987 in Gomez, 2007**).

Les cellules possèdent des ATPases qui régulent la concentration cytosolique du Ca^{2+} à la fois dans la membrane plasmique (PMCA) et dans le réticulum sarco-endoplasmique (SERCA). Ces réserves internes sont maintenues grâce à l'activité de ces ATPases qui pompent le calcium à l'inverse du gradient de concentration en consommant de l'énergie (**Carafoli, 1987 ; Lytton et al., 1992**) in (**Gomez, 2007**).

I.5.4.3. Mode d'action de la thapsigargine

Dans le mécanisme habituel de la libération du calcium stocké dans le réticulum sarco-endoplasmique, les SERCA, impliquent l'hydrolyse du Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en diacylglycérol et inositol-1,4,5 triphosphate. Ce dernier déclenche la libération du calcium séquestré (**Gomez, 2007**).

Des études antérieures ont révélé que la thapsigargine augmentait la concentration intracellulaire du calcium sans l'implication de l'inositol-1,4,5- triphosphate, messenger intracellulaire impliqué dans la libération de calcium (**Jackson et al., 1988**).

La thapsigargine, qui possède une forte affinité pour les SERCA, inhibe sélectivement les ATPases du réticulum sarco-endoplasmique sans affecter les pompes de la membrane plasmique et mitochondriale, ainsi elle provoque la décharge du calcium stocké dans ces compartiments, provoquant une augmentation accrue de la concentration cytosolique du calcium, qui provoque un changement de la perméabilité de la membrane plasmique, entraînant ainsi un afflux du calcium extracellulaire (**Appendin et al., 2005**).

I.5.5. Cancer de la prostate et thapsigargine

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes, et l'une des causes les plus fréquentes de décès dans le monde occidental. Il survient lorsque des cellules anormales, prolifèrent de façon incontrôlables sous l'effet d'hormones sexuelles mâles : les androgènes (**Christensen et al., 2009**).

Le traitement du cancer de la prostate par ablation androgénique n'est pas totalement curatif car cette thérapie n'est efficace que sur des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes. Les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes sont insensibles à cette thérapie et continuent à proliférer, causant la rechute et la mort du patient (**Arnold & Isaacs, 2002**).

La capacité de la thapsigargine à induire l'apoptose a été utilisée dans le traitement du cancer de la prostate, essentiellement pour remédier au problème des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes (**Gomez, 2007**).

I.5.5.1. Rôle de la thapsigargine dans l'induction de l'apoptose

L'introduction de la thapsigargine à raison de 50-100 nM à des cellules cancéreuses provoque une élévation biphasique de la concentration intracellulaire du calcium. Après la première élévation, il se produit une augmentation de l'expression d'une série de protéines régulatrices du taux de calcium (ex : Calmoduline).

La seconde élévation active la calcineurine qui déphosphoryle une série de protéine, parmi elles : les protéines pro-apoptotiques Bad. La protéine Bad déphosphorylée va être transloquée vers la mitochondrie, et se dimerise avec la BCl₂ ou la BCl_{XL}, provoquant le déplacement de la protéine Bax, et permettant la libération du cytochrome C et du facteur AIF (apoptosis-inducing factor) qui activent la cascade des caspases, entraînant des changements morphologiques et la fragmentation de l'ADN génomique associés à l'apoptose (**Lin et al., 1997 ; Wang et al., 1999 ; Tombal et al., 2000**) in (**Denmeade et al., 2003**).

Une étude comparative entre le taxol, doxorubicine et la thapsigargine, sur les effets inducteurs de l'apoptose de cellules cancéreuses de la prostate (Lignée : LNCaP), a révélé que la thapsigargine présentait le plus grand taux de réduction de cellules viables par rapport aux deux autres substances, utilisées habituellement dans le traitement des cancers (**Denmeade & Isaacs, 2005**).

L'effet cytotoxique de la thapsigargine sur des cellules normales et malignes a révélé que leur exposition (100 nM pendant 5 jours) à ce métabolite provoque une réduction de l'ordre de 80% à 90% du nombre de cellules viables, indépendamment du type cellulaire. Néanmoins, on note un plus grand effet sur les cellules cancéreuses de la prostate (**Denmeade et al., 2003**).

I.5.5.2. Conception de pro-médicament

Le problème qui s'est posé, lors de l'utilisation de la thapsigargine dans le traitement du cancer de la prostate, est la non spécificité vis-à-vis du type cellulaire compte tenu de son mode d'action. Donc pour pouvoir l'utiliser en thérapie, une approche de pro-drogue (pro-médicament) a été décrite, basée sur l'union du principe actif (thapsigargine ou un analogue de celle-ci) à un peptide transporteur vers les cellules prostatiques cancéreuses caractérisées par une surproduction de l'antigène PSA (Prostate specific antigen), qui est une glycoprotéine à activité chymotrypsique. Celle-ci va reconnaître spécifiquement la séquence du peptide transporteur, libérant ainsi le principe actif dans son site d'action, soit les cellules cancéreuses prostatiques (**Cragg et Newman, 2006; Gomez, 2007**).

Chapitre II :
Oxydants &
Antioxydants

II.1. Les radicaux libres

Dans les molécules, les atomes sont assemblés par des liaisons covalentes établies par mise en commun d'électrons de spins opposés. Tout apport d'énergie suffisant est susceptible d'entraîner la rupture de ces liaisons et donc de donner naissance à des entités chimiques qui possèdent un électron non apparié, dit « célibataire », sur son orbitale externe ; ces entités chimiques sont appelées radicaux libres. Ce déséquilibre n'est que transitoire puisqu'il conduit à rechercher et arracher un électron sur d'autres molécules, entraînant la formation en chaîne de radicaux libres (**Fontaine et al., 2002 ; Milane, 2004**).

Les espèces réactives oxygénées (ROS) est un terme qui englobe toutes les molécules réactives contenant de l'oxygène incluant les radicaux libres, elles comprennent le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'ion hypochlorite ClO^- , le radical hydroxyle HO° , le peroxyde d'azote $ONOO^{\circ}$, le monoxyde d'azote NO° , le dioxygène singulet 1O_2 , les radicaux dérivant d'acides gras insaturés, les radicaux peroxydes ROO° et le radical alcoxyle RO° où R est une chaîne carbonée (**Percival, 1998 ; Favier, 2003**).

Selon **Milane (2004)**, ces radicaux libres sont produits, naturellement, dans l'organisme :

- Au niveau de la respiration mitochondriale lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O ;
- Au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- Par diverses oxydases cellulaires ;
- Au cours de la phagocytose.

Milane a rapporté en **2004**, que des facteurs exogènes influençaient de façon importante la formation des radicaux libres comme :

- Les rayonnements UV et les radiations ionisantes par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants ;
- L'ingestion de l'alcool qui est suivie de la formation de radicaux libres par la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^{\circ-}$, de même l'alcool peut réduire l'activité des enzymes de protection et la concentration sérique en sélénium et vitamine E.

- Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres: ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.
- Les antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons.

II.2. Toxicité cellulaire des radicaux libres

Toutes les espèces réactives sont capables de réagir avec les organites cellulaires (lipides membranaires, acides nucléiques, protéines, enzymes et d'autres petites molécules) provoquant des dommages cellulaires.

D'après **Koechlin-Ramonatxo (2006)** les radicaux libres présentent une toxicité cellulaire en ayant pour principales cibles :

- **L'ADN** : en induisant des effets mutagènes ou l'arrêt de la réplication de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux OH° issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN.
- **Les macromolécules** : les radicaux libres sont également responsables d'inactivation enzymatique en particulier des sérine-protéases, d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique), de formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques. Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine, la cystéine.
- **Les lipides** : ils sont une cible privilégiée des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires.

II.3. Le stress oxydatif

La rupture de l'équilibre entre espèces pro- et anti-oxydantes est désignée par le terme de stress oxydant. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), de désordres pathologiques (syndrome d'ischémie perfusion), athérosclérose, inflammation, cancer mais également dans les phénomènes de vieillissement (**Durand et al., 2003 ; Azzi, 2007**).

II.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique permet la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires.

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en neutralisant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires) (**Fontaine et al., 2002**).

II.4.1. Antioxydants endogènes

L'organisme possède deux grands systèmes de défense enzymatique et non enzymatique qui fonctionnent de façon complémentaire et synergique selon un compartiment bien précis pour protéger les cellules (**Percival, 1998**) :

- **Système enzymatique** : Les principales enzymes sont :
 - La superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$.

- La catalase (CAT) : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau.
 - La glutathion peroxydase (GP_x) et réductase (GR) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- **Systèmes non enzymatiques** : représentés par les métalloprotéines telles que la ferritine, la lactoferrine, l'albumine, et la céruloplasmine en sont un exemple de protéines qui chélatent les métaux comme le fer et le cuivre libres qui sont capables de catalyser les réactions oxydatives.

II.4.2. Antioxydants exogènes

Un grand nombre de substances antioxydantes dérive de l'alimentation (fruits, légumes, épices...). En effet les aliments sont une source importante de caroténoïdes, de tocophérols, d'acide ascorbique et de composés phénoliques (végétaux) qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant (**Curtay & Robin, 2000**). Le zinc et le sélénium jouent un rôle important dans le mécanisme d'élimination des radicaux libres (**Soares, 2005**).

II.4.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites secondaires le plus large et le plus répandu du règne végétal. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de simples molécules phénoliques de faible poids moléculaire tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**).

Les composés phénoliques sont considérés comme de bons antioxydants en raison de leur fort potentiel redox et leur stabilité relative aux radicaux (**Jovanovic & Simic, 2000**). Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres (**Middleton et al., 2000**).

II.4.2.2. Les flavonoïdes

Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité dont les flavonoïdes font partie, comme le laisse supposer leur dénomination (du latin *favus* = jaune), ce groupe très important et très répandu comprend des composés de couleur jaune ; cependant, il comporte des composés incolores ou de diverses couleurs responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tannins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides (**Richter, 1993 ; Milane, 2004**).

Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (**Milane, 2004**).

II.4.2.3. Les anthocyanines

Ce sont l'un des représentants d'un large groupe de pigments végétaux, les flavonoïdes. On compte plus de 200 composés appartenant à ce groupe, généralement liés à des résidus de sucres. Ils sont responsables de la coloration bleue, violette, pourpre des végétaux.

En raison de leur structure chimique, ces pigments sont capables de réagir avec de nombreuses substances actives, ce qui leur confère plusieurs propriétés dont l'activité antioxydant qui est due essentiellement à la présence de groupements hydroxyles qui permettent entre autre la chélation des ions métalliques (fer et cuivre libres). Les anthocyanines sont capables de réduire le taux des lipoprotéines oxydées et l'activité de la monoxyde d'azote synthétase (**Kowalczyk et al., 2003**).

II.4.2.4. Les tannins

Les tannins sont des métabolites secondaires dérivant des composés phénoliques, les flavonoïdes, très répandus dans les végétaux où ils s'accumulent dans les organes et les tissus pour assurer la protection contre la prédation, en même temps ils sont responsables de l'astringence des fruits et participent à la détermination de la saveur des boissons, des jus de fruits et des thés.

Leur système de classification est basé sur leur caractéristique structurale et leur propriété chimique. On distingue les tannins hydrolysables et les non hydrolysables :

- Les tannins hydrolysables sont des esters d'oses et d'acides phénoliques (gallique ou ellagique) regroupant les gallotannins et les ellagitannins ;
- Les tannins non hydrolysables correspondent à la condensation de 2 à 10 molécules monomères possédant le noyau flavane hydroxyle, regroupant dans cette classe les tannins condensés (proanthocyanidines) **(Khanbabae & Ree, 2001; Milane, 2004 ; Xie & Dixon, 2005).**

Chapitre III :
Physiologie de
L'Inflammation

III.1. Définition

La réaction inflammatoire est une réaction physiologique de défense de l'organisme survenant en cas d'agression tissulaire. Elle se limite soit à des manifestations cliniques locales, soit elle associe à ces dernières des signes cliniques systémiques (**Laurent, 1988**).

La réaction inflammatoire est responsable de phénomènes locaux caractérisés par 4 signes cardinaux : rougeur, chaleur, tumeur, douleur (rubor, calor, tumor, dolor) et par une série de processus cellulaires et biochimiques : afflux leucocytaire, plaquettaire et macrophagique, libération de dérivés de l'acide arachidonique prostaglandines dont les PGE₂, thromboxanes et leucotriènes), de facteur d'activation plaquettaire (PAF), d'hémoglobine, d'amines vasodilatatrices telles que l'histamine, la sérotonine et les kinines, des enzymes protéolytiques et des ions superoxydes (**Engler, 1988 ; Gallin 1989**).

A l'échelle systémique, elle se caractérise par de nombreuses modifications comme l'activation du complément et la cascade de la coagulation, un syndrome fébrile, une modification du métabolisme lipidique, une augmentation de la néoglucogenèse et du catabolisme protéique, des modifications hormonales (**Gallin 1989 ; Gruys et al., 1994**).

III.2. Les étapes de la réaction inflammatoire

III.2.1. L'initiation

La réaction inflammatoire à médiation immunitaire (reconnaissance de l'antigène de manière spécifique) fait intervenir, sur le plan moléculaire l'activation de la voie classique du complément et sur le plan cellulaire, de façon indépendante, les plaquettes, les mastocytes et les lymphocytes T et B.

Dans le cas où la réaction inflammatoire est indépendante de la nature de l'agent agresseur, sur le plan moléculaire, c'est l'activation du facteur XII de la coagulation sanguine ou facteur d'Hageman qui domine. Cette activation entraîne alors la cascade de la coagulation sanguine, initie la fibrinolyse par activation du plasminogène. Ceci provoque la libération de produits de dégradation de la fibrine et déclenche la cascade des kinines, agents vasoactifs, chimiotactiques et responsables des premières sensations douloureuses.

Enfin, on observe l'initiation du complément par la voie alterne provoquant la libération de nombreux facteurs à effets pro-inflammatoires. Sur le plan cellulaire, interviennent les mastocytes et les plaquettes secrétant des amines biologiquement actives : l'histamine et la sérotonine. **(Delverdier *et al.*, 1993)**

III.2.2. L'amplification

Cette phase est caractérisée par l'existence d'une synergie entre les différents médiateurs déjà formés, l'afflux par chimiotactisme des cellules phagocytaires sur le foyer inflammatoire et par la libération de nouveaux médiateurs indiqués ci-dessous : Les phospholipases, présentes dans les plaquettes et les leucocytes, sont activées au cours de la réaction inflammatoire, dégradant les phospholipides en acide arachidonique.

Ce dernier est métabolisé

- Par la voie de la lipo-oxygénase, en leucotriènes C4, D4 et E4 responsables d'une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que des sensations douloureuses et le B4, quant à lui, est fortement chimiotactique pour les granulocytes neutrophiles,
- par la voie de la cyclo-oxygénase en prostaglandines, dont les différentes isomérasas entraînent la formation de trois grandes classes de produits
 - Les prostaglandines du type E2 qui augmentent la perméabilité vasculaire, la sensibilité à la douleur et sont pyrogènes,
 - Les prostacyclines vasodilatatrices,
 - Les thromboxanes vasoconstrictrices.

Enfin, les plaquettes produisent un groupe analogue aux phosphatidylcholines, appelé le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Ce dernier provoque l'agrégation plaquettaire, a un effet chimiotactique sur les phagocytes, stimule la libération d'enzymes lysosomales et la formation de produits oxygénés par les granulocytes éosinophiles, les granulocytes neutrophiles et les macrophages et augmente l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales.

Sur le plan cellulaire, cette phase se caractérise par l'arrivée des granulocytes neutrophiles au niveau du site inflammatoire. Ils libèrent ainsi des enzymes comme des hydrolases acides (cathepsines), de la collagénase, de l'élastase et de la myéloperoxydase. La cellule meurt en libérant des enzymes lytiques et des métabolites à effet phlogogène (**Delverdier *et al.*, 1993**).

III.2.3. La stabilisation

Le contrôle des déséquilibres nés de l'activation des différents systèmes de médiateurs de l'inflammation se fait par un système de mécanismes régulateurs. Le macrophage occupe une grande place dans ce mécanisme de contrôle par l'intermédiaire notamment de la sécrétion de cytokines, à savoir : le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Celles-ci permettent de stimuler les hépatocytes qui produiront ainsi les protéines de la phase aiguë (**Durum & Oppenheim 1989**).

Au cours de cette phase, il peut y avoir développement d'une réponse immune spécifique. Les cellules qui interviennent dans ce processus sont les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigène.

L'équilibre entre facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires détermine la qualité des différents mécanismes sus-cités et dépend de la capacité de l'organisme agressé à éliminer l'agent inducteur de l'inflammation.

Il s'agit, par exemple, de certaines protéines de la phase aiguë, telles que l' α -1-antitrypsine, de l' α -2-macroglobuline ou de la protéine C réactive, qui inhibent efficacement les systèmes enzymatiques présidant à l'activation de nombreux médiateurs inflammatoires ou encore de la céruloplasmine, qui par son action anti-oxydante, est capable de s'opposer aux effets des radicaux oxydants libérés par les cellules phagocytaires activées (**Delverdier *et al.*, 1993**).

III.2.4. La résolution

Cette phase conduit, dans la plupart des cas, à la guérison clinique du foyer inflammatoire. Lors d'atteinte légère du foyer agressé, la fin de la réaction inflammatoire se caractérise par un arrêt des phénomènes régulateurs mis en œuvre au cours de la stabilisation.

Lorsque la réaction inflammatoire a entraîné des pertes conséquentes de tissus, un processus un peu particulier se met en place : la cicatrisation. Cette modalité de résolution met en jeu plusieurs mécanismes tels que la néoangiogenèse et la synthèse de collagène et de glucosaminoglycanes par les fibroblastes.

Ces derniers phénomènes sont contrôlés par différentes cytokines telles que l'IL-1, le PDGF (platelet derived growth factor), le FGF (fibroblast growth factor), le TNF ou encore le TGF- β (transforming growth factor β) (**Delverdier et al., 1993**).

III.3. Les Anti-Inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont une classe de médicaments subdivisée en deux catégories (**Aouissa, 2002**) comme suit :

III.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens de référence sont représentées par la cortisone et l'hydrocortisone.

Ces corticoïdes inhibent la réponse inflammatoire quelque soit l'agent phlogogène responsable entraînant une réduction de la vasodilatation et de l'œdème en diminuant le chimiotactisme et la migration leucocytaire vers le foyer inflammatoire. Cet effet est un phénomène qui nécessite de l'énergie. Cette énergie est apportée par la glycolyse aérobie. En diminuant l'entrée du glucose dans la cellule, la cortisone abaisse la réponse aux facteurs chimiotactiques.

Le métabolisme oxydatif des mitochondries est diminué, il s'en suit une baisse de l'activité de phagocytose. Elle empêche la libération des enzymes protéolytiques et leur action inflammatoire par stabilisation des membranes lysosomiales (polynucléaires et macrophages). Par inhibition de la lipase, il en résulte une diminution de la biosynthèse des prostaglandines. Ces médicaments agissent sur la réaction inflammatoire sans en supprimer la cause.

III.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Ils forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent tels que les manifestations rhumatismales, les stomatites, les inflammations génito-urinaires.

Une particularité de cette classe de médicaments est que tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens possèdent à des degrés divers des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase empêchant ainsi la formation des médiateurs de l'inflammation.

*Chapitre IV:
Physiologie de
La Douleur*

VI.1. Définition

L'Association International pour l'étude de la douleur (IASP) définit la douleur comme une « *expérience sensorielle et émotionnelle, désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion* » **(Merskey & Bogduk, 1994) in (Matillon, 1999)**. Cette définition a été retenue par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) **(OMS, 1990 & WHO, 1992) in (Matillon, 1999)**.

VI.2. Mécanisme

La transmission douloureuse est un phénomène complexe impliquant des mécanismes électrophysiologiques et neurochimiques, où 03 étapes vont se succéder :

- l'élaboration de l'influx au niveau du nocicepteur (récepteur nerveux assurant la transmission des stimulations produisant de la douleur) et sa transmission dans la fibre nerveuse périphérique
- le relais et la modulation au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (transmission de l'influx, blocage ou amplification, convergence des différents influx)
- l'intégration au niveau du cerveau qui le transforme en message conscient : sensation douloureuse avec une composante sensori-discriminative (intensité, localisation, durée du stimuli nociceptif), et une composante émotionnelle et affective désagréable. **(Payen, 2002)**.

VI.3. Différents types de douleur :

En physiopathologie, on peut classer la douleur en trois catégories **(Vanhalewyn & Cerexhe, 2004)** :

VI.3.1. La douleur physiologique

La nociception, est une fonction biologique du système nociceptif dont le rôle est de préserver l'intégrité corporelle. Sa réponse est immédiate, prévisible, reproductible et modulée par des contrôles descendants.

L'organisme est équipé d'une grande variété de nocicepteurs c'est-à-dire des récepteurs sensoriels capables d'encoder certains stimulus nocifs (*nocere* = nuire) et de l'informer (nociception) d'une menace réelle ou potentielle pour son intégrité corporelle ; Ces nocicepteurs primaires sont omniprésents et peuvent constituer entre 60% à 95% du contingent des fibres afférentes dans un nerf périphérique

L'activation brève et sélective des nocicepteurs A delta évoque typiquement une sensation de piquûre très localisée (encore appelée "douleur rapide" ou "douleur picritique") tandis que l'activation brève et sélective des nocicepteurs C évoque une sensation de brûlure diffuse (encore appelée "douleur lente" ou "protopathique") s'étendant bien au delà des limites spatiotemporelles du stimulus nociceptif. La plupart de ces nocicepteurs sont capables d'encoder des stimuli nocifs mécaniques, thermiques et chimiques (**Vanhalewyn & Cerexhe, 2004**).

VI.3.2. La douleur "inflammatoire"

La persistance du stimulus nocif et la réaction inflammatoire qu'il déclenche vont profondément modifier les caractéristiques opératoires de ce système nociceptif "physiologique" en créant un état de sensibilisation. Cet état est caractérisé par les signes cliniques suivants : Allodynie, Hyperalgésie primaire, Hyperalgésie secondaire, Hyperalgésie par sommation temporelle et Douleur spontanée.

Cette transformation du système nociceptif se réalise à travers une série de mécanismes périphériques et centraux de sensibilisation (potentialisation, désinhibition, plasticité de la connectivité neuronale, ...) plus ou moins réversibles avec des constantes de temps pouvant aller de quelques minutes à plusieurs mois (**Vanhalewyn & Cerexhe, 2004**).

VI.3.3. La douleur neuropathique

Lorsque le système nociceptif, périphérique ou central, fait lui-même l'objet d'une agression, d'autres phénomènes pathologiques vont se manifester. Ils apparaissent souvent avec une latence de plusieurs semaines (voire des mois) par rapport à la lésion initiale. Ils sont groupés sous l'entité "douleur neuropathique". Ces douleurs neuropathiques sont le plus souvent décrites comme des sensations de brûlures associées ou non, à des phénomènes paroxystiques, ressenties comme des décharges électriques ou des éclairs douloureux.

Elles sont fréquemment associées à des perturbations du système neurovégétatif, en particulier sympathique, responsables de troubles vasomoteurs et trophiques cutanées. Les dysfonctionnements qui résultent des transformations neuropathiques du système nociceptif n'ont pas de finalité biologique évidente (**Vanhalewyn & Cerexhe, 2004**).

VI.4. Les Antalgiques

Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments qui suppriment ou atténuent la douleur par action périphérique et / ou centrale, sans provoquer une perte de conscience.

Les analgésiques sont généralement répartis en deux classes (**Aouissa, 2002**) :

VI.4.1. Les analgésiques morphiniques (à opium)

L'analgésie morphinique est sélective. Elle supprime les sensations douloureuses, sans altérer les autres sensations en préservant l'état de conscience. Autrement dit, elle augmente le seuil de perception de tous les stimuli douloureux. La durée et l'intensité de l'analgésie sont en rapport direct avec la voie d'administration, la sensibilité individuelle et la dose (au delà d'un seuil les effets toxiques sont majorés).

La morphine soulage bien les douleurs sourdes (contusion, fractures), les douleurs viscérales et les douleurs aiguës.

VI.4.2. Les analgésiques non morphiniques

Les analgésiques non morphiniques sont soit seulement sédatifs de la douleur, on les appelle encore antalgiques purs; soit à la fois antalgiques et antipyrétiques ou anti-inflammatoires. Ces médicaments ont une action analgésique beaucoup moins forte que celle des analgésiques centraux comme la morphine. Leurs effets analgésiques se manifestent dans les douleurs peu intenses (céphalées, névralgie, arthralgie, maux de dents...).

Partie
Expérimentale

*I/Matériel
& Méthodes*

I. Matériel et méthodes

I.1. Préparation de la poudre végétale

I.1.1. Récolte du matériel végétal

Les trois parties de *Thapsia garganica* (racines, feuilles et fleurs) (Figure 2) ont été récoltées dans la région de Toudja de la wilaya de Béjaia, loin de tout impact de pollution. Les racines et les feuilles ont été récoltées au mois de mars et les fleurs au mois de mai de l'année 2009.

Le choix de cette plante fut basé sur son utilisation en cuisine et en médecine traditionnelle algérienne.

Après la récolte, la plante a été identifiée au laboratoire de physiologie végétale et d'écologie de l'université de Béjaia en utilisant la flore d'Algérie de **Quezel et Santa (1963)**.

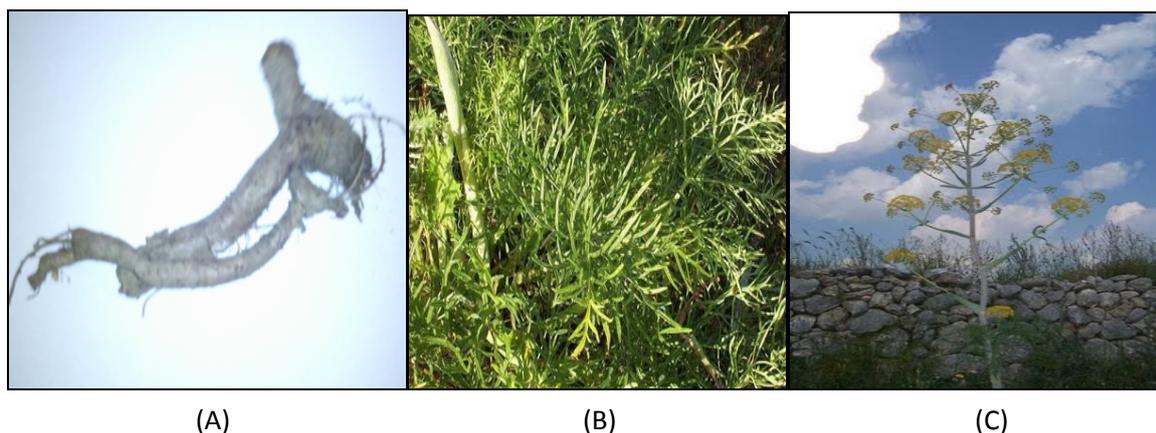


Figure 2 : Photographies des parties étudiées de *Thapsia garganica* A) Racines. B) Feuilles. C) Fleurs

I.1.2. Séchage et broyage

Après la récolte, les différentes parties ont été lavées et mises à sécher dans un endroit sec, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La matière sèche obtenue est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique. Cette dernière a été conservée dans des bocaux en verre fermés et stockés à l'abri de la lumière.

I.2. Test d'humidité

I.2.1. Principe de la méthode

La teneur en humidité de la poudre végétale est déterminée selon la méthode d'**Amadou (2004)** qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve à 103 ± 2 °C. Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité \%} = [(P_i - P_f)/P_i] \times 100$$

Où :

P_i : poids initial de la prise d'essai

P_f : Poids final

I.2.2. Mode opératoire

Cinq prises d'essai d'une quantité de 2 g chacune de poudre végétale ont été introduites dans l'étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à stabilisation du poids.

I.3. Préparations des extraits

I.3.1. Extraction des composés phénoliques

Le procédé d'extraction utilisé est préconisé par **Djeridane & al. (2006)** ; **Djeridane & al. (2007)** selon le protocole schématisé dans la figure 3

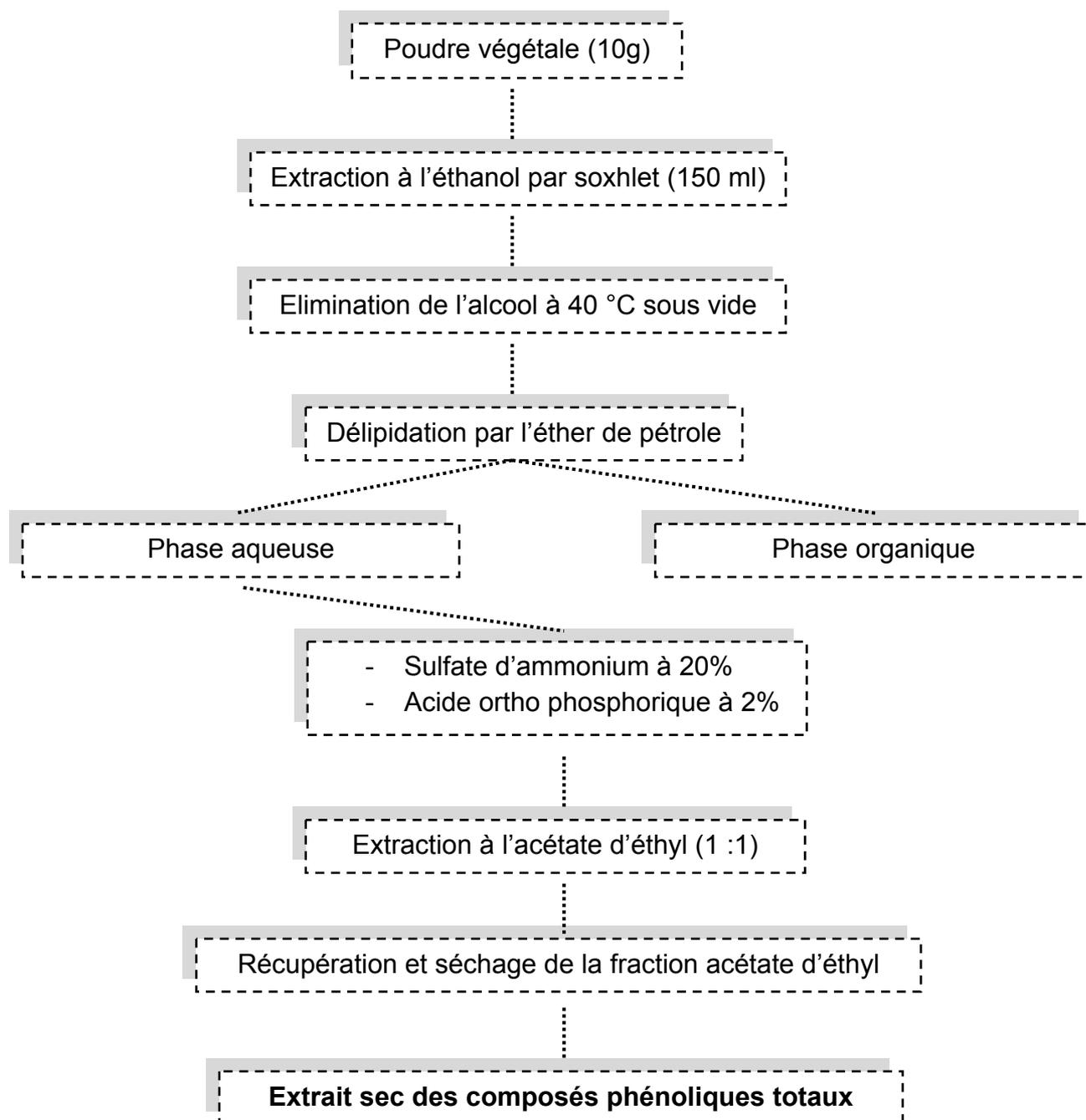


Figure 3 : Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux
Djeridane & al. (2006) ; Djeridane & al. (2007)

I.4. Dosage des différents groupes de composés phénoliques

Pour tous les dosages, l'extrait sec est reconstitué dans du méthanol.

Pour tous les dosages, le blanc est préparé selon le même protocole que l'extrait sauf que ce dernier est remplacé par du méthanol.

I.4.1. Dosage des composés phénoliques totaux

* Principe de la méthode

Le principe repose sur l'interaction des groupements hydroxyles des composés phénoliques avec le réactif de Folin Ciocalteu entraînant la formation d'un complexe de couleur bleue, présentant un maximum d'absorption aux environs de 760 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques (Padda, 2006).

* Mode opératoire

La teneur des extraits en composés phénoliques totaux est estimée selon la méthode de Lister & Wilson (2001) in Djeridane *et al.* (2006) avec modification comme suit :

0,1 ml d'extrait est additionné de 0,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (10 %) et de 1 ml d'eau distillée. Après 1 minute d'incubation, le mélange est additionné de 1,5 ml de carbonate de sodium à 2%. Ce mélange est ensuite incubé pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité, puis l'absorbance est déterminée à 760 nm contre un blanc.

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol.

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 100g de poids sec.

I.4.2. Dosage des flavonoïdes

* Principe de la méthode

Le dosage des flavonoïdes repose sur leur aptitude à chélater les métaux (fer et aluminium), cette propriété est propre aux groupements hydroxyles des phénols flavonoïdes capables de donner un complexe en présence d'aluminium, utilisé dans notre protocole sous forme de chlorure d'aluminium (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

* Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode de **Custódio et al. (2009)**. Elle consiste à mélanger 1,5 ml d'extrait et 1,5 ml de chlorure d'aluminium à 2% dans du méthanol. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 10 -15 minutes puis l'absorbance a été déterminée à 430 nm contre un blanc.

Les concentrations en flavonoïdes, sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage, obtenue à différentes concentrations de quercétine dans du méthanol. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de quercétine par 100g de poids sec.

I.4.3. Dosage des anthocyanines

* Principe de la méthode

Les anthocyanines sont des pigments dont la couleur varie en fonction de l'acidité, cette propriété est utilisée pour leur dosage. En effet, à pH 1 ils sont sous forme colorée (Oxonium ou flavylum) et à pH 4,5 sous forme incolore (carbinol) (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

* Mode opératoire

La teneur en anthocyanines a été déterminée selon la méthode du pH différentiel de **Cheng & Breen (1991) in Iqbal et al. (2007)**.

Pour cela, deux solutions ont été préparées, le chlorure de potassium (KCl à 0,2 M ; pH 1) et l'acétate de sodium (CH₃-COONa à 0,2 M ; pH 4,5).

Un volume de 0,5 ml d'extrait a été additionné de 2,5 ml de solution tampon correspondante.

L'absorbance des préparations a été déterminée à deux longueurs d'ondes 510 et 700 nm contre un blanc.

L'absorbance qui correspond aux anthocyanines est déterminée comme suit :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4,5}}$$

La concentration des échantillons en anthocyanines est calculée comme suit :

$$\% \frac{w}{w} = \frac{A}{\epsilon L} \times MM \times FD \times \frac{V}{M} \times 100$$

Où : A : Absorbance

ϵ : Coefficient d'absorbance molaire du Cyanidine-3-glucoside (26 900)

MM : Masse moléculaire du Cyanidine-3-glucoside (449,2)

FD : Facteur de dilution

V : Volume final

M : Masse de l'échantillon

L : Longueur de la cuve (1 cm)

I.4.4. Dosage des tannins condensés

* Principe de la méthode

Le dosage des tannins condensés utilise la méthode de la vanilline acidifiée, dont le principe repose sur la réactivité des sommets nucléophiles des tannins avec la vanilline (aldéhyde phénolique), qui est sous forme protonée en milieu acide. La méthode est fondée sur la dépolymérisation acide et la formation d'anthocyanines de couleur rouge avec un maximum d'absorbance à 500 nm (**Nakatsubo et al., 2002**).

* Mode opératoire

La teneur en tannins condensés (proanthocyanidines) est déterminée selon la méthode de **Porter (1989)** rapportée par **Morais et al. (1999)**.

1ml d'extrait a été additionné de 2 ml de vanilline fraîchement préparée (1% dans une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 70%). Le mélange a été incubé pendant 15 minutes puis l'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc.

Les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée à différentes concentrations de l'acide tannique dans du méthanol.

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide tannique dans 100g de poids sec.

I.5. Evaluation de l'activité antioxydant

Pour toutes les activités, l'extrait sec est reconstitué dans du méthanol et préparé à différentes concentrations.

Pour toutes les activités, le blanc est préparé selon le même protocole que l'extrait sauf que ce dernier est remplacé par du méthanol.

I.5.1. Pouvoir réducteur

*** Principe de la méthode**

Le principe de la méthode utilisée repose sur la réduction du chlorure ferrique en chlorure ferreux, en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium et en milieu acidifiée par l'acide trichloroacétique. Le complexe formé est de couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur (**Gulçin et al., 2005**)

*** Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode d'**Oyaizu (1986)** in **Ferreira et al. (2005)** modifiée.

Un volume de 2,5 ml d'extrait, à différentes concentrations, est additionné de 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et de 2,5 ml de ferricyanure de potassium (($K_3Fe(CN)_6$) à 1%). Après agitation, le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA à 10%) sont ajoutés. A partir de ce mélange, 5 ml sont prélevés dans un autre tube et sont additionnées de 5 ml d'eau distillée et 1 ml de chlorure ferrique ($FeCl_3$ à 0,1%). L'absorbance du mélange est mesurée à 700 nm contre un blanc.

I.5.2. Activité « scavenging » du radical DPPH

* Principe de la méthode

L'évaluation de l'effet anti radicalaire des extraits à l'égard du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) repose sur la décoloration de ce dernier (de couleur violette en couleur jaune) lorsque son électron célibataire est apparié avec un hydrogène provenant d'un antioxydant. L'intensité de la décoloration est inversement proportionnelle à la concentration d'antioxydant et au temps de la réaction (Molyneux, 2004).

* Mode opératoire

1,5 ml d'extrait méthanolique, à différentes concentrations, sont additionnés à 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH à 0,008%. Après 20 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est déterminé à 517 nm (Pandey *et al.*, 2005).

Le pourcentage « scavenging » est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Scavenging du radical DPPH} = [(A_b - A_s) / A_b] * 100$$

A_b : Absorbance du blanc (l'extrait est remplacé par le méthanol).

A_s : Absorbance de l'extrait.

I.6. Evaluation de la toxicité

Les tests de toxicité ont été effectués sur la poudre végétale des parties de *Thapsia garganica* (racines, feuilles et fleurs) préparées sous forme d'infusion.

I.6.1. Toxicité aiguë par voie orale

La toxicité aiguë a été déterminée selon la méthode préconisée par l'article de l'OCDE n° 425 (2008), Miller & Tainter (1944) et J.O.C.E. (1992) Cités dans le manuel de Saïdal (CRD) et Veerappan *et al.* (2007)

* Principe de la méthode

La méthode consiste en l'administration de doses croissantes des extraits de *Thapsia garcanica*, préparées sous forme d'infusion, à plusieurs lots d'animaux de laboratoire répartis de façon homogène et d'observer les effets toxiques.

* Mode opératoire

Quatre doses de chaque partie de la plante 1, 2 , 5 et 10 g/Kg ont été administrées, sous forme d'infusion (1ml), par voie orale (figure 4) à des lots (chaque lot est composé de 5 individus) de souris femelles du type NMRI, pesants 20 ± 2 g mises à jeun la veille du test. Les animaux sont maintenus à jeun pendant les 3 à 4 heures qui suivent l'administration. Un dernier lot a été constitué pour recevoir le même volume d'eau physiologique, il servira de témoin.

Les effets toxiques et la mortalité sont observés pendant 48 heures.



Figure 4 : Photo d'administration des solutions par voie orale chez la souris

I.6.2. Toxicité subaiguë par voie orale

La toxicité subaiguë a été déterminée selon les méthodes de l'article de l'OCDE n °407 (2008) et Veerappan *et al.* (2007).

*** Principe de la méthode**

Le principe consiste à administrer une dose extrapolée à partir des résultats du test limite de toxicité aiguë (1/10 de la dose du dernier essai limite), chaque jour pendant 14 jours, et cela pour les trois parties de la plante préparée sous forme d'infusion.

*** Mode opératoire**

La dose de 1g/Kg est administrée à chaque lot correspondant de rats du type Wistar (figure 5 et 6). La veille du quinzième jour, les animaux sont mis à jeun, le matin les animaux sont soumis à des prélèvements sanguins.



Figure 5 : Photo de la contention manuelle du rat



Figure 6 : Photo d'administration des solutions par voie orale chez le rat

Prélèvement

Les rats sont légèrement anesthésiés en les mettant dans un cristalloir contenant du coton imbibé d'éther. Ensuite, on extériorise l'œil et on lui insère l'extrémité du capillaire dans le canthus médial de l'œil sous le globe oculaire en faisant une rotation capillaire jusqu'au tube hépariné (figure 7). Pour mettre fin au saignement, il faut refermer l'œil et essuyer avec de la gaze (**Anonyme I**).

Les tubes sont centrifugés à une vitesse de 4 000 tour/min pendant 5 minutes, puis le surnageant (plasma) est récupéré dans des tubes eppendorfs pour les dosages biochimiques (**Anonyme II**).



Figure 7 : Photo du prélèvement oculaire chez le rat

Dosages biochimiques

a) Urée sanguine

La détermination du taux d'urée dans le sang est réalisée selon la méthode de **Fawcett & Scott (1960)** et de **Patton & Crouch (1977)**.

* Principe de la méthode

La méthode est colorimétrique, basée sur l'interaction des salicylates et l'hypochlorite contenu dans les réactifs avec les ions ammonium pour former un complexe vert (2.2 dicarboxylindophenol).

* Mode opératoire

La procédure consiste en la mise en place de trois préparations comme suit :

- Le blanc : 1 ml du réactif (R1) contenant le tampon phosphate (120 mmol/l, pH 7) et l'uréase
- 10 µl d'échantillon (plasma) additionnés de 1 ml du réactif R1
- 10 µl du standard (urée) additionnés de 1 ml du réactif R1

Les préparations sont mélangées et incubées à 37°C pendant 3 min, puis sont additionnées de 200 µl d'hypochlorite de sodium (18 mmol/l) et incubées à 37°C pendant 5 min. L'absorbance est déterminée pour le standard et l'échantillon contre le blanc à 600 nm.

La concentration de l'urée est donnée par la formule suivante :

$$[\text{Urée}] \frac{\text{g}}{\text{l}} = \frac{A \text{ échantillon}}{A \text{ standard}} \times [\text{Concentration Standard}]$$

b) Créatinine sanguine

La détermination du taux de créatinine dans le sang est réalisée selon la méthode de **Bartels et al., (1972)**.

* Principe de la méthode

La méthode est basée sur le fait que la créatinine, en milieu alcalin réagit avec l'acide picrique pour former un complexe coloré. La quantité du complexe formé est directement proportionnelle à la concentration de la créatinine.

* Mode opératoire

0,1 ml d'échantillon (plasma) et 0,1 ml du standard (créatinine à 177µmol/l) sont additionnés respectivement de 1 ml du réactif contenant de l'acide picrique (35mmol/l) et de l'hydroxyde de sodium (0,32 mol/l). Les préparations sont mélangées, puis les absorbances sont déterminées à 492 nm comme suit :

- Après 30 sec, on lit A_1 (standard et échantillon).
- 2 minutes plus tard, on lit A_2 (standard et échantillon).

La concentration de la créatinine est déterminée comme suit :

- La différence des absorbances : $A_2 - A_1 = \Delta A$ (standard et échantillon).
- La concentration est déterminée comme suit :

$$\text{La concentration de la créatinine} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = \frac{\Delta A \text{ échantillon}}{\Delta A \text{ standard}} \times 2$$

c) Bilirubine

La détermination du taux de bilirubine dans le sang est réalisée selon la méthode de **Jendrassik & Gróf (1938)**.

* Principe de la méthode

La méthode utilisée est colorimétrique, elle repose sur la capacité de la bilirubine directe (conjuguée) de réagir avec l'acide sulphanique en milieu alcalin, pour donner un complexe de couleur bleue ; alors que la bilirubine totale réagit avec la caféine dans le même milieu.

* Mode opératoire

1- Bilirubine totale

Pour l'échantillon : 200 µl de plasma sont additionnés de 200 µl d'acide sulphanique (29 mmol/l), 50 µl de nitrite de sodium (38,5 mmol/l) et de 1 ml de caféine (0,26 mmol/l).

Pour le blanc : 200 µl de plasma sont additionnés de 200 µl d'acide sulphanique (29 mmol/l) et de 1 ml de caféine (0,26 mmol/l).

Les deux préparations sont incubées à 20-25°C pendant 10 min , puis sont additionnées respectivement de 1 ml chacune de tartrate (0,93 mol/l). L'absorbance est déterminée à 578 nm après 5-30 min d'incubation à 25°C.

La concentration est donnée par la formule suivante :

$$[\text{Bilirubine totale}] \mu\text{mol/l} = 185 \times A_{\text{échantillon}}$$

2- Bilirubine conjuguée

Pour l'échantillon : 200 µl de plasma sont additionnés de 200 µl d'acide sulphanique (29 mmol/l), 50 µl de nitrite de sodium (38,5 mmol/l) et de 2 ml de NaCl (0,9 %).

Pour le blanc : 200 µl de plasma sont additionnés de 200 µl d'acide sulphanique (29 mmol/l) et de 2 ml de NaCl (0,9 %).

Les absorbances sont déterminées à 546 nm après 10 min d'incubation à 20-25°C.

La concentration est donnée par la formule suivante :

$$[\text{Bilirubine conjuguée}] \mu\text{mol/l} = 246 \times A_{\text{échantillon}}$$

3- Bilirubine non conjuguée

Le taux de la bilirubine est déterminé selon la formule suivante :

$$[\text{Bilirubine non conjuguée}] = [\text{Bilirubine totale}] - [\text{Bilirubine conjuguée}]$$

d) Alanine amino-transférase

La détermination du taux de l'Alanine amino-transférase dans le sang utilise la méthode de **Murray (1984a)**.

* Principe de la méthode

La méthode repose sur le transfert d'un groupement amine de l'alanine sur l' α -cétoglutarate par l'alanine aminotransférase, produisant du glutamate et du pyruvate. Ce dernier sera catalysé, avec le NADH, par la lactate deshydrogénase pour donner du lactate et du NAD⁺.

La vitesse d'oxydation du NADH est mesurée par spectrophotométrie, et est directement proportionnelle à l'activité enzymatique.

* Mode opératoire

0,1 ml d'échantillon (plasma) est additionné de 1 ml de réactif (L-alanine, l' α -cétoglutarate, NADH, lactate deshydrogénase et tampon tris). Les absorbances sont déterminées à 340 nm au moment 0 et après 1, 2 et 3 minutes.

Les différences des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$) sont calculées comme suit :

$$A_3 - A_2, A_2 - A_1, A_1 - A_0.$$

Par suite, on calcule la moyenne des différences des absorbances par minute $\Delta \text{Abs}/\text{min}$.

La concentration de l'ALT est déterminée par la formule suivante :

$$[\text{ALT}] \text{ U/l} = 1750 \times \Delta \text{Abs}/\text{min}$$

e) Aspartate amino-transférase

La détermination du taux de l'Aspartate amino-transférase dans le sang utilise la méthode de **Murray (1984b)**.

*** Principe de la méthode**

La méthode repose sur le transfert d'un groupement amine de l'aspartate sur l' α -cétooglutarate par l'aspartate aminotransférase, produisant du glutamate et de l'oxaloacetate. Ce dernier sera catalysé, avec le NADH, par la malate deshydrogénase pour donner du malate et du NAD⁺.

La vitesse d'oxydation du NADH est mesurée par spectrophotométrie, et est directement proportionnelle à l'activité enzymatique.

*** Mode opératoire**

0,1 ml d'échantillon (plasma) est additionné de 1 ml de réactif (L-aspartate, l' α -cétooglutarate, NADH, lactate deshydrogénase, malate deshydrogénase et tampon tris). Les absorbances sont déterminées à 340 nm au moment 0 et après 1, 2 et 3 minutes.

Les différences des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$) sont calculées comme suit :

$$A_3 - A_2, A_2 - A_1, A_1 - A_0.$$

Par la suite, on calcule la moyenne des différences des absorbances par minute $\Delta \text{Abs}/\text{min}$.

La concentration de l'ALT est déterminée par la formule suivante :

$$[\text{ALT}] \text{ U/l} = 1750 \times \Delta \text{Abs}/\text{min}$$

f) Phosphatase alcaline

La détermination du taux de la phosphatase alcaline dans le sang est réalisée selon la méthode de **Bowers & McComb (1975)**.

*** Principe de la méthode**

Le substrat p-nitrophenyl phosphate est hydrolysé par la phosphatase alcaline de l'échantillon, en présence d'ions de magnésium, pour former le p-nitrophenol de couleur jaune visible à 405 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline.

*** Mode opératoire**

0,02 ml d'échantillon sont additionnés de 1 ml de réactif contenant du p-nitrophenylphosphate (16 mmol/l), du 2-amino-2-méthyl-1-propanol (0,9mol/l, pH 10,5) et des ions de Magnésium (1,0 mmol/l). Les absorbances sont déterminées à 405 nm au moment 0 et après 1, 2 et 3 minutes.

Les différences des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$) sont calculées comme suit :

$$A_3 - A_2, A_2 - A_1, A_1 - A_0.$$

Par la suite, on calcule la moyenne des différences des absorbances par minute.

La formule qui donne la concentration de la phosphatase alcaline est comme suit :

$$\frac{[\text{PAL}]U}{I} = \left(\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \right) \times \frac{\text{Volume total de l'essai} \times 1000}{E \times \text{chemin optique} \times \text{volume de l'échantillon}}$$

Où : $\Delta \text{Abs}/\text{min}$: Moyenne des différences des absorbances par minute.

E : Coefficient d'absorbance molaire du p-nitrophenol = 18,6 cm²/μmol

1000 : facteur de conversion du ml au L.

Chemin optique : 1 cm.

I.7. Détermination de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été déterminée selon la méthode de **Colot (1972)** Citée dans le manuel de Saïdal (CRD) (**Anonyme III**).

Le principe du test de Levy est de déterminer l'aptitude du produit testé à réduire l'inflammation causée par la carragénine.

Constituer 5 lots de 5 souris du type NMRI.

A Temps = T₀ administrer aux 5 lots les suspensions comme suit :

Lot témoin : 1 ml eau physiologique.

Lot n° 1 : 1 ml de l'infusion de racine à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 2 : 1 ml de l'infusion de feuille à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 3 : 1 ml de l'infusion de fleur à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 4 : 1 ml d'acide acétylsalicylique à une concentration de 0,1 g/Kg.

A temps = $T_0 + 30$ mn

On injecte à tous les animaux la solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche (figure 8) sous un volume de 0,025 ml.



Figure 8 : Photo d'injection de la carragénine

A temps = $T_0 + 4$ heures

Les animaux sont sacrifiés en les mettant dans un cristalliseur contenant du coton imbibé d'éther. Ensuite, les pattes postérieures sont coupées à hauteur de l'articulation (figure 9), puis elles sont pesées sur une balance analytique.



Figure 9 : Photo du découpage de la patte

Les résultats sont exprimés après calcul de la moyenne arithmétique des poids des pattes gauches et des pattes droites et calcul du pourcentage d'œdème par la formule suivante :

$$\% \text{œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids des pattes gauches} - \text{Moyenne des poids des pattes droites}}{\text{Moyennes des poids des pattes droites}} \times 100$$

Le pourcentage de réduction de l'inflammation est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction d'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème du lot d'essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}}$$

I.8. Détermination de l'activité antalgique

L'activité antalgique a été déterminée selon la méthode de **Vogel & Vogel (1997)** Citée dans le manuel de Saïdal (CRD) (**Anonyme IV**).

La méthode utilisée est celle du Writing test dont le principe consiste à déterminer l'aptitude du produit à tester à réduire les effets de l'acide acétique, soit jouer le rôle d'un antalgique.

5 lots de 5 souris du type NMRI sont utilisés, ces dernières sont à jeun la veille du test.

Le jour du test :

A Temps = T₀ administrer aux 5 lots les suspensions comme suit :

Lot témoin : 1 ml eau physiologique.

Lot n° 1 : 1 ml de l'infusion de racine à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 2 : 1 ml de l'infusion de feuille à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 3 : 1 ml de l'infusion de fleur à une concentration de 2 g/Kg.

Lot n° 4 : 1 ml du paracétamol (matière active) à une concentration de 0,05 g /Kg.

A temps = T₀ + 30 mn

Les animaux reçoivent une injection de 0,2 ml d'acide acétique à 1% par voie intrapéritonéale.

A temps = $T_0 + 35$ mn

Le comptage du nombre de crampes (étirements des pattes postérieures) et de torsions de l'abdomen (figure 10) est effectué par observations directes des souris isolées chacune dans une cage.



Figure 10 : Photo de souris subissant une crampe

Les résultats sont exprimés comme suit :

Calculer la moyenne arithmétique du nombre des crampes pour chaque lot.

Calculer le pourcentage de réduction des crampes (de protection) chez les souris en utilisant la formule suivante :

$$\%Protection = \frac{\text{Moyenne des crampes du lot témoin} - \text{Moyenne des crampes du lot d'essai}}{\text{Moyenne des crampes du lot témoin}} \times 100$$

II/Résultats

&

Discussion

II.1. Taux d'humidité

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau des différentes parties de *Thapsia garganica* et d'évaluer l'efficacité du séchage.

Selon **Timbo (2003)** et **Amadou (2004)**, pour une bonne conservation de la poudre végétale, la teneur en eau doit être inférieure à 10%.

Les résultats du test d'humidité sont représentés dans la figure 11, et d'après cette dernière, les taux obtenus pour la poudre des racines, feuilles et fleurs sont inférieurs à 10%, donc sont aptes à être conservés sans altération. On note une teneur plus élevée dans les feuilles ($8,67\% \pm 0,20\%$) et des teneurs similaires entre les racines et les fleurs avec $7,12\% \pm 0,19\%$ et $7,59\% \pm 0,30\%$ respectivement.

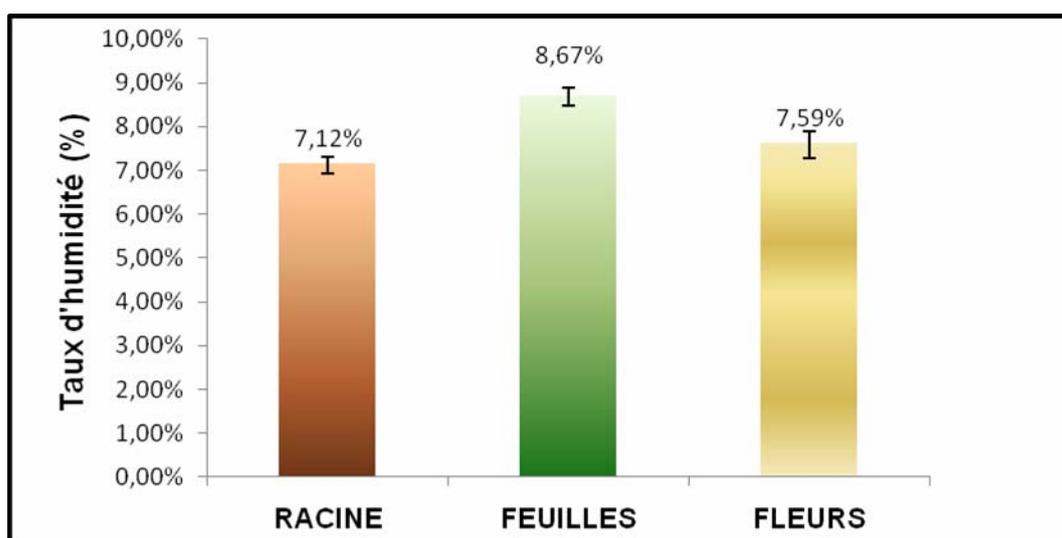


Figure 11 : Taux d'humidité des trois parties de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=5) avec \pm l'écartype.

II.2. Dosage des différents groupes de composés phénoliques

II.2.1. Les composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques se caractérisent par une grande diversité structurale permettant d'avoir une grande variabilité des caractères physico-chimiques et une multitude de méthodes d'extraction et d'isolement.

Dans la présente étude, le choix du solvant s'est porté sur le méthanol pur (100%).

La teneur en composés phénoliques de nos échantillons est déterminée à partir d'une courbe standard utilisant l'acide gallique comme étalon de référence (figure 12).

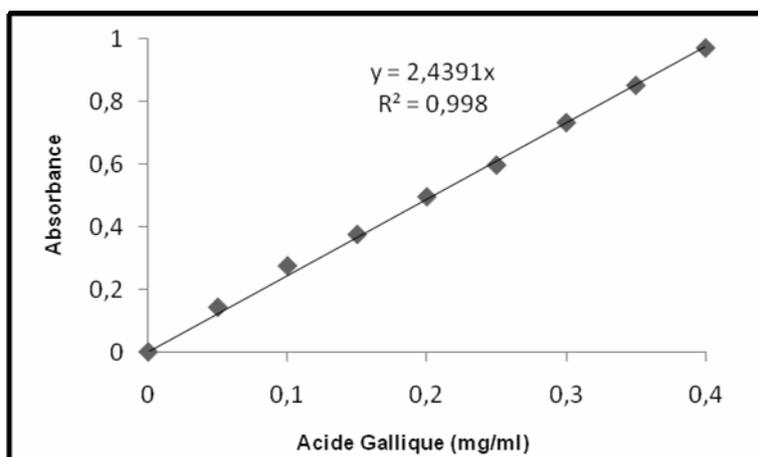


Figure 12 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux.

Les taux sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/100g poids sec (mg Eq AG/100g PS) et sont représentés dans la figure 13.

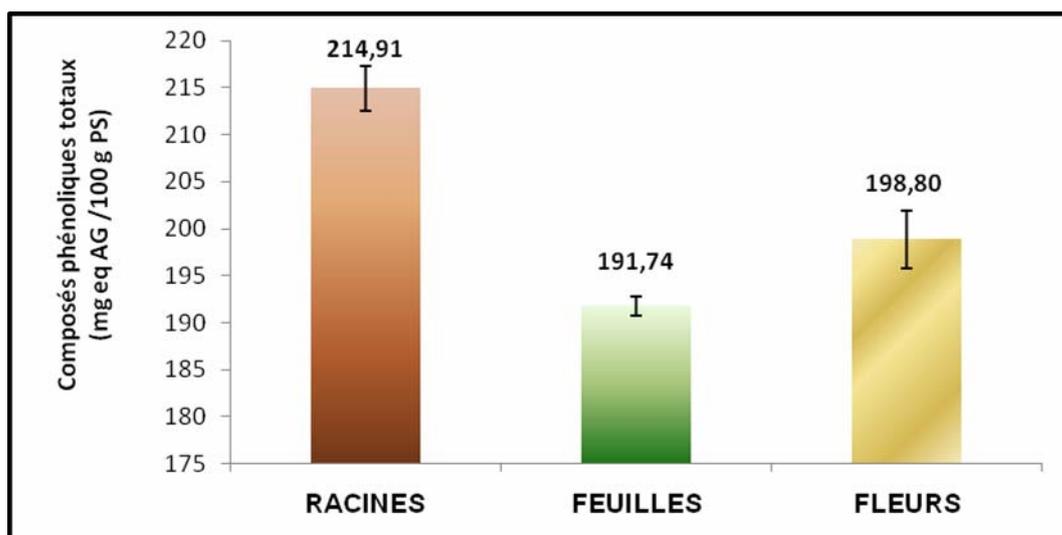


Figure 13 : Teneurs en composés phénoliques totaux des trois parties de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après les résultats obtenus, on constate que la teneur des racines de *Thapsia garganica* en composés phénoliques est de $214,91 \pm 2,33$ mg Eq AG/100g PS, cette dernière est supérieure comparativement aux teneurs des fleurs et des feuilles qui sont respectivement de $198,80 \pm 3,04$ et $191,74 \pm 1,03$ mg Eq AG/100g PS.

Les études de **Djeridane et ses collaborateurs** en **2006** et **2007** ont révélé des teneurs différentes qui sont respectivement de 763 et 250 mg Eq AG/100g PS, notons que la partie étudiée est la partie aérienne de la plante sans spécification des feuilles ou des fleurs.

Ces variations peuvent être expliquées par la variation de plusieurs facteurs comme l'environnement, le sol, le climat (**Shahid & Bhanger, 2006**), aussi par la méthode spectrale du dosage qui peut amener à une surestimation de la teneur en composés phénoliques totaux dans l'échantillon, cela est dû au chevauchement des réponses spectrales et aux interférents (**Naczka & Shahid, 2004**).

II.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus. Ils protègent l'organisme contre les dommages oxydatifs tels que les rayons ultraviolets, la pollution de l'environnement, les produits chimiques, etc. (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

La teneur en flavonoïdes des racines, feuilles et fleurs de *Thapsia garganica* est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (figure 14).

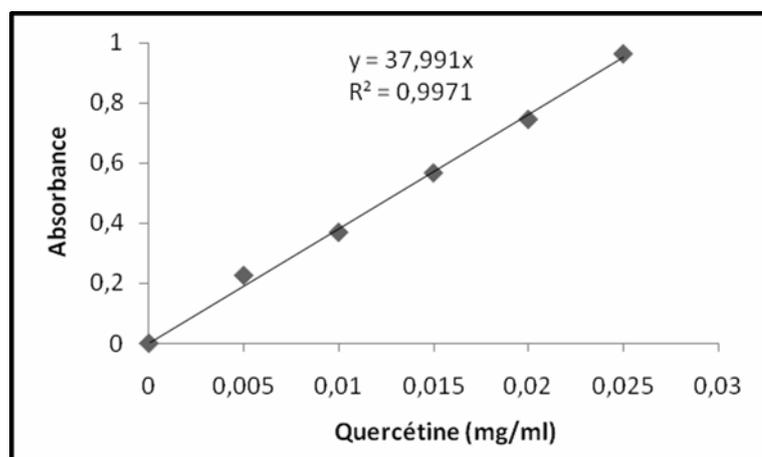


Figure 14 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Les teneurs sont exprimées en mg d'équivalent quercétine par 100 g de poids sec (mg Eq Qr/100g PS) et sont représentées dans la figure 15.

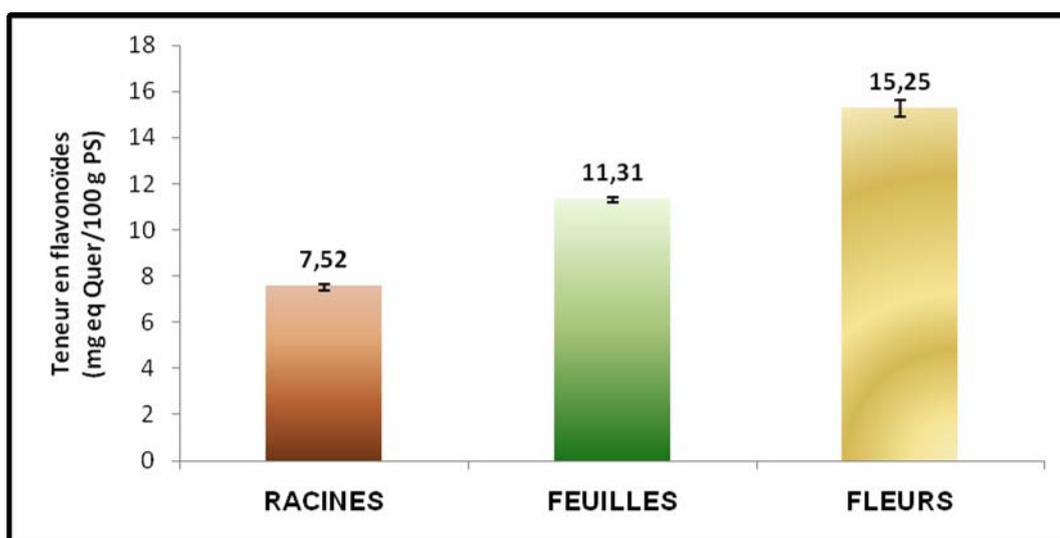


Figure 15 : Teneurs en flavonoïdes des trois parties de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

On constate, d'après les résultats obtenus, que la teneur en flavonoïdes varie du simple au double en allant des racines aux fleurs avec respectivement $7,52 \pm 0,12$ et $15,25 \pm 0,37$ mg Eq Qr/100g PS en passant par les feuilles avec une teneur de $11,31 \pm 0,11$ mg Eq Qr/100g PS.

Comparés aux résultats obtenus par **Djeridane *et al.***, en **2006** et **2007**, nos résultats sont largement inférieurs. En effet, lors de ces études les flavonoïdes représentaient 52,94% et 98% des composés phénoliques totaux des parties aériennes, alors que nos résultats révèlent des pourcentages de 3,49%, 5,89% et 7,67% des composés phénoliques totaux dans les racines, les feuilles et les fleurs respectivement.

Ne sachant pas précisément quelle partie de la plante a été étudiée par Djeridane et de ses collaborateurs, nous ne pouvons pas de faire une comparaison directe avec nos résultats.

La coloration jaune des fleurs explique le teneur élevée en flavonoïdes par rapport aux deux autres parties.

II.2.3. Les anthocyanines

Les flavonoïdes sont un des groupes les plus analysés des métabolites secondaires chez les plantes supérieures. La principale raison de l'intérêt pour les flavonoïdes, c'est qu'ils sont les principaux constituants des pigments végétaux, comme les anthocyanines, sous classe des flavonoïdes, qui sont d'un intérêt particulier en raison de leur capacité à conférer une coloration rouge, orange, bleue et pourpre aux feuilles, fleurs et fruits (**Mol *et al.*,1998**)

Les concentrations sont exprimées en mg Eq Cyanidine-3-glucoside/100g PS. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 16.

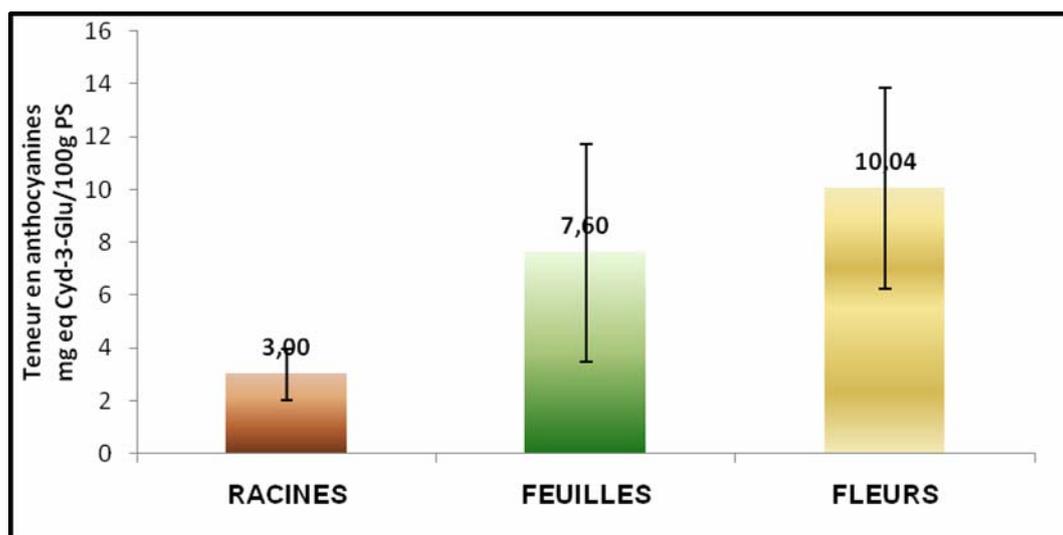


Figure 16 : Teneur en anthocyanines des trois parties de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

De ces résultats, il ressort que la teneur des échantillons analysés en anthocyanines est faible comparée à leur teneur en composés phénoliques totaux. En effet elles ne représentent que 1,39%, 3,96% et 5,05% des composés phénoliques totaux respectivement dans les racines, les feuilles et les fleurs. On note également une teneur plus élevée dans les fleurs avec $10,04 \pm 3,80$ mg Eq Cyd-3-Glu/100g PS comparée aux deux autres parties les feuilles et les racines avec $7,60 \pm 4,09$ et $3,00 \pm 0,98$ mg Eq Cyd-3-Glu/100g PS.

On note également que les anthocyanines sont les composés majoritaires des flavonoïdes dans les feuilles et les fleurs. En effet ils représentent 65,83% et 67,19% des flavonoïdes respectivement dans les fleurs et feuilles, alors qu'ils ne représentent que 39,89% des flavonoïdes dans les racines.

II.2.4. Les tannins condensés

Les tannins sont des métabolites secondaires dérivant des composés phénoliques, et des flavonoïdes, très répandus dans les végétaux où ils s'accumulent dans les organes et les tissus pour assurer la protection contre la prédation, en même temps ils sont responsables de l'astringence des fruits et participent à la détermination de la saveur des boissons, des jus de fruits et des thés (Khanbabaee & Ree, 2001).

La teneur en tannins condensés des racines, feuilles et fleurs de *Thapsia garganica* est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine (figure 17).

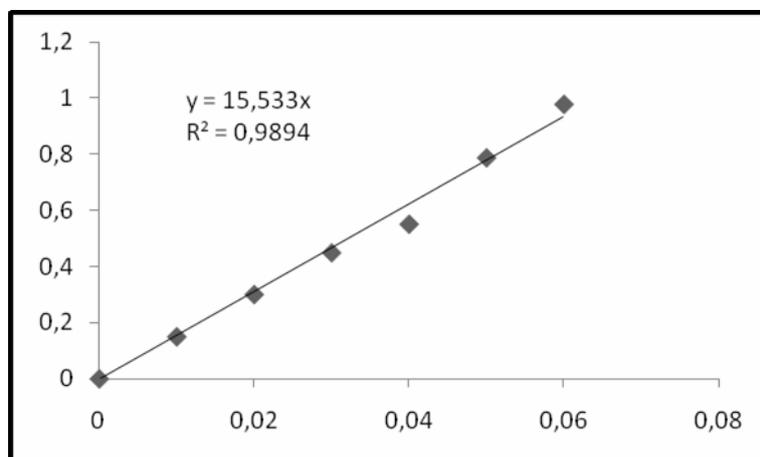


Figure 17 : Courbe d'étalonnage des tannins condensés.

Les teneurs sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par 100 g de poids sec (mg Eq Cat/100g PS) et sont représentées dans la figure 18.

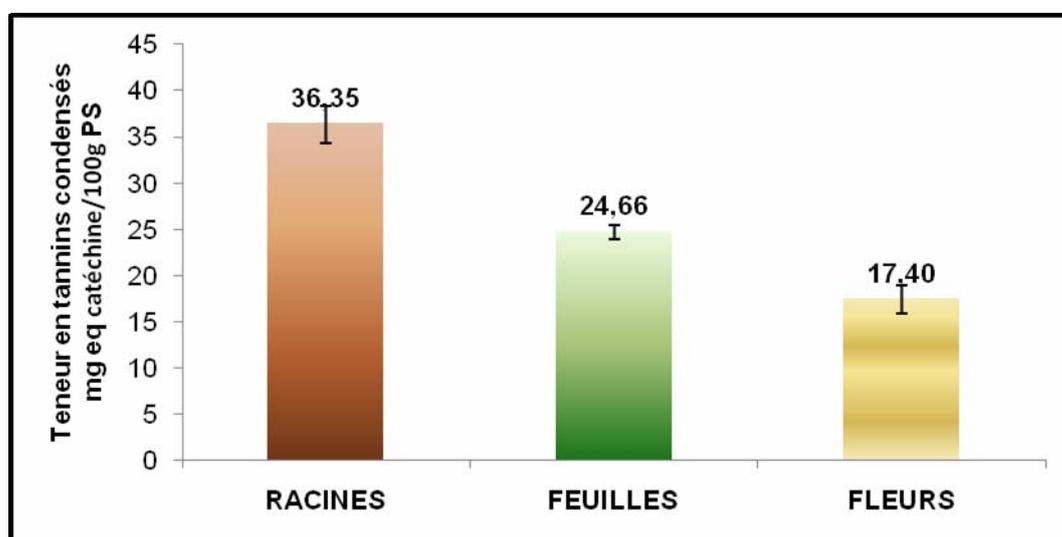


Figure 18 : Teneur en tannins condensés des trois parties de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Les résultats obtenus montrent que les tannins condensés sont le groupe majoritaire des composés phénoliques totaux analysés lors de cette étude avec des pourcentages de 16,91%, 12,86% et 8,75% respectivement dans les racines, les feuilles et les fleurs. En effet, on note une teneur plus élevée dans les racines avec une concentration de $36,35 \pm 2,02$ mg Eq Cat/100g PS suivies des feuilles et fleurs avec respectivement $24,66 \pm 0,80$ et $17,40 \pm 1,50$ mg Eq Cat/100g PS.

II.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité d'une substance à transférer un électron ou à donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai, nous mesurons ce potentiel réducteur à travers la réduction du complexe Fe^{3+} (du ferricyanure de potassium) en forme ferreuse Fe^{2+} qui se traduit par une coloration bleue. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Kranl *et al.*, 2005).

Les figures 19 et 20 montrent le pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse et de nos extraits respectivement.

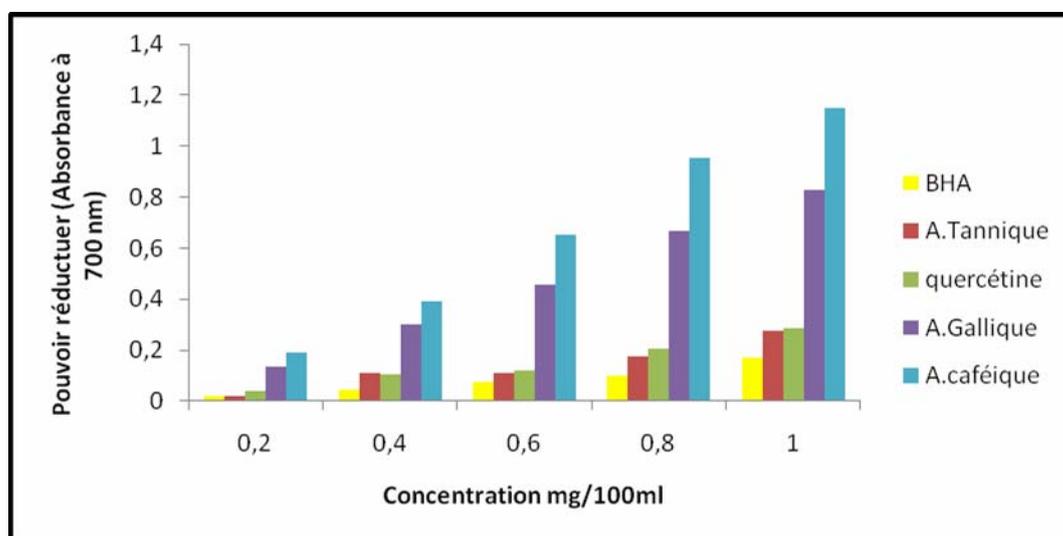


Figure 19 : pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse

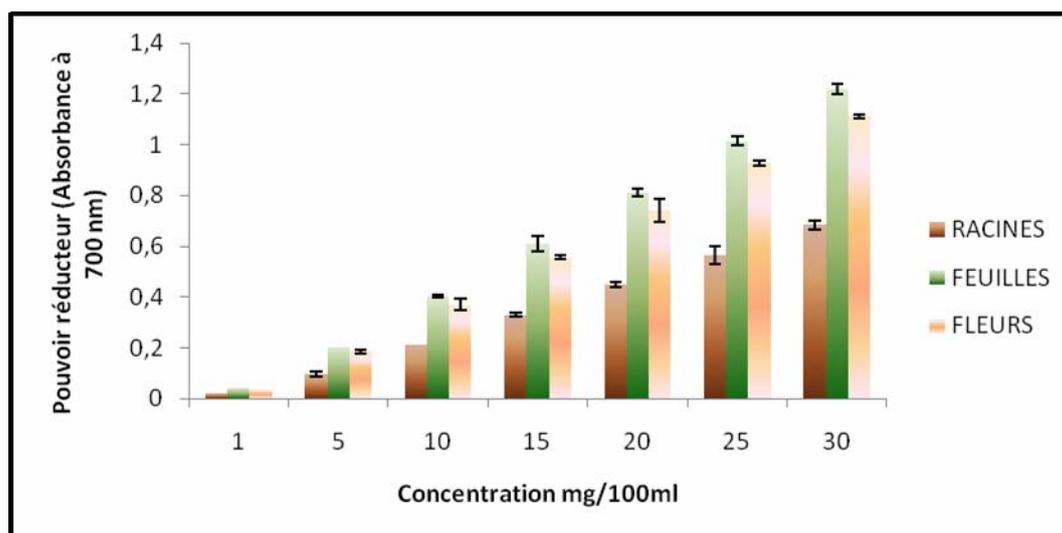


Figure 20 : pouvoir réducteur des extraits méthanoliques de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après les résultats obtenus, représentés dans les figures 19 et 20, le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration en antioxydants de synthèse et des extraits de notre plante.

Dans ce test, les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur diffère significativement ($P < 0,05$) entre nos extraits et les antioxydants de synthèse. A la concentration de 1mg/100ml, les standards employés dans notre étude présentent des absorbances allant de 0,276 à 1,148. Pour la même concentration (1mg/100ml), nos extraits absorbent moins (de 0,0022 à 0,0406) et par conséquent présentent un faible pouvoir réducteur comparativement aux antioxydants de synthèses.

Le potentiel réducteur observé dans ce test se classe dans l'ordre suivant :
Acide caféique > Acide gallique > Quercétine > Acide tannique > BHA > Extrait des feuilles de *Thapsia garganica* > Extrait des fleurs de *Thapsia garganica* > Extrait des racines de *Thapsia garganica*.

Pour nos échantillons, on remarque que les extraits des feuilles et des fleurs présentent une meilleure activité réductrice que l'extrait des racines. Quantitativement, les feuilles de notre plante présentent le plus faible taux de composés phénoliques (191,74 mg Eq AG/100g PS) avec la plus forte activité réductrice comparée aux deux autres parties (fleurs et racines).

Cela peut être expliqué par la richesse qualitative des feuilles en composés phénoliques les plus réactifs chimiquement.

La présence d'un seul groupement hydroxyle (acides hydroxycinnamiques) donne une action limitée. La présence de composés O-diphénols (acide caféique) augmente la capacité antioxydant en améliorant la stabilité du radical phenoxy ; aussi, la liaison glycosidique des O-diphénols diminue cette activité. Donc La nature et la concentration des antioxydants, la position des groupements hydroxyles et leur nombre contrôlent l'intensité du pouvoir réducteur (**Kranl et al., 2005**). Cette mesure permet une évaluation semi quantitative des composés participant à la réaction réductrice (**Ozturks et al., 2006**).

II.4. Activité « scavenging » du radical DPPH

L'évaluation de l'effet anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH est fréquemment utilisée pour étudier l'activité antioxydant *in vitro*. Cette méthode repose sur la capacité de piégeage du radical par les substances testées (**Szabo et al., 2007**).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH, des standards et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans les figures 21 et 22.

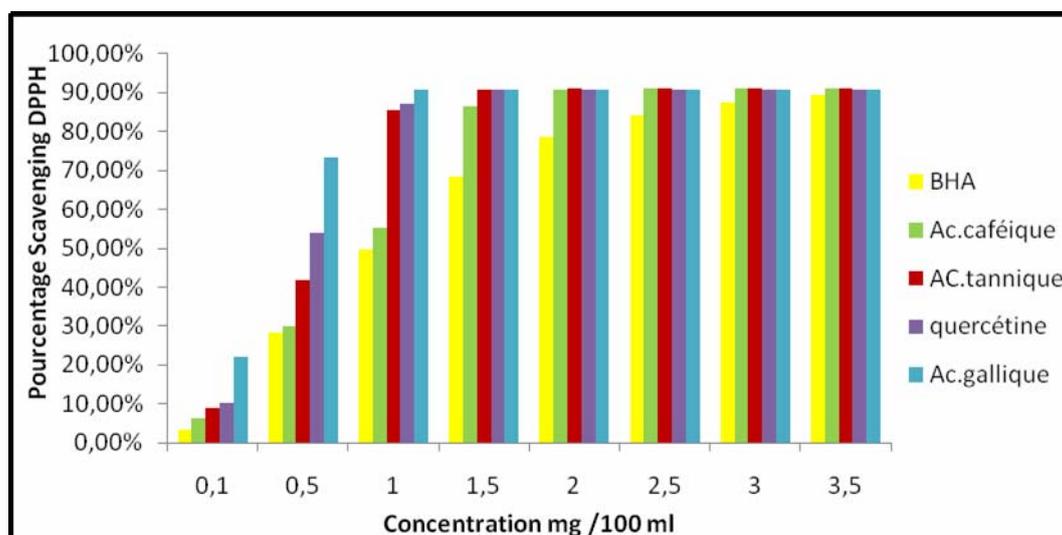


Figure 21 : Activité scavenging du radical DPPH par les antioxydants de synthèse

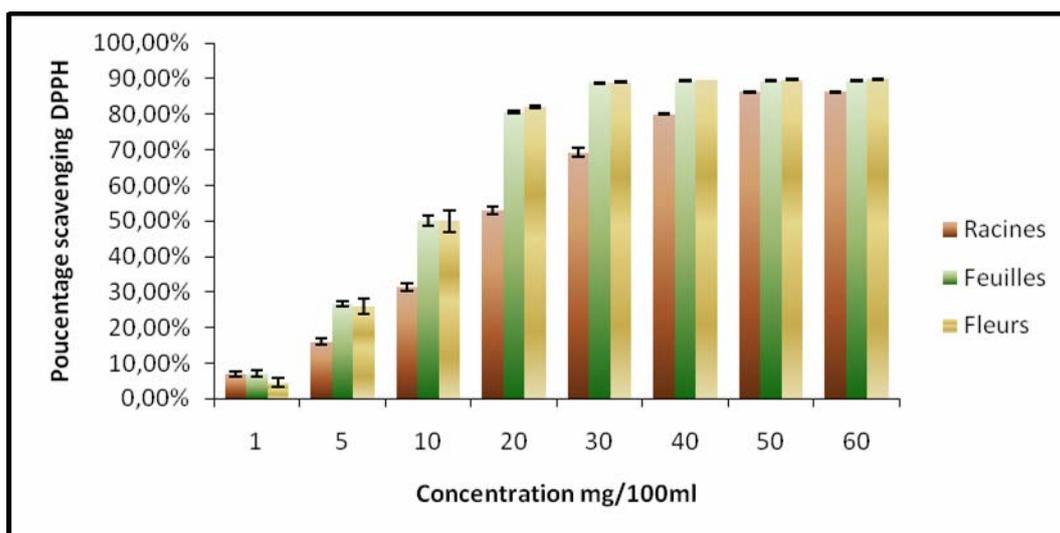


Figure 22 : Activité scavenging du radical DPPH par les extraits méthanoliques de *Thapsia garganica*.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après les résultats obtenus, on constate que l'activité anti-radicalaire augmente en fonction de la concentration.

Les standards employés présentent des pourcentages scavenging allant de 3,26% (BHA) à 91,23% (l'acide caféique) pour une gamme de concentrations de 0,1 mg/100ml à 3,5 mg/100ml.

Dans le cas de nos échantillons, l'effet scavenger varie de 6,87% à 86,23%, de 7,06% à 89,41% et de 4,48% à 89,83% pour les racines, feuilles et fleurs respectivement, pour des concentrations allant de 1mg/100ml à 60 mg/100ml.

Comme pour le pouvoir réducteur on note que les extraits des feuilles et des fleurs ont une meilleure activité comparés à l'extrait des racines, et que ces activités testées (pouvoir réducteur et DPPH) ne dépendent pas uniquement des effets de la concentration.

-Détermination des IC₅₀

Le paramètre IC₅₀ (Concentration inhibitrice à 50%) ou EC₅₀ (Efficient concentration) est défini comme étant la concentration du substrat qui entraîne une perte de 50% de l'activité. Les IC₅₀ de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Molyneux, 2004 ; Vilano et al., 2007).

Le tableau n° V regroupe les valeurs des IC₅₀ des standards et des extraits de *Thapsia garganica*.

Tableau n° V : IC₅₀ des extraits phénoliques de *Thapsia garganica* et des standards pour le DPPH

Substance	IC₅₀ (mg/100ml)
Extrait Racines	19,32
Extrait Feuilles	9,98
Extrait Fleurs	10,08
Acide gallique	0,32
Acide caféique	0,85
Acide tannique	0,67
Quercétine	0,45
BHA	1,03

Les valeurs des IC₅₀ obtenues avec nos standards sont homogènes avec ceux du pourcentage scavenging. L'acide gallique montre la plus faible valeur de l'IC₅₀ (0,32 mg/100ml) et possède, dans ce cas là, le potentiel anti-radicalaire vis à vis du DPPH le plus élevé, contrairement à la BHA (1,03 mg/100ml) qui possède le potentiel le moins élevé des standards testés.

Pour les extraits, les valeurs des IC₅₀ sont tout à fait comparables aux valeurs des pourcentages scavenging et du pouvoir réducteur. Les feuilles et les fleurs présentent des IC₅₀ plus faibles (9,98 mg/100ml et 10,08 mg/100ml respectivement) que celles des racines (IC₅₀ = 19,32), donc une meilleure activité est observée dans le cas des extraits des feuilles et fleurs comparativement aux racines.

Les résultats obtenus pour les extraits de la plante restent largement inférieures aux standards utilisés. On note que la valeur de l'IC₅₀ des feuilles est environ dix fois supérieure à la valeur de l'IC₅₀ de la BHA.

Le potentiel anti-radicalaire se classe dans l'ordre décroissant suivant : Acide gallique > quercétine > acide tannique > acide caféique > BHA > extrait des feuilles > extrait des fleurs > extrait des racines.

Djeridane et ses collaborateurs (2006) ont estimé l'activité anti-radicalaire de plusieurs plantes parmi elles *Thapsia garganica* en utilisant le radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). La meilleure activité fut obtenue avec *Anthemis arvensis* (Anthémis des champs ou fausse camomille) et la plus faible avec *Ruta montana* (Rue des montagnes) classant ainsi *Thapsia garganica* en sixième position sur les onze plantes testées.

II.5. Activités biologiques *in vivo*

II.5.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë a pour but la détermination de la DL50 (dose létale à 50%), elle correspond à la dose capable de tuer dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien: mort ou survie des animaux (**Aouissa, 2002**). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° VI.

Tableau n° VI : Résultats de l'étude de la toxicité aiguë.

Solution préparée	Nombre De Mortalité		
	Infusion Racines	Infusion Feuilles	Infusion Fleurs
Eau Physiologique	0	0	0
1 g/Kg	0	0	0
2 g/Kg	0	0	0
5 g/Kg	0	0	0
10 g/Kg	0	0	0

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de cinq essais (n=5)

Après administration des extraits, les animaux ont été d'abord mis sous observation pendant 3 à 4 heures afin de noter les cas de mort immédiate. Après ce temps, ils sont réalimentés et maintenus sous observation pendant 48 heures. Une intention particulière a été portée aux symptômes cliniques suivants tremblements, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

Aucune mortalité, ni signe clinique n'ont été observés suite à l'administration de la dose de 1g/kg de nos trois préparations (Infusions racines, feuilles et fleurs). Ce qui nous a amené à effectuer l'essai limite à 2g/Kg décrit par l'**OCDE n° 420 (2001)**.

Cet essai limite offre un moyen efficace d'identifier les substances susceptibles d'être peu toxiques.

L'essai limite est un essai séquentiel décrit par l'**OCDE n°425 (2008)** réalisé sur cinq animaux au maximum. Une dose expérimentale de 2g/kg, voire dans des cas exceptionnels de 5g/kg, peut être appliquée.

Essai limite à 2g/kg :

Si l'administration de la dose limite correspondant à 2g/kg permet l'obtention d'une moyenne de mortalité de 3/5, l'essai limite s'achève et on passe à l'essai principal. Dans ce cas, la DL50 est une valeur inférieure à la dose employée (2g/kg). Dans le cas où la moyenne de mortalité est inférieure à 3/5, la DL50 correspond à une dose supérieure à 2g/kg, chose qui nous mène à employer la deuxième dose limite de 5g/kg.

Lors des essais avec nos préparations végétales, nous avons obtenu des mortalités inférieures à 3 animaux/5, ce qui nous amène à conclure que la DL50 est supérieure à 2g/Kg. De ces résultats, il a fallu passer à l'essai limite à 5g/Kg.

Essai limite 5g/Kg :

De même pour l'essai limite à 5g/Kg, si le taux de mortalité atteint la moyenne de 3/5, la DL50 est une valeur comprise entre 2g/Kg à 5g/Kg. Dans l'autre cas, où la mortalité est inférieure à cette moyenne (3/5), la DL50 sera supérieure à 5g/kg.

Lors de nos essais avec les infusions de *Thapsia garganica*, nous avons obtenu des mortalités inférieures à 3 animaux/5, ce qui nous amène à conclure que la DL50 est supérieure à 5g/Kg.

Exceptionnellement, nous avons opté pour un troisième essai limite à 10 g/Kg pour pouvoir situer la DL50.

Le choix d'un plan d'essai séquentiel augmente la puissance statistique et vise aussi à faire pencher volontairement le mode opératoire vers le rejet de l'essai limite pour les substances ayant une DL50 proche de la dose limite, autrement dit à pêcher par excès de sécurité. À l'instar de ce qui se produit avec n'importe quel essai limite, la probabilité de classer correctement une substance diminue à mesure que la DL50 réelle se rapproche de la dose limite (**OCDE n°425, 2008**).

Les résultats obtenus avec nos extraits restent inférieurs à la moyenne de 3/5, donc la DL50 est supérieure à 10 g/kg.

Selon l'échelle de toxicité de **Hodge et Sterner (1980)** in **Ouedraogo et al. (2001)** représentée dans le tableau n° VII, les infusions des différentes parties (racines, feuilles et fleurs) de *Thapsia garganica* sont classées dans les catégories de Pratiquement non toxique ou Relativement sans danger (DL50 > 10g/KG).

Tableau n° VII : Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1980).

Classe de toxicité	DL50 mg/kg	Doses pour un enfant de 12,5 kg
Extrêmement toxique	< 1	8 mg (le fait d'en goûter)
Très toxique	1 à 50	500 mg (l'équivalent d'une petite gorgée)
Moyennement toxique	50 à 500	5 g (l'équivalent d'une cuillerée à café)
Faiblement toxique	500 à 5 000	60 g (l'équivalent d'un coquetier)
Pratiquement non toxique	5 000 à 15 000	180 g
Relativement sans danger	> 15 000	> 180 g

II.5.2. Toxicité subaiguë

Le test de toxicité subaiguë est un test avec des essais à court terme à dose répétées qui est mis en place pour nous permettre d'élaborer des lignes directrices pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (**OCDE n°425, 2008**).

Le plasma fut récupéré, subit des tests biochimiques (bilan rénale et bilan hépatique). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° VIII.

Tableau n° VIII : Bilan rénal et hépatique des 04 lots mis en place

	Lot Témoin	Lot N° 1	Lot N° 2	Lot N°3
Urée sanguine (g/l)	0,510 ± 0,062	0,622 ± 0,083	0,706 ± 0,097	0,516 ± 0,065
Créatinine sanguine (mg/l)	2,253 ± 0,603	2,380 ± 0,380	2,530 ± 0,410	1,954 ± 0,338
Bilirubine totale (mg/l)	3,000 ± 1,000	4,200 ± 1,483	2,200 ± 0,447	2,400 ± 0,547
Bilirubine conjuguée (mg/l)	0,946 ± 0,083	0,598 ± 0,148	0,550 ± 0,082	0,708 ± 0,019
Bilirubine non conjuguée (mg/l)	2,053 ± 1,008	3,602 ± 1,394	1,650 ± 0,526	1,692 ± 0,555
ASAT (U/l)	72,976 ± 85,091	113,800 ± 66,205	133,000 ± 25,719	118,600 ± 60,359
ALAT (U/l)	46,000 ± 16,000	47,600 ± 11,238	44,000 ± 8,124	41,400 ± 12,621
Phosphatase alcaline (U/l)	157,333 ± 64,392	106,200 ± 26,705	92,800 ± 11,606	129,000 ± 24,789

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de cinq essais (n=5) avec ± l'écartype

*Lot témoin : rats ayant reçu de l'eau physiologique.

*Lot 1 : rats ayant reçu des infusions à base de racines.

*Lot 2 : rats ayant reçu des infusions à base de feuilles.

*Lot 3 : rats ayant reçu des infusions à base de fleurs.

Bilan rénal :

Deux paramètres ont été analysés à savoir l'urée sanguine et la créatinine. De ces résultats, on constate une élévation du taux de l'urée sanguine chez les rats du lot 1 et 2 avec $0,622 \pm 0,083$ g/l ; $0,706 \pm 0,097$ g/l respectivement comparés au lot témoin ($0,510 \pm 0,062$ g/l), cependant le lot 3 n'a subi aucune variation par rapport au lot témoin avec $0,516 \pm 0,065$ g/l.

L'élévation du taux de l'urée sanguine survient lors d'une augmentation de la production de l'urée suite à une augmentation de la ration protéique alimentaire, à des états hypercataboliques ou par absorption d'acides aminés et de peptides suite à une hémorragie gastro-intestinale, ce dernier cas reste le plus probable. Mais ce n'est pas un signe indiquant une insuffisance rénale.

Bien que la concentration plasmatique de l'urée soit souvent utilisée comme indice de la fonction glomérulaire, le dosage de la créatinine plasmatique est un moyen plus précis (**Marshall & Bangert, 2005**).

L'analyse statistique des résultats du dosage de la créatinine sanguine n'indique aucune différence significative entre les lots ayant reçu les préparations à base des trois parties de *Thapsia garganica* et le lot témoin ayant reçu l'eau physiologique. Ces résultats excluent l'hypothèse de l'insuffisance rénale (atteinte de la fonction glomérulaire).

L'augmentation isolée du taux d'urée sanguine sans la créatinine sanguine chez les lots 1 et 2 oriente vers un catabolisme protéique intense ou une hémorragie digestive (**Fourcade, 2006**).

Bilan hépatique :

Nous avons opté pour les paramètres suivants : bilirubine totale, directe et indirecte, les enzymes : phosphatase alcaline et les transaminases.

✓ **La bilirubine**

La bilirubine est un pigment jaune issue principalement de la fraction héminique des molécules d'hémoglobine, le fer de l'hème est réutilisé mais le noyau tétrapyrrolique est catabolisé en bilirubine. Cette dernière est insoluble dans l'eau sous forme libre et toxique lors de son accumulation dans les tissus. Lorsqu'elle se conjugue à l'albumine, elle est transportée dans la circulation sanguine. Captée par les hépatocytes, elle est conjuguée à l'acide glucuronique pour intégrer le bol alimentaire au niveau de l'intestin grêle qui sera métabolisée en stercobiline, pigment brun qui colore les selles. Le dosage de la bilirubine plasmatique est donc un marqueur de la fonction hépatique (**Marshall & Bangert, 2005**).

Des résultats obtenus, on note une élévation du taux de la bilirubine totale du lot n°1, ayant reçu l'infusion à base de racines avec un taux de $4,200 \pm 1,48$ mg/l comparé au lot témoin ($3,00 \pm 1,00$ mg/l).

Les lots n° 2 et 3 présentent des taux de bilirubine totale ($2,200 \pm 0,447$; $2,400 \pm 0,547$ mg/l respectivement) comparables à celui du lot témoin.

Selon les données de l'institut IFFA CREDO, le taux de bilirubine totale chez des rats de même catégorie que ceux utilisés lors de notre étude (même âge, Même sexe...) ayant reçu uniquement leur nourriture habituelle est de $2,39 \pm 0,502$ mg/l, ce qui met le lot n° 1 largement au dessus avec une hyperbilirubinémie non conjuguée.

L'hyperbilirubinémie non conjuguée est principalement due à la maladie de Gilbert ou à une hémolyse, cette dernière est probablement la cause de l'élévation du taux de bilirubine totale car les rats utilisés lors de cette étude sont indemnes de toute maladie héréditaire. De ce fait, on peut conclure les infusions à base des racines de *Thapsia garganica* ont provoqué une hémolyse induisant une élévation du taux de bilirubine (**Marshall & Bangert, 2005**).

✓ **Phosphatases alcalines** :

Ce sont des enzymes plasmatiques présentes dans de nombreux tissus. La détermination du taux des phosphatases alcalines dans le sérum permet la quantification de leur activité globale dans le sérum mais ne permet pas la différenciation de la source. Elle présente un intérêt particulier pour le diagnostic des maladies hépatobiliaires ou des maladies osseuses associées (**Burtis et al., 1999**).

La diminution du taux de cette dernière est rare, mais c'est un signe d'une hypophosphatasie ou d'une hyperostose endostale, alors que son augmentation peut traduire plusieurs cas, de ce fait il faudra prendre en considération d'autres paramètres tel que la fonction hépatique ou d'autres organes ou bien une détermination plus spécifique des phosphatases alcalines afin de connaître l'origine de l'élévation de l'activité de ces enzymes dans le sérum (**Perrot, 2002 ; Khubab et al., 2006**).

On constate d'après l'analyse statistique des résultats obtenus qu'il n'existe pas de différence significative entre les lots ayant reçu les préparations à base des différentes parties de *Thapsia garganica* et le lot témoin. On conclut alors que ces préparations n'ont pas d'influence directe sur l'élévation du taux des phosphatases alcalines.

✓ **Les transaminases** :

Les transaminases ou amino-transférases sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupement aminé d'un acide α -aminé à un acide α -cétonique. Leur dosage est utilisé lors de l'évaluation de la fonction hépatique, représentées par l'alanine et l'aspartate aminotransférase (**ALAT** et **ASAT** respectivement) **Hechetsweiler & Hechetsweiler (2006)**.

Il a été reporté que la modification de l'activité sérique des transaminases est associée à une nécrose ou à un autre type de dommage cellulaire des tissus du muscle cardiaque, hépatique ou squeletique (**Quevauvilliers et al., 2009**).

Dans la présente étude, on note que le taux des **ALAT** chez les rats ayant reçu les infusions à base des différentes parties de *Thapsia garganica* sont de $47,600 \pm 11,238$, $44,000 \pm 8,124$ et $41,400 \pm 12,621$ (U/l) pour les lots 1, 2 et 3 respectivement et sont similaires selon l'analyse statistique au lot témoin $46,000 \pm 16,000$ (U/l) ayant reçu l'eau physiologique.

On note qu'il n'existe pas de différence significative, de cela on peut conclure que les préparations à base de notre plante n'ont pas eu d'effet sur l'activité des **ALAT**.

Pour les taux des **ASAT**, on note une élévation chez les trois lots ayant reçu les infusions préparées à base des parties de *Thapsia garganica* ($113,800 \pm 36,205$, $133,000 \pm 25,719$ et $118,600 \pm 20,359$ (U/l) respectivement pour les lots 1 , 2 et 3) comparés aux résultats du lot témoin $72,976 \pm 15,091$ (U/l).

Le taux des **ASAT** est directement lié à l'ampleur des dommages tissulaires, car ces enzymes sont libérées dans le système sanguin lorsque les tissus (foie, cœur...etc.) qui les contiennent sont atteints (**Naveau et al., 2003**).

II.5.3. Activité inflammatoire

La réaction inflammatoire est un mécanisme de défense de l'organisme en réponse à une agression d'origine exogène (infectieuse, physique, traumatique), endogène (immunologique) ou autres (syndrome d'ischémie perfusion). Composante de la réponse immune, elle est impliquée dans l'immunité naturelle en réponse à un signal de danger, elle favorise ainsi l'induction de la réponse immune spécifique (Verhaeghe, 2007). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° IX

Tableau n° IX : Résultats de l'activité inflammatoire

Substance	Dose	% Œdème	% Réduction
Eau physiologique	---	12,58%	---
Infusion Racines	2000 mg/Kg	12,79%	- 0,1669%
Infusion Feuilles	2000 mg/Kg	24,04%	- 0,9109%
Infusion Fleurs	2000 mg/Kg	21,45%	- 0,7050%
ASA	100 mg/Kg	7,55%	+ 0,3998%

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de cinq essais (n=5)

Des résultats obtenus, nous notons que les infusions préparées à partir des trois parties analysées de *Thapsia garganica* n'exercent aucun effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation.

Le traitement de l'inflammation, induite par la carragénine, par l'eau physiologique (témoin négatif) se révèle sans effet sur l'inflammation avec un pourcentage d'œdème de 12,58%. Le traitement de la même réaction inflammatoire, séparément, par des infusions de racines de notre plante augmente l'œdème (12,79%), ce qui signifie que notre échantillon provoque une réaction inflammatoire.

De même dans le cas des infusions des feuilles et fleurs de *Thapsia garganica*, l'œdème augmente en comparaison au témoin négatif avec des pourcentages de 24,04% et 21,45% respectivement. Ces résultats signifient que les fleurs, les feuilles comme les racines de notre plante favorisent une réaction inflammatoire et non un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation.

L'acide acétylsalicylique, un anti-inflammatoire non stéroïdien, utilisé comme témoin positif permet la diminution de l'œdème inflammatoire jusqu'à un pourcentage de 7,55%.

De ces résultats, on conclut que les deux parties aériennes de *Thapsia garganica* exercent un effet inflammatoire supérieur à celui des racines et du témoin négatif, en amplifiant l'œdème provoqué par la carragénine.

L'œdème provoqué par la carragénine dans la patte de la souris, comporte trois phases distinctes: une première phase qui fait intervenir l'histamine et la 5-hydroxytryptamine qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème; une seconde phase qui fait appel aux kinines comme médiateurs augmentant la perméabilité vasculaire et une troisième phase dont le médiateur est supposé être la prostaglandine (**Wang & Mineshita, 1996**). Cette libération de prostaglandines est associée à la migration leucocytaire dans la zone enflammée. Les prostaglandines interviennent dans les processus inflammatoires aigus ou chroniques.

Le test utilisant l'œdème provoqué par la carragénine trouve un intérêt particulier dans la mesure où c'est un test dans lequel la participation des dérivés de la cyclo-oxygénase produits au cours du métabolisme de l'acide arachidonique, et la production des espèces réactives à l'oxygène sont bien établies (**Smith et al., 1974**). Les médicaments anti-inflammatoires interviennent en général en s'opposant à l'effet de ces médiateurs chimiques: histamine, sérotonine, kinines et prostaglandines. L'acide acétylsalicylique, anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibe la production des médiateurs de l'inflammation surtout la production des prostaglandines (**Vanhalwyn & Cerexhe, 2004**).

Des effets pro-inflammatoires ont été observés avec des composés terpéniques isolés à partir de *Thapsia garganica*, qui interviennent dans l'activation des mastocytes et des leucocytes (**Ali et al., 1985**) et dans l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique, médiateur important de la réaction inflammatoire (**Ohuchi et al., 1988**).

II.5.4. Activité antalgique

L'importance du traitement de la douleur a conduit à la recherche et au développement de plusieurs types d'antalgiques en fonction du type de douleur. Cette étude permet de comparer la réduction du nombre de crampes après administration de doses égales de préparations des trois parties de *Thapsia garganica* et un produit de référence, connu pour être antalgique, le paracétamol. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n° X.

Tableau n° X : Résultats de l'activité antalgique

Substance	Dose	Nombre de torsions	% de Protection
Eau physiologique	---	38,66 ± 2,51	---
Infusion Racines	2000 mg/Kg	20,66 ± 8,62	46,55%
Infusion Feuilles	2000 mg/Kg	27,66 ± 3,51	28,45%
Infusion Fleurs	2000 mg/Kg	13,66 ± 2,51	64,66%
Paracétamol	50 mg/Kg	7,14 ± 2,19	81,53%

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de cinq essais (n=5) avec ± l'écartype

On constate que les infusions préparées à partir des différentes parties de *Thapsia garganica* ont un effet protecteur vis-à-vis des torsions provoquées par l'acide acétique (effet antalgique), car l'injection de ce dernier provoque des douleurs qui se manifestent par des torsions de l'abdomen avec étirements des pattes postérieures (crampes), qui peuvent être réduites par un produit antalgique.

Il en ressort que le paracétamol, pris comme produit de référence présente un pourcentage de protection le plus élevé avec 81,53%, suivis des infusions de *Thapsia garganica* avec des pourcentages de 46,55%, 28,45% et 64,66% pour les racines, les feuilles et les fleurs respectivement.

Sachant que le paracétamol est un antalgique et un anti-pyrétique efficace, l'origine de ces effets est quasiment superposable à celui de l'aspirine et des anti-inflammatoires. En effet, le paracétamol bloque de façon réversible la cyclo-oxygénase, en particulier la **COX 3**, au niveau du **SNC** (système nerveux central) et empêche donc la production des prostaglandines responsables de la fièvre (effet anti-pyrétique central) et de la sensibilisation des nocicepteurs périphériques (effet antalgique périphérique).

Le paracétamol est un antalgique faiblement anti-inflammatoire en raison, selon l'hypothèse avancé, de son incapacité d'inhiber la **COX** dans un milieu riche en peroxydes, qui est la zone inflammatoire (**Ayoub et al., 2006**).

De ce fait, on peut assimiler l'effet analgésique des infusions des différentes parties de *Thapsia garganica* au paracétamol. Suite aux résultats obtenus, les infusions préparées présentent des effets antalgiques faibles par rapport au paracétamol, mais néanmoins existants, et du fait que ces préparations ne présentent pas d'activité anti-inflammatoire comme le paracétamol. Il existe des possibilités qu'ils aient le même mode d'action, ce qui reste à vérifier, ou bien des modes d'action différents de celui du paracétamol.

Conclusion

&

Perspectives

Ce présent travail a porté sur l'étude comparative des trois parties (racines, feuilles et fleurs) de *Thapsia garganica*.

Les résultats du test de l'humidité, après séchage de la plante, indiquent des taux d'humidité inférieurs à 10% pour les trois parties, permettant ainsi une bonne conservation de la plante.

Les résultats des différentes analyses, effectuées sur les extraits méthaloniques des racines, des feuilles et des fleurs de *Thapsia garganica*, indiquent qu'ils contiennent des substances actives à différentes teneurs comme suit :

- Les composés phénoliques totaux : les résultats indiquent qu'ils n'existent pas de différence significative entre les trois échantillons avec des taux de $214,91 \pm 2,33$ mg Eq AG/100g PS pour les racines et $198,80 \pm 3,04$ et $191,74 \pm 1,03$ mg Eq AG/100g PS pour les fleurs et les feuilles respectivement.
- Les flavonoïdes : Les résultats indiquent que la teneur en flavonoïdes varie significativement entre les échantillons avec $7,52 \pm 0,12$; $11,31 \pm 0,11$ et $15,25 \pm 0,37$ mg Eq Qr/100g PS respectivement pour les racines, feuilles et fleurs.
- Les anthocyanines : Le dosage des trois échantillons révèle des teneurs faibles, qui varient significativement avec $3,00 \pm 0,98$; $7,60 \pm 4,09$ et $10,04 \pm 3,80$ mg Eq Cyd-3-Glu/100g PS respectivement pour les racines, feuilles et fleurs.
- Les tannins condensés : représentent le groupe majoritaire des polyphénols analysés avec une teneur plus élevée dans les racines avec $36,35 \pm 2,02$ mg Eq Cat/100g PS et des taux de $24,66 \pm 0,80$ et $17,40 \pm 1,50$ mg Eq Cat/100g PS dans les feuilles et les fleurs respectivement.

Le test du pouvoir réducteur révèle, que les extraits méthaloniques de nos trois échantillons ont un effet réducteur proportionnel à la concentration des extraits utilisés.

Les résultats montrent une différence significative entre nos échantillons et les standards synthétiques, ceci pourrait s'expliquer par la pureté de ces derniers.

L'activité anti-radicalaire du DPPH révèle, que les extraits méthaloniques de nos trois échantillons, un effet réducteur proportionnel à la concentration des extraits utilisés.

Les résultats de l'activité « scavenger » du radical DPPH par nos extraits indiquent une différence significative entre nos échantillons et les antioxydants de synthèse.

L'activité réductrice des échantillons n'est pas proportionnelle à la concentration en composés phénoliques, les feuilles qui sont les moins riches en composés phénoliques totaux ont donné les meilleures activités réductrice et anti-radicalaire.

Les résultats des tests de toxicité aiguë révèlent que les infusions préparées à base des échantillons de *Thapsia garganica* sont classées dans les catégories de Pratiquement non toxique ou Relativement sans danger, soit la DL50 > 10g/KG.

Le test de la toxicité subaiguë a porté sur deux grands paramètres :

- Bilan rénal : les résultats révèlent une élévation du taux de l'urée sanguine sans élévation de la créatinine sanguine, ce qui n'est pas un signe d'une insuffisance rénale.
- Bilan hépatique : Les résultats indiquent, que la préparation à base des racines de *Thapsia garganica* provoque une élévation du taux de bilirubine et que les préparations à base des trois échantillons provoquent une élévation du taux de l'ASAT.

Les pourcentages de réduction d'œdème par traitement par nos trois échantillons indiquent que ces derniers n'exercent aucun effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation contrairement au témoin utilisé.

Les pourcentages de protection indiquent que nos trois échantillons exercent un effet antalgique avec un meilleur effet des préparations à base des fleurs suivi des racines puis des feuilles.

Cette première approche de l'analyse de la composition en substances bioactives de notre plante ainsi que l'évaluation des activités *in vitro* et *in vivo*, étant effectuée, il serait intéressant de procéder à une séparation par **GC-MS** et **HPLC** pour identifier les composés responsables des propriétés biologiques mises en évidence lors de cette étude, de réaliser des tests enzymatiques pour évaluer l'activité de ces substances sur les enzymes antioxydants et d'aborder l'aspect de l'activité antimicrobienne.

Envisager également la possibilité d'utilisation des extraits de *Thapsia* comme substances anticancérigènes sur des cellules autres que les celles de la prostate, sur lesquelles des études ont été réalisées avec les composants majoritaires de la plante ayant donnés des résultats encourageant.

*Références
Bibliographiques*



Ali H., Christensen S. B., Foreman I. J. C., Pearce F. L., Piotrowski W. & Thastrup O. (1985). The ability of thapsigargin and thapsigarginin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br. J. Pharmac.* 85, 705-712.

Amadou B.S. (2004). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC (Combretaceae). Thèse présentée et soutenue publiquement en vue d'obtention du grade de docteur en pharmacie dans la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'université de BAMAKO-MALI. 1-141.

Andrews S. P., Ball M., Wierschem F., Cleator E., Oliver S., Hogenauer K., Simic O., Antonello A., Hunger U., Smith M. D. & Ley S. V. (2007). Total synthesis of five thapsigargin: Guaianolide natural products exhibiting sub-nanomolar SERCA inhibition. *Chem. Eur. J.* 13(20):5688–5712.

Anonyme I. IN.C.LP.004. Version B, 2002. Manuel de Saidal.

Anonyme II. IN.C.LP.006. Version A. Manuel de Saidal.

Anonyme III. MO.C.LP.002. Version B. Activité antalgique – Writing test. Manuel de Saidal.

Anonyme IV. MO.C.LP.022. Version A. Activité anti-inflammatoire – Test de Levy. Manuel de Saidal.

Aouissa I.W.R. (2002). Etude des activités biologiques et de la toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *mangifera indica* L. (Anacardiaceae). Thèse présentée et soutenue publiquement en vue d'obtention du grade de docteur en pharmacie dans la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'université de BAMAKO-MALI. 1-127.

Appendin G., Prosperini S., Valdivia C., Ballero M., Colombano G., Billington R. A., Genazzani A. A. & Sterner O. (2005). SERCA-inhibiting activity of C-19 terpenolides from *Thapsia garganica* and their possible biogenesis. *J. Nat. Prod.* 68:1213-1217.

Arnold J. T. & Isaacs J. T. (2002). Mechanism involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault, *Endocr. Relat. Cancer.* 9, 61.

Ayoub S.S., Colville-Nash P.R, Willoughby D.A. & Botting R.M. (2006). The involvement of cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 538 : 57-65.

Azzi A. (2007). Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 362 : 230–232.

B

Bartels H., Böhmer M. & Heierli C. (1972). Serum kreatininbestimmung ohne enteweißen. *Clinica. Chimica. Acta.* 37: 193-197.

Blumberg P.M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48 (1): 1–8.

Bowers G.N. & McComb R.B. (1975). Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.* 21(13): 1988-1995.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales 3^{ème} édition. *Ed. Tec et Toc, Ed. Médicales Internationales.* 619-636. ISBN: 2-7430-0315-4.

Burtis C.A., Ashwood E.R. & Saunders W.B. (1999). Tietz N.W. Text Book of Clinical Chemistry. 3rd Ed. 648-678. 1429-1431.

C

Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395.

Cheng G. W., & Breen P.J. (1991). Activity of phenylalanine ammonialyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 116: 865–869.

Christensen S. B., Larsen I. K. & Rasmussen U. (1982). Thapsigargin and Thapsigargin : Two Histamine Liberating Sesquiterpene Lactones from *Thapsia garganica*. X-ray Analysis of the 7, 11-Epoxyde of Thapsigargin. *J. Org. Chem.* 47 : 4 : 649-652.

Christensen S. B., Andersen A. & Smitt U. W. (1997). Sesquiterpenoids from *Thapsia* species and medicinal chemistry of the thapsigargin. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 71:129–167.

Christensen S. B., Norup E. & Rasmussen U. (1984a). Chemistry and structure-activity relationship of the histamine secretagogue thapsigargin and related compounds. In: Krosgaard-Larsen P, Christensen SB, Kofod H (eds) Natural products and drug development. Munksgaard, Copenhagen.

Christensen S. B., Norup E., Rasmussen U. & Madsen J. O. (1984b). Structure of histamine releasing guaianolides from *Thapsia* species. *Phytochem.* 23(8):1659–1663.

Christensen S. B., Skytte D. M., Denmeade S. R., Dionne C., Møller J. V., Nissen P. & John T. Isaacs J. T. (2009). A Trojan Horse in Drug Development: Targeting of Thapsigargin Towards Prostate Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 9, 3, 276-294.

Colot M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Edition Masson.

Coulon V. & Blanchard J.-M. (2001). Flux calciques et expression génique. *médecine/sciences n° 10*. 17:969-78.

Cragg G. M. & Newman D. J. (2004/Rev.2006). PLANTS AS A SOURCE OF ANTI-CANCER AGENTS. *Ethnopharmacology*. [Eds. Elaine Elisabetsky, Nina L. Etkin], in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>].

Curtay J.P. & Robin J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie. 1-4.

Custódio L., Fernandes E., Escapa A.L., López-Avilés S., Fajardo A., Aligué R., Alberício F. & Romano A. (2009). Antioxidant activity and *in vitro* inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Pharmaceutical Biology*. 47.8: 721-728.



Denmeade S. R. & Isaacs J. T. (2005). The SERCA Pump as a Therapeutic Target, *Cancer Biology & Therapy* 4:1, 14-22.

Delverdier M., Bret L., I. Raymond I. & Magnol J.P. (1993). La réaction inflammatoire : dynamique et signification biologique. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* 28 : 589–603.

Denmeade S. R., Jakobsen C.M., Janssen S., Khan S. R., Garrett E. S., Lilja H., Christensen S. B. & Isaacs J. T. (2003). Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 13, 990-1000.

Durum S.K. & Oppenheim J.J. (1989). Macrophage-derived mediators : interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6, interferon and related cytokines. In W.E. Paul, editor, *Fundamental immunology*. Raven press, 2^eme edition. 639–656.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. & Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654–660.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. & Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 224: 801–809.

Drew D.P., Krichau N., Reichwald K. & Simonsen H.T. (2009). Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem.Rev.* 8:581–599.

Durand G., Polidori A. & Pucci B. (2003). La vectorisation de pièges à radicaux libres : Nouvelles stratégies thérapeutiques. *Actualité chimique*. 26-29.



Engler R. (1988). Protéines de la réaction inflammatoire, fonctions régulatrices. *Ann. Biol. Clin.* 46 : 336–342.



Falsone G., Haddad H. & Wendisch D. (1986). Sesquiterpene lactone triesters with unusual structures from *Thapsia garganica* L. (Umbelliferae). *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 319(4):372–379.

Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique* : 108-115.

Fawcett J.K., & Scott J.E. (1960). A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13.2: 156-159.

Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M & Barros L. (2005). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. 100: 1511–1516.

Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. & Leverve X. (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*. 11 : 411-20.

Fourcade J. (2006). Néphrologie : Elévation De La Créatininémie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 1-15.

French D. H. (1971). Ethnobotany of the Umbelliferae *In: The biology and chemistry of the Umbelliferae.* (Heywood VH, ed.). Academic press Inc. LTD, London. 385-412.



Gallin J.I. (1989). Inflammation. In W.E. Paul editor, *Fundamental Immunology*. Raven Press, 2ème édition. 721–733.

Gausсен H., Lerog J.-L. & Ozenda P. (1982). Précis de botanique : Végétaux supérieurs. 2^{ème} Ed. Masson. 387-389.

Gómez F. L. M. (2007). Síntesis de análogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cádiz. puerto real. Espagne.

Gruys E., Obwolo M.J. & Toussaint M.J.M. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry : a review. *Vet. Bull.*, 64.11: 1009–1018.

Guignard J.-L. (1998). Abrégés botaniques. 11^{ème} Ed. Masson. 166-171. ISBN : 2-225-83519-5.

Gulcin I., Ailci H.A., & Cesur M. (2005). Determination of *in Vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 53. 3:281-285.



Hahlbrock K. & Scheel D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40: 347–69.

Hakii H., Fujiki H., Suganuma M., Nakayasu M., Tahira T., Sugimura T., Scheuer P. J. & Christensen S.B. (1986). Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 111:177-181.

Hechetsweiler B. & Hechetsweiler P. (2006). Voyage en biochimie. Ed. ELSEVIER. ISBN : 978-2-84299-547-8. 42-50.

Hodge A.C. & Sterner J.H. : (1980). In Etudes de toxicité: quelques données fondamentales (A.K. DONE) TEMPO MEDICAL Afrique N°7.



Iqbal S., Bhangar M.I., & Anwar F. (2007). Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *Food Science and Technology*. 40 : 361–367.



J.O.C.E. Journal Officiel des communautés européennes. (1992). N° L383/A/110.

Jackson T. R., Patterson S. I., Thastrup O. & Hanley M. R. (1988). A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem. J.* 253, 81.

Javanovic S.V. & Simic M.G. (2000). Antioxidants in nutrition. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899 : 326-334.

Jendrassik L. & Gróf P. (1938). Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochem. Z.* 297: 81.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. & Stevens P. (2002). Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 387-390. ISBN : 2-7445-0123-9.

K

Khanbabaee K. et Ree T.V. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 18 : 641–649.

Khubab N. Hakawati I. & Alajati-Khubab S. (2006). Guide des examens biologiques. Ed. Lamarre. ISBN : 2-7573-0010-5. 35-36.

Koehler-Ramonatxo Ch. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutritio, in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 20 : 165-177.

Koivunen J., Aaltonen V. & Peltonen J. (2006). Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters.* 235. 1 : 1-10.

Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M., Szmigiel B. et Blaszczyk J. (2003). Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.* 55 : 699–702.

Kranl K., Schlesier K., Bitsch R., Hermann H., Rohe M. & Bohm V. (2005). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays. *Food Chemistry.* 93: 171-175.

L

Laurent P.E. (1988). Induction et régulation de la réaction inflammatoire systémique. *Ann. Biol.Clin.* 46 : 329–355.

Lin X. S., Denmeade S. R., Cisek L. & Isaacs J.T. (1997). The role of growth arrest in programmed (apoptotic) death of prostate cancer cells by thapsigargin. *Prostate.* 33:201–7.

Lister E. & Wilson P. (2001). Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute.

Liu H., Jensen K. G., Linh My Tran L. M., Chen M., Zhai L., Olsen C. E., Sohoel H., Denmeade S. R., Isaacs J.T. & Christensen S.B. (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry.* 67 : 2651–2658.

Lytton J., Westlin M., Burk S. E., Shull G. E. & MacLennan D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267, 14483.

M

Marshall W.J & Bangert S.K. (2005). Biochimie Médicale : Physiopathologie et Diagnostic. Traduction et Adaptation de l'anglais par Pr Raynaud E. ISBN : 2-84299-674-7. Chap. 4 : Reins. Chap. 5 : Foie. 59-99.

Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 : 304–315.

Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M. & Tuñón M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.

Matillon Y. (1999). Évaluation et suivi de la douleur chronique chez l'adulte en médecine ambulatoire. L'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES). Service des Recommandations et Références Professionnelles. 1-124.

Meftah T., Sengui R., Djennas A. & Benabbes O. (2001). Connaissance, valorisation et contrôle de l'utilisation de la flore sauvage en médecine traditionnelle (plantes médicinales). Programme U.I.C.N. pour l'Afrique du nord.

Merskey H & Bogduk N. (1994). Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain, 2nd ed. *Seattle (VA): IASP Press.*

Middleton E., Kandaswami C. & Theoharides T.C. (2000). *Pharmacological Review*. 52. (4) : 673-751.

Milane E. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse soutenue en vue d'obtention du grade de docteur de l'université de Louis Pasteur Strasbourg I : 11-268.

Miller L.C. & Tainter M.L. (1944). Estimations of the DE₅₀ and its error by means of log-probit graphic. *Paper. Proc.Soc.Rep.Biol.Med.* 57: 261-264.

Mol J., Grotwold E. & Koes R. (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends plant sci.* 3: 212-217.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26.2: 211-219.

Morais S.A.L., Nascimento E.A., Queiroz C.R.A.A., Piló-Veloso D. & Drumond M.G. (1999). Studies on Polyphenols and Lignin of *Astronium urundeuva* Wood. *J. Braz. Chem. Soc.* 10. (6). p: 447-452.

Murray, R. (1984a): Aspartate aminotransferase. Clin. Chem. Mosby Co. St. Louis.Toronto. Princeton. 1112-16.

Murray, R. (1984b): Alanine aminotransferase. Clin. Chem. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton. 1088-90.



Nacz M. & Shahid F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of chromatography A*. 1054: 95-111.

Nakatsubo F., Enokita K., Murakami K., Yonemori K., Sugiura A., Utsunomiya N., et Subhadrabandhu S. (2002). Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of *Diospyros* species. *J. Wood Sci.*48. p: 414-418.

Naveau S., Balian A. & Perlemuter G. avec la participation de **Gerolami R. & Vons C. (2003).** Hépatogastro entérologie : Connaissance et Pratique. Ed. Masson. ISBN : 2-294-01141-4. 62-70.



O.C.D.E. Organisation De Coopération Et Développement Economique n °425 (2008). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses.

O.C.D.E. Organisation De Coopération Et Développement Economique n °407 (2008). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Etude de toxicité orale a dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs.

O.C.D.E. Organisation De Coopération Et Développement Economique n °420 (2001). Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques. Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée.

Ohuchi K., Sugawara T., Watanabe M., Hirasawa N., Tsurufuji S., Fujiki H., Takashi Sugimura T. & Christensen S. B. (1987). Stimulation of arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages by thapsigargin, a non-(12-O-tetradecanoyl-phorbol- 13-acetate) (TPA)-type tumor promoter. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113:319-324.

Ohuchi K., Sugawara T., Watanabe M., Hirasawa N., Tsurufuji S., Fujiki H., Christensen S. B. & Sugimura T. (1988). Analysis of the stimulative effect of thapsigargin, a non-TPA-type tumour promoter, on arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 94, 917-923.

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé (1990). Nature de la douleur cancéreuse. In: *Traitement de la douleur cancéreuse et soins palliatifs.* Genève: O.M.S. 3-22.

Ouedraogo Y., Nacoulma O., Guissou I.P. & Guede Gulna F. (2001). Evaluation *In Vivo Et In Vitro* De La Toxicité Des Extraits Aqueux D'écorces De Tige Et De Racines De *Mitragyna Inermis* (Willd).O.Ktz (Rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr.* Vol.11, pp. 13-29.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44 : 307–315.

Ozturks M., Aydogmus-Ozturk F. Duru M.E. & Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chemistry*. 103(2): 623-630.



Padda M.S. (2006). Phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes [*ipomoea batatas* (L.) Lam]. Dissertation soumise à la faculté des études supérieures de « Louisiana State University » et « Agricultural and Mechanical College » en vue d'obtention du grade de docteur en Philophosie dand le département d'horticulture. 1-109.

Pandey M.M., Govindarajan R., Singh Rawat a. & Pushpangadan p. (2005). Free radical scavenging potential of *saussarea costus*, *acta pharm.* 55 .297–304.

Patton C.J. & Crouch S.R. (1977). Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 49: 464-469.

Payen J.F. (2002). Bases physiopathologiques et évaluation de la douleur (65). Corpus Médical– Faculté de Médecine de Grenoble. 1-15.

Percival M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. p : 1-4.

Perrot S. (2002). Rhumatologie. Ed. Med Line. ISBN : 2-84371-156-8. ISBN : 2-84678-008-0. 18.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R. & Defraigne J.O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. 4. 4. 1-4.

Porter L.J. (1989). Tannins in methods in plant biochemistry. *Academic press, New York*. 1: 200.



Quevauvilliers J., Perlemuter L. & Perlemuter G. (2009). Dictionnaire médical de l'infirmière : L'encyclopédie pratique de référence. Ed. Masson. ISBN : 978-2-294-70276-1. 1137.

Quezel P. & Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition Centre National de la Recherche Scientifique. 2-59.

R

Rasmussen U., Christensen S. B. & Sandberg F. (1978). Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta. Pharm. Suec.* 15(2):133–140.

Rasmussen U., Christensen S. B. & Sandberg F. (1981). Phytochemistry of the genus *Thapsia*. *Planta Med.* 43:336–341.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. 5-217.

Richter G. (1993). Les composés phénoliques. Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Ed. Dunod. 317-339.

S

Shahid I. & Bhanger M.I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of food composition and analysis.* 19: 544-551.

Smith M.J.H., Ford-Hutchinson A.W., Elliot P.N.C. & Bolam J. (1974). Prostaglandin in the anti-inflammatory activity of a human plasma fraction in carrageenan-induced paw oedema in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 26: 692.

Soares A.F. (2005). Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : diponectine et Prostaglandines. Thèse soutenue en vue d'obtention du grade de docteur devant l'Institut National de Lyon. 18-133.

SZABO M.R., IDITOIU C., CHAMBRE D. & LUPEA A.X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chem. Pap.* 61(3) : 214-216.

T

Timbo B. (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL (*MELIACEAE*). Thèse présentée et soutenue publiquement en vue d'obtention du grade de docteur en pharmacie dans la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'université de BAMAKO-MALI. 1-112.

Tombal B., Denmeade S. R. & Isaacs J.T. (2002). Supramicromolar elevation of intracellular calcium precedes the execution phase of apoptosis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 9, 561–73.



Vanhalewyn M. & Cerexhe F. (2004). Recommandations de bonne pratique : La douleur chronique. Société Scientifique de Médecine Générale. 1-40.

Veerappan A., Miyazaki S., Kadarkaraisamy M. & Ranganathan D. (2007). Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant. *Phytomedicine*. 14 : 209–215.

Vilano D. Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Traoncoso A.M. & Garcia-Parrila M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71: 230-235.

Vogel H.G. & Vogel W.H. (1997). Drug discovery evaluation. *Pharmacological assays*. 382.



Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y. & Shibasaki F. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 284:339–43.

Wang L.M. & Mineshita S. (1996). Preventive effects of Unsei-in and Oren-gedokuto, Chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J Pharm Pharmacol*. 48: 327-331.

WHO : World Health Organization (1992). A new understanding chronic pain. *In: Kaplun A, editor. Health promotion and chronic illness. Discovering a new quality of health. Copenhagen: WHO Regional Publications. 141-226.*



Xie D.Y. & Dixon R.A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry*. 66 : 2127–2144.

Glossaires

Glossaire Botanique

Alterne : Les organes d'une plante sont dits alternes lorsqu'ils sont insérés isolément et à des niveaux différents sur une tige ou un rameau.

Angiosperme : Végétal dont les organes reproducteurs sont condensés en une fleur et dont les graines fécondées sont enfermées dans un fruit, à la différence des gymnospermes dont la graine est à nu.

Annuelle : Qualifie une plante qui vit moins d'un an, et qui accomplit donc son cycle de vie en une seule année.

Bisannuelle : Qualifie une plante qui accomplit son cycle de vie en deux années. La première année, la plante développe un appareil végétatif : racines, tiges et feuilles. Puis elle entre en dormance pendant les mois froids. Au printemps/été suivant, la tige de la plante croît fortement, la plante monte en graine. Des fleurs, fruits et graines sont produits. Enfin la plante meurt.

Composée : Qualifie une feuille dont le limbe est découpé en plusieurs petites feuilles dont les folioles.

Cyme : Inflorescence simple définie dans laquelle l'axe principal est terminé par une fleur; cette fleur, qui est la fleur centrale de l'inflorescence fleurit en premier et arrête la croissance de l'axe.

Dicotylédone : Une plante dicotylédone est une plante angiosperme dont la graine dispose, comme son nom l'indique, de deux cotylédons.

Engainante : feuille dont la base ou le pétiole élargi entoure complètement ou une autre feuille ou une tige.

Exstipulé : sans stipule.

Gaine : Unit le limbe ou le pétiole à la tige.

Herbacée : Qualifie une plante herbacée possédant au moins une de ces caractéristiques : fleur, feuille, rameau ou écaille verticillée, feuille réduite à des collerettes et placée les une au dessus des autres et sporanges groupés au sommet de la tige, une tige feuilletée d'au moins 10 cm.

Hermaphrodite: adjectif caractérisant les plantes portant des fleurs avec les organes des deux sexes (étamines et pistil).

Huile essentielle (ou essence végétale) : liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Elle est obtenue par distillation ou extraction chimique par solvants (eau, alcool, etc.).

Inflorescence : est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.

Ombelle : Inflorescence typique des Ombellifères (Apiacées). Les pédoncules floraux sont tous insérés au même point de la tige, et les fleurs sont toutes disposées sur une même surface sphérique.

Palmée : Les folioles sont disposées comme les doigts de la main.

Pennée : Les folioles sont disposées comme les barbes d'une plume.

Résines végétales : Substances naturelles secrétées par certains végétaux. Elles ont l'aspect d'un liquide poisseux qui sèche plus ou moins rapidement au contact de l'air. Elles sont souvent fortement odorantes.

Simple : Qualifie une feuille dont le limbe est entier.

Stipule : petites feuilles ou appendices foliacés de forme diverse, caduque ou persistante, situées à la base du pétiole.

Vivace : Qualifie une plante vivant plus de deux ans, mais qui vit souvent beaucoup plus longtemps, la limite de deux ans étant fixée pour séparer les vivaces des bisannuelles.

Affection : Etat d'un individu en rapport avec la maladie. Elle se caractérise par l'état pathologique d'un organisme, traduisant d'une maladie.

Allodynie : douleur induite par un stimulus qui normalement ne provoque pas de douleur. L'allodynie implique un changement dans la qualité d'une sensation qu'elle soit tactile, thermique ou autre. Il y a donc perte de la spécificité dans une modalité sensorielle donnée : la réponse normale au stimulus n'était pas une sensation de douleur, mais la réponse actuelle l'est. On peut distinguer différentes formes d'allodynie : mécanique, statique (ex. en réponse à une pression tactile douce) ou dynamique (ex. en réponse à un léger frottement), ou thermique (ex. au chaud et au froid). Ces différentes formes peuvent se présenter isolément ou de manière concomitante.

Analgésique = antalgique: variété de médicaments qui permettent d'atténuer, voire de supprimer la douleur.

Antipyrétique : Médicament possédant la capacité de lutter contre l'hyperthermie (élévation de la température).

Athérosclérose : Perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (lipides, essentiellement cholestérol LDL) au niveau d'une des trois tuniques constituant la paroi des artères (l'intima) et intéressant avant tous les grosses et les moyennes artères. La variété de lipides concernée porte le nom d'athérome.

Carcinome (épithélioma) : Tumeur maligne se développant aux dépens des tissus épithéliaux. Les tissus épithéliaux sont des tissus de recouvrement et de protection de la surface de certains organes du corps humain situés à l'extérieur, comme la peau, les muqueuses des orifices naturels, etc... Les tissus épithéliaux constituent également les glandes.

Chimiotactisme : Tendance des cellules et plus particulièrement des leucocytes ou des organismes mobiles à se déplacer dans une direction déterminée sous l'influence de divers stimuli.

Corne dorsale : expansions postérieures substance grise à la fonction sensitive.

Cytokines : Substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire (les lymphocytes T) ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Le terme *cytokine* est peu connu du grand public alors qu'avec les hormones et les neuromédiateurs, ces molécules sont essentielles à la communication de nos cellules.

Dermatite : Maladie de la peau, peut être de contact désignant une réaction cutanée résultant de l'exposition à des substances allergènes ou irritantes.

Douleur spontanée: douleur en absence de stimulation.

Electrophysiologie : Etude des phénomènes électrochimiques qui se produisent dans les cellules des organismes vivants et en particulier, dans les neurones et les fibres musculaires.

Erythème : Lésion dermatologique courante ; caractérisée par une rougeur congestive de la peau, diffuse ou localisée.

Facteur Hageman : (aussi appelé **facteur XII** ou **facteur contact**) : Protéine entrant en jeu dans la gestion de la coagulation du sang.

Fibre nerveuse : Excroissance linéaire de la cellule nerveuse qui transmet les impulsions électriques dans le système nerveux.

Fibrinolyse : Processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins (constitués de fibrine) par la plasmine. Ce processus clôture la coagulation sanguine afin de reperméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses.

Fibroblaste : Cellule présente dans le tissu conjonctif.

Glycolyse aérobie : Voie métabolique au cours de laquelle le glucose est transformé en acétyl-CoA et en gaz carbonique dans les mitochondries en présence d'oxygène, en même temps que de l'énergie est produite.

Glycosaminoglycanes : Hétéropolysaccharides formés par la répétition d'unités disaccharidiques sulfatées.

Hémoglobine : Protéine de structure quaternaire, dont la principale fonction est le transport du dioxygène.

Histamine : Substance présente dans de nombreux tissus de l'organisme sous forme inactive sécrétée par des cellules appartenant à une variété de globules blancs, les polynucléaires basophiles, et les mastocytes, et jouant un rôle de médiateur (qui transfère une information) chimique dans l'hypersensibilité immédiate.

Hyperalgésie par sommation temporelle : un stimulus nociceptif bref (ex. piqûre) mais répété (typiquement 2/s) induit une amplification progressive de la réponse qui se prolonge bien au-delà de la durée de stimulation.

Hyperalgésie primaire : une amplification de la réponse à un stimulus qui normalement évoque une douleur, lorsque ce stimulus est appliqué dans une région lésée. Alors que l'allodynie implique des situations où le stimulus et la réponse appartiennent à deux modalités sensorielles différentes, l'hyperalgésie implique que stimulus et réponse restent dans la même modalité sensorielle.

Hyperalgésie secondaire : une amplification de la réponse à un stimulus qui normalement évoque une douleur, lorsque ce stimulus est appliqué dans une région éloignée de la lésion. Elle s'étend "en nappe d'huile" autour de la région de l'hyperalgésie primaire.

Hyperostose endostale : Maladie osseuse rare, héréditaire, elle débute vers la puberté et se caractérise par une production excessive de l'os, localisée ou diffuse, et un épaissement de l'ensemble du squelette.

Hypophosphatasie : Affection osseuse de nature héréditaire due à l'absence ou à la diminution du taux de phosphatases alcalines dans le plasma entraînant une déminéralisation osseuse.

Kinines : Nom générique qui regroupe plusieurs polypeptides du plasma. Ils ont une action de relâchement de la musculature lisse provoquant une vasodilatation artérielle, ils agissent sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins pour en augmenter leur perméabilité, et ainsi faciliter la migration des leucocytes.

Leucémie : Une maladie appelée également cancer du sang ou leucose aiguë des organes hématopoïétiques (sang, rate, ganglions, moelle osseuse). Elle se caractérise par une sur-production de précurseurs des globules blancs dans la moelle osseuse et le sang.

Maladie d'Alzheimer : Maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire.

Maladie de Parkinson : Maladie neurologique chronique affectant le système nerveux central responsable de troubles essentiellement moteurs d'évolution progressive.

Néoangiogénèse : Formation de nouveaux vaisseaux entraînée par l'expansion d'une tumeur.

Neurochimie : Discipline qui s'intéresse aux phénomènes biochimiques du système nerveux.

Nocicepteur (Récepteur nociceptif) : récepteur sensoriel de la douleur qui fait naître un message nerveux lorsqu'il est stimulé.

Œdème : Il correspond au gonflement d'un organe ou d'un tissu dû à une accumulation ou un excès intratissulaire de liquides dans le milieu interstitiel.

Phlogogène : provoque une inflammation.

Physiopathologie : Discipline biologique qui traite des dérèglements de la physiologie. Elle traite à la fois les mécanismes physiques, cellulaires ou biochimiques qui conduisent à l'apparition d'une maladie et les conséquences de celle-ci.

plasminogène (profibrinolysine) activé en **plasmine (fibrinolysine)** : qui est une enzyme protéolytique qui dégrade la fibrine en produits de dégradation de la fibrine.

Rhumatismes : Ensemble de maladies inflammatoires (arthrite) ou dégénératives (arthroses) portant souvent sur les articulations et toujours douloureuses.

Sérotonine : monoamine servant de neurotransmetteur dans le système nerveux central.

Stomatite : Inflammation de la muqueuse buccale.

Système nerveux central (ou névraxe) : Partie du système nerveux située dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Il se compose de la moelle épinière et l'encéphale, lui-même composé du cerveau, tronc cérébral et du cervelet.

Système Nerveux Parasymphatique : Il agit sur certains organes en les ralentissant, mais également en stimulation le système digestif. Il est associé à un neurotransmetteur : l'acétylcholine.

Système Nerveux Sympathique : contrôle une grande partie des fonctions autonomes du corps humain ex : Battements du cœur et contraction des muscles lisses...etc.

Système neurovégétatif (système nerveux autonome) : Il est constitué des systèmes sympathique et parasympathique et assure le maintien et l'entretien des fonctions vitales.

Tissus conjonctifs : Tissus dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire, impliqués dans les fonctions de soutien, de protection, de mouvement, de réponse immunitaire et de croissance.

Trouble trophique cutané : Lésion de la peau et des tissus situés sous la peau (tendons, muscles...) apparaissant à la suite d'une mauvaise irrigation sanguine.

Trouble vasomoteur : Anomalie de fonctionnement des vaisseaux, concernant les contractions des parois des vaisseaux en modifiant leur calibre et donc la circulation et la pression.

Tumeur maligne : Tumeur capable d'envahir et de détruire les structures qui lui sont adjacentes et qui peut s'étendre à distance par le biais de métastases (cellule se détachant de la tumeur originelle pour proliférer à distance). A l'opposé d'une tumeur bénigne, qui elle, ne détruit pas les structures adjacentes.

Tumeur : Prolifération de cellules nouvelles, composant un tissu pathologique (malade). Ceci est le résultat d'une activité anormale de ces cellules, qui se poursuit sans raison apparente, les cellules ayant tendance à persister ou à augmenter de volume.

Tumorigenèse : Processus impliqués dans la formation d'une ou plusieurs nouvelles tumeurs.

Vasodilatateur : Agent responsable de la dilatation les vaisseaux sanguins, c'est-à-dire d'augmenter leur lumen, en relâchant les muscles lisses des parois de ces vaisseaux contrairement à un vasoconstricteur.

Annexes

Caractéristiques des souris NMRI (Naval Médical Research Institute)

Origine

Il semblerait que ce soit une souris Swiss, transmise par Clara Lynch à Poily en 1937. Il a maintenue en consanguinité jusqu'à la génération 51 avant de la transmettre au Naval Medical Research Institute. Introduite à IFFA CREDO en 1977 à partir de l'élevage du laboratoire Servier.

Caractéristiques

Souris albinos, bonne croissance et non consanguine.

Domaines d'utilisation

Son utilisation est largement répandu, surtout dans les pays de langue allemande et ce pour toutes les disciplines. Depuis quelques années, de nombreux articles font état de l'utilisation de cette souche dans les études du système nerveux central.

Caractéristiques du rat Wistar

Origine

Sélectionnée par H.H.Donaldson au début du siècle au Wistar Institute U.S.A. La souche a été introduite à IFFA CREDO en 1974 à partir d'une colonie entretenue au Zentralinstitut Für Versuchstierzucht de Hanovre qui lui-même, l'avait obtenue en 1964 d'Allington Farm U.K.

Domaines d'utilisation

Souche polyvalente, compte tenu qu'il s'agit de la plus ancienne souche utilisée au laboratoire, toutes les disciplines de la recherche médicale l'ont incluse dans leur protocole.

D'autre part, sa durée de vie ainsi que sa pathologie tumorale font du rat Wistar un modèle intéressant dans les études à très long terme.

Produits chimiques

- 2-amino-2-methyl-1-propanol
- Acétate d'éthyle
- Acétate de sodium
- Acide acétique
- Acide gallique
- Acide ortho phosphorique
- Acide picrique
- Acide sulfurique
- Acide sulphanique
- Acide tannique
- Acide trichloroacétique
- Aspirine
- Caféine
- Carbonate de sodium
- Carragénine
- Chlorure d'aluminium
- Chlorure de potassium
- Chlorure de sodium
- Chlorure ferrique
- Créatinine
- DPPH
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Ethanol
- Ether
- Ether de pétrole
- Ferricyanure de potassium
- Folin ciocalteu
- Hydroxyde de sodium
- Hypochlorite de sodium
- Ions de magnésium
- Méthanol
- Nitrite de sodium
- Paracétamol
- P-nitrophenylphosphate
- Quercétine
- Rats du type wistar
- Souris femelles du type nmri
- Sulfate d'ammonium
- Tampon phosphate
- Tube hépariné
- Urée
- Vanilline

Résumé

Thapsia garganica fait partie de la famille des Apiacées, largement répandues dans le bassin méditerranéen. Ses multiples propriétés biologiques sont dues à sa richesse en substances bioactives. Lors de cette présente étude, notre intérêt s'est porté d'une part, sur la composition phénolique et les activités réductrice et anti-radicalaire des extraits méthanoliques des trois parties de la plante (racines, feuilles et fleurs). Il en ressort que les racines sont plus riches que les deux autres parties en composés phénoliques totaux avec **214,91 mg/100g PS** suivi des fleurs et des feuilles. Les flavonoïdes et anthocyanines sont dominants chez les fleurs, alors que les tannins condensés sont majoritaires chez les racines. Le test du pouvoir réducteur indique une meilleure activité des extraits de feuilles, sachant que ces dernières sont quantitativement les moins riches en composés phénoliques. De même pour l'effet scavenger contre le radical DPPH, avec des **IC50** de **9,98 ; 10,08 et 19,32 mg/100ml** pour les feuilles, les fleurs et les racines respectivement. D'une autre part, les tests de toxicité aiguë classent les infusions des trois parties de la plante dans les catégories des substances « pratiquement non toxique » ou « relativement sans danger » soit une **DL 50 > 10g/Kg**. Les résultats de la toxicité subaiguë à **1g/Kg** révèlent une élévation du taux de la transaminase « **ASAT** » chez les trois lots ayant reçu les infusions de *Thapsia garganica* et une élévation du taux de l'urée sanguine chez les lots ayant reçu des préparations à base de racines et de feuilles. Il en résulte également que ces infusions exercent un effet pro-inflammatoire et analgésique.

Mots clés : *Thapsia garganica*, composés phénoliques, activité antioxydant, toxicité aiguë, toxicité subaiguë, activité inflammatoire, activité analgésique.

Abstract :

Thapsia garganica belongs of the family of the Apiaceae, widespread in the Mediterranean. They have several various biological properties which are due to their richness in bioactive substances. In this study, our interest has been, the one hand, to the phenolic composition, reducing power and **DPPH** radical scavenging of methanolic extracts of the three plant parts (roots, leaves and flowers). It shows that the roots are richer than the other two parts with total phenolic **214.91 mg/100g DW**, tracking flowers and leaves. Flavonoids and anthocyanins in flowers are dominant, while condensed tannins are a majority in the roots. The test of reducing power indicates greater activity of the extracts of leaves, knowing that they are quantitatively less rich in phenolic compounds. Similarly to the scavenger effect against **DPPH** radical with **IC50** of **9.98, 10.08 and 19.32 mg/100 ml** for the leaves, flowers and roots, respectively. On the other hand, acute toxicity tests classify infusions of the three parts of the plant substances in the categories of "practically nontoxic" or "relatively safe" with **LD 50 > 10 g / Kg**. The results of subacute toxicity at **1 g / Kg** showed elevated levels of transaminase "**AST**" in the three groups that received infusions of *Thapsia garganica* and elevated blood urea in the lots receiving preparations from roots and leaves. It also follows that these infusions exert a pro-inflammatory and analgesic effect.

Keywords: *Thapsia garganica*, phenolics, antioxidant activity, acute toxicity, subacute toxicity, inflammatory activity, analgesic activity.

ملخص :

Thapsia garganica هو جزء من أسرة **Apiaceae** ، واسعة الانتشار في منطقة البحر الأبيض المتوسط. خصائصها البيولوجية متعددة نظرا لغناها بالمواد النشطة بيولوجيا. في هذه الدراسة ، تم دراسة من ناحية ، مجموعة متعددة الفينولية والأنشطة قوة الارجاع الحديد و قوة تثبيط الجذر الحر **DPPH** لمستخلصات المتانولية لثلاثة أجزاء النبات (الجذور والأوراق والازهار). تبين النتائج أن الجذور أكثر ثراء من مجموعة متعددة الفينولية على الأجزاء الأخرى **214,91مغ/100** غ تتبع الازهار والأوراق. مركبات الفلافونويد والانتوسيانين في الازهار هي السائدة ، في حين مكثف التانين سائد في الجذور. اختبار قوة الارجاع يشير إلى المزيد من النشاط لمستخلصات الأوراق ، مع العلم أنهم من الناحية الكمية أقل غناء في المركبات الفينولية. على نحو مماثل قوة تثبيط الجذر الحر **DPPH** مع **IC50** **9,98 و 10,08 و 19,32** مغ / 100مل للأوراق الأزهار والجذور ، على التوالي. من ناحية أخرى ، اختبارات **toxicité aiguë** تصنف دفعات من الأجزاء الثلاثة من المواد النباتية في فئتي "غير سام عمليا" أو "أمنة نسبيا" **DL50 < 10** غ / كغ. وأظهرت نتائج **toxicité aiguë** **1** مغ / كغ مستويات مرتفعة من ناقلة اللامين « **ASAT** » بين المجموعات الثلاث التي تلقت دفعات من *Thapsia garganica* وارتفاع اليوريا في الدم في المجموعات التي تلقت الاستعدادات من الجذور والأوراق. تشير هذه الدراسة أن الاستعدادات لها تأثير على ممارسة نشاط الالتهابات والمسكنات.

مفتاح الكلمات : *Thapsia garganica* ، متعددة الفينولية ، نشاط مضادات الأكسدة ، **toxicité aiguë** ، **toxicité aiguë** ، النشاط الالتهابات ، النشاط المسكن.