

Remerciement

Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous a protégé, soutenu et surtout donné la foi qui nous a guidé à la réalisation de ce travail, nous nous inclinons pour dire « Dieu merci »

Nous tenons à remercier

- ❖ *Notre promoteur M_R TACHARFIOUT M. de nous avoir confié ce thème et pour ses conseils et orientations.*
- ❖ *Notre Co promoteur M_r BELMOUHOUB M.*
- ❖ *Mesdames et Messieurs les membres de jury: Mme BAKDI H., M_r GHIDOUCHE A. et Melle TAHIRI O. qui nous feront l'honneur de juger notre travail.*
- ❖ *Nous tenons à exprimer notre reconnaissance au directeur du centre de Recherche et de Développement (CRD) du groupe, Saida, AL- Mohammadia, Alger, au responsable du laboratoire de pharmacotoxicologie: M^{me} DJABRI et M^{me} SAHRAHOUI pour leurs conseils et orientations, ainsi qu'à tout le personnel.*
- ❖ *Nous remercions également le directeur de l'institut Pasteur d'Alger, et la responsable du laboratoire d'histopathologie Pr BENALI pour leur aide durant l'interprétation des résultats des coupes histologiques.*
- ❖ *Sans oublier M^{me} HALAL et Dr CHABOUT du CHU de Bejaia pour leur aide durant la réalisation des coupes histologiques.*

AOUGHLIS S. et MAZARI N.

dedicace

Avant tout, j'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mes très chers parents qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances et qui n'ont pas cessé de m'encourager durant toutes mes études.

A mes grands-parents, puisse l'Éternel vous récompenser et vous garder longtemps parmi nous

A mes chers frères : Idir, tarek, laldja.

A mon cher mari Hamza.

A mes chers amis : Sara, Fahima, Loubna, Nawel , Lynda, Riad et Abdou

*A mon binôme Nesrine et à tous mes amis sans oublier bien sûr la promo
Biochimie Appliquée 2013/2014*

Safia

dedicace

A la mémoire de mes grands parents

Avant tout, j'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mes très chers parents qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances et qui n'ont pas cessé de m'encourager durant toutes mes études.

A mes grands-parents, puisse l'Eternel vous récompenser et vous garder longtemps parmi nous

A mon cher frère Yacine qui a toujours su me faire confiance.

A mon cher fiancé pour son soutien et sa patience.

A ma tante Salima et A mes chères cousines Fadila, Hafsa, Souad, Imène et à toute ma famille.

A ma belle-mère et à mes deux belles sœurs.

A mes meilleurs amis (es): Sara, Fahima, Loubna , Riad , massilia et Abdou

A monsieur Khelfaoui qui m'a toujours soutenue.

*A mon binôme Safia et à tous mes amis sans oublier bien sûr la promo
Biochimie Appliquée 2013/2014*

Nesrine

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA- Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie Physico-chimique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme

De Master

En Biologie ; Option : Biochimie Appliquée

Thème :

**Etude de la toxicité sub- chronique de l'extrait
méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur des rats WISTAR**

Présenté par :

M^{lle} : AOUGHLIS Safia

M^{lle} : MAZARI Nesrine

Membre du Jury :

Présidente : M^{me} BAKDI H.

(M.A.A.) Université de Bejaïa

Promoteur: M^r TACHARFIOUT M.

(M.A.A.) Université de Bejaïa

Co-promoteur M^r BELMOUHOUB M.

(M.A.A.) Université de Constantine

Examineur : M^r GHIDOUCHE A.

(M.C.B.) Université de Bejaïa

Examinatrice: M^{lle} TAHIRI O.

(M.A.A.) Université de Bejaïa

2013-2014

Sommaire

- ❖ Liste des abréviations
- ❖ Liste des figures
- ❖ Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur de <i>Rhamnus alaternus</i>	2
I-1 Description de <i>Rhamnus alaternus</i>	2
I-2 Classification de <i>Rhamnus alaternus</i>	3
I-3-Nom vernaculaire	3
I-4 Composition chimique.....	4
I-5 Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	5
I-6 Activité biologique.....	6
Chapitre II : Généralités sur la toxicité.....	8
II-1 Généralités.....	8
II-1-1 Toxicité aigüe	9
II-1-2 Toxicité subaigüe	9
II-1-3 Toxicité chronique	9
II-2 Foie et Hépatotoxicité.....	10
II-2-1 Morphologie et physiologie du foie	10
II-2-2 Hépatotoxicité	11
II-2-3 Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique.....	11
II-3 Rein et néphrotoxicité	13
II-3-1 Morphologie et physiologie du rein	13
II-3-2 Marqueurs biochimiques de la fonction rénale.....	15
Chapitre III : Matériel et méthodes	17
III-1 Préparation du matériel végétal	17
III-2 Extraction	17
III-3 Matériel animal	18
III-4 Etude de toxicité sub-chronique.....	19
III-5 Bilan biochimique sanguin.....	20
III-5-1 Paramètres hépatiques.....	20
III-5-1-1 Dosage de transaminases ALAT et ASAT	20
III-5-1-2 Dosage de la bilirubine.....	22
III-5-2 Paramètres néphrétiques	22
III-5-2-1 Dosage de l'urée.....	22
III-5-2-2 Dosage de la créatinine.....	23

III-5-3 Dosage du glucose	24
III-6 Etude histopathologique	25
III-6-1 Prélèvement des organes	25
III-6-2 Fixation.....	25
III-6-3 Lavage déshydratation et éclaircissement	26
III-6-4 Enrobage à la paraffine et confection des bloques.....	26
III-6-5 Déparaffinage et coloration.....	27
III-6-6 Visualisation microscopique	28
III-6-7-Analyse statistique.....	28
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	29
IV-1 Evolution du poids corporel.....	29
IV-2 Poids des organes.....	29
IV-3 Paramètres biochimiques	31
IV-3-1 Paramètres hépatiques	31
IV-3-2 Paramètres néphrétiques.....	33
IV-3-2-3 La glycémie	36
IV-4 Etude histopathologique.....	37
IV-4-1 Etude histopathologique du foie	37
IV-4-2 Etude histopathologique des reins.....	37
Conclusion et perspectives.....	39

- ❖ *Références bibliographiques.*
- ❖ *Glossaire.*
- ❖ *Annexe.*

Liste des figures

Figure	Titre	page
01	Feuilles, Fruits et fleurs de <i>Rhamnus alaternus</i>	02
02	Structure des anthraquinones	04
03	Coupe longitudinale du foie	10
04	Structure de la bilirubine	12
05	Coupe frontale d'un rein	14
06	Structure chimique de la créatinine	15
07	Structure chimique de l'urée	16
08	Feuilles fraîches, séchées et poudre de <i>Rhamnus alaternus</i>	17
09	Des rats WISTAR femelles dans des cages inoxydables	18
10	Administration orale d'un ml/ rat / jour	19
11	<i>Prélèvement sanguin</i>	20
12	La dissection des rats	25
13	Préparation des cassettes	26
14	Les étapes d'inclusion par automate	27
15	Distribution de paraffine et réalisation des coupes au microtome	28
16	<i>Coloration des coupes</i>	29
17	Variation du poids corporel des différents lots	30
18	Poids des organes des différents lots	31
19	Taux de GPT (ALAT) chez les 3 lots	31
20	Taux de GOT (ASAT) chez les 3 lots	33
21	La concentration de la bilirubine totale et directe chez les 3 lots	33
22	Taux de créatinine sérique chez les 3 lots	34
23	Taux de l'urée chez les 3 lots	33
24	Taux de Glucose sanguin chez les 3 lots	34

Liste des figures

25	Coupe histologique du foie des rats témoins	36
26	Coupe histologique du foie des rats traités par 200mg/Kg/jour	36
27	Coupe histologique du foie des rats 400mg/Kg/jour	36
28	Coupe histologique du rein d'un rat témoin	38
29	Coupe histologique du rein traité par 200 mg/Kg/jour	38
30	Coupe histologique du rein traité par 200mg/Kg/jour	38

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	page
I	Classification botanique de Rhamnus alaternus	03
II	Classe de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner chez les rats de laboratoire	08

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo- Nucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT : Aspartat aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

BH : Bilan hépatique

DL50: Dose létale 50

EM : Extrait méthanolique

GOD: Glucose Oxydase

GOT: Glutamate oxaloacétate

GPT: Glutamate Pyruvate Transaminase-

LDH: Lactate- Déshydrogénase

MDH: Malate- Déshydrogénase

NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

OCDE : Organisation pour coopération et développement

ONAB: Office National d'Aliment de Bétails

POD : Peroxydase

Introduction

L'utilisation de la phytothérapie date depuis les premières années de l'évolution de l'homme, et il a été estimé que la majorité de la population du monde dépend toujours principalement de la médecine traditionnelle et du traitement comportant l'utilisation des extraits des plantes (**Marchall et Bangret., 2005**). Cependant, Les effets indésirables dus aux végétaux doivent stimuler la vigilance et l'étude de leur toxicité (**Fourasté, 2000**).

Rhamnus alaternus est l'une des herbes appartenant à la famille botanique des Rhamnaceae ; c'est l'une des plantes les plus célèbres connue dans le bassin méditerranéen pour ses propriétés guérissantes depuis l'antiquité ; elle a été utilisée contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqués par le paludisme (**Ait youssef, 2006**).

Peu d'études ont fait l'objet de déceler les différents constituants chimiques de cette espèce à savoir les anthraquinones, les tannins, les coumarines et les flavonoïdes (**Bekemieir et al., 2004**). Cependant, à nos connaissances, aucun travail n'a été porté sur la toxicité de l'extrait des feuilles de *Rhamnus alaternus*.

La présente étude a été réalisée sur des rats Wistar femelles. Son objectif est de contribuer à l'appréciation de la toxicité de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*, notamment sur deux organes ; le foie et le rein.

Le manuscrit est divisé en 04 chapitres : le premier récapitule l'ensemble des informations bibliographiques sur la plante, ses composés et ses effets. Le deuxième résume des généralités sur la toxicité hépatique et néphrétique. Le troisième, décrit le travail expérimental réalisé ; d'une part, pour expliquer les étapes de l'extraction à partir de ces feuilles et d'autre part, mettre le point sur le protocole à suivre durant l'expérimentation .Enfin, le quatrième chapitre trace et traite les résultats obtenus.

I-1-Description de *Rhamnus alaternus*

Rhamnus alaternus L. est une espèce végétale qui appartient à la famille des *Rhamnaceae*, les plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle et en préparation culinaire, c'est une famille cosmopolite d'arbres, arbustes et herbacées qui contient environ 50 genres et 900 espèces (**Richardson et al., 2000**). *R. alaternus* habite les coteaux secs et calcaires de l'Algérie, du Nord de la Tunisie et du Sud de la France (**Ben Ammar et al., 2008 ; Chancerel, 1920**). C'est un Arbuste toujours vert, parfois très grand, à feuilles luisantes, ovoïdes ou lancéolées, sont alternes, lisses. Elles restent sur l'arbre pendant deux années environ (**Battandier et al., 1888**). La croissance de *R. alaternus* est lente et sa longévité est considérable ; son bois est à fibre courte et cassante, très lourd, très homogène, d'un grain fin. Leur tiges sont dressées et rameuses ; les rameaux sont alternes, non épineux (**Chancerel, 1920**).

Elle produit des fruits charnus, drupe mûr, sa surface est d'abord rouge, puis devient noire à la maturité, chaque fruit a 2-5 graines, ayant une forme triangulaires de 2,5mm de largeur 4,6 mm de longueur et d'un poids environ 9mg (**Bas et al., 2009**). La maturation s'effectue entre avril et août (**Aronne et Wilcock, 1995**).



Figure 01 : feuilles, fruit et fleurs de *Rhamnus alaternus* (**Aronne et wilcock, 1995**)

I-2-Classification

Rhamnus alaternus appartient à la classe des Magnoliopsida-Dicotylédones, à la famille des Rhamnaceae et au genre *Rhamnus*. La classification botanique complète de la plante est représentée dans le tableau I

Tableau I : Classification botanique de *Rhamnus alaternus* (Yi-ling et Pan-kai, 1982)

Taxon	Nom
Domaine	Eukaryota- eucaryote
Règne	Plantae-Végétal
Sous règne	Viridiaeplantae- Plantes vertes
Règne	Magnoliophyta- plantes à fleurs
Sous phylum	Spermatophytina-plantes à graines
Infraphylum	Angiospermae-Angiosperme
Classe	Magnoliopsida-Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Super ordre	Rhamnanae
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i>

I-3-Nom vernaculaire

Le nom de genre *Rhamnus* provient du grec *rhamnos*, nom du Nerprun purgatif et le nom d'espèce *alaternus* est l'ancien nom latin de la plante. En Arabe : Am'lile'ce, M'lila, Soitfair, ould El-Khir ou bien Safir. En Kabyle : Mélilés (**Bhourri et al., 2012, Debeau, 1984**). En Anglais : Buckthorn, en Français : Neprun, en Allemand : Kreuldorn en espagnol Aladierna, cosco unia, sanguinode Andalucia et en Italien Alaterno, Legno puzzo (**Gubb, 1913**).

I-4- Composition chimique

Rhamnus alaternus est constitué principalement de composés phénoliques qui sont largement distribués chez les végétaux et dans toutes les parties supérieures (tige, racine fleur, pollens, fruits, graines et bois) (Lugasi et al., 2003). Les polyphénols sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ; ou la maturation des fruits (Han et al., 2007). L'étude photochimique sur les extraits de la partie aérienne et les racines de *R. alaternus* a révélé la présence de diverses quantités d'antraquinones, coumarines, de tannins et en particuliers des flavonoïdes (Ben Ammar et al. 2008).

Rhamnus alaternus contient des anthraquinones telles que l'emodine ou chrisophanol alaternin et physcion qui sont les quatre anthraquinones aglycones isolés à partir des parties aériennes de *Rhamnus alaternus* (Wei et al., 1992 ; Izhaki et al., 2002). Les Anthraquinone sont insolubles dans l'eau et doivent être dissoutes dans l'éthanol ou d'autres solvants (Pirou et al., 1998). Leur noyau est polycyclique, comportant deux cycles benzéniques condensés avec des groupes carbonyle dans les positions 9 et 10 (figure 02) (Fieser et al., 1935).

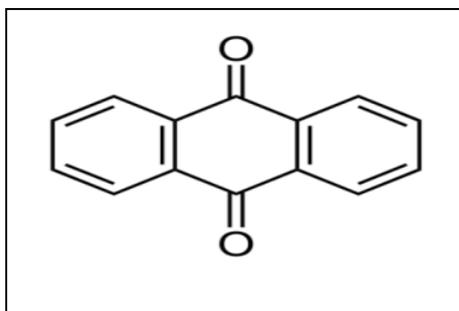


Figure 02 : structure des anthraquinone (Wei et al., 1992),

Rhamnus alaternus contient des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation ; Ce sont des substances constituées par un mélange de glucosides et d'acide gallique, on les rencontre, en petite quantité dans de très nombreuses plantes (Boizot et Charpentier., 2006).

Elle contient aussi des flavonoïdes glycosylés tel que kaempferol 3-O-Bisorhamninoside, rhamnocitrin 3-O-B-isorhamninoside et rhamnetin-3-O-B-isorhamninoside (**Ban Ammar et al., 2009**), et des flavonoïdes aglycones comme le kaempferol, quercétine et l'apigénine (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009**). Elle est aussi riche en flavones hétérosides (**Stocker et al., 2004**) et coumarines (**Ben Ammar et al., 2005**).

La pluie de *R. alaternus* est composée principalement d'eau (68%), de minéraux (Fe, Zn, Mn, K, Na, Ca, Mg, P, Cu) dont le plus abondant est le K (12.90%), de lipides, protéines et de fibres (cellulose, hemicellulose et lignine). Les fruits relativement volumineux de *Rhamnus alaternus* contiennent plus d'eau et de Phosphore, les fruits de taille intermédiaire contiennent plus de lipides, Magnésium et de Calcium et les fruits plus petits contiennent plus de protéines, Potassium et zinc. Des données prouvent que la pulpe de fruit contient toujours moins d'emodin que les feuilles (**Izhaki et al., 2002**).

I-5-Utilisation dans la médecine traditionnelle

R. alaternus est l'une des espèces utilisées généralement dans le programme de reboisement dans la méditerranée, en raison de sa capacité de survivre dans les environnements xériques (**Gulias et al., 2004**). Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L étaient utilisées en Algérie- dans le constantinois, contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqué par le paludisme. Le bois ou l'écorce de *Rhamnus alaternus* L est employé dans l'est du Maroc, en décocté et dans un bouillon de viande pour traiter des affections hépatiques. Le fruit était utilisé en Algérie comme purgatif doux ; au Maroc- dans le Haut Atlas et le Moyen Atlas, il est toujours employé comme laxatif (**Ait Youssef, 2006**). Le fruit de *R. alaternus* représente aussi une source important d'eau d'éléments nutritifs (**Izhaki et al., 2002 ; Gulias et al., 2004**). Ses feuilles émettent des petites quantités de l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiene) qui affectent l'oxydation de l'atmosphère en nettoyant les radicaux OH, et peut indirectement influencer sur l'accumulation du méthane atmosphérique, et surtout protège les feuilles contre la photooxydation en réagissant avec O₂ produit lors de la photosynthèse (**Affek et Yakir, 2002**).

L'espèce *Rhamnus alaternus* L comme une bonne source d'antraglucosides. L'écorce des racines ou des tiges (rameaux) sont riche en dérivés anthracénitique. Les feuilles en sont également riches et les fruits en contiennent probablement aussi. Cette richesse rend parfaitement compte des propriétés laxatives et surtout purgatives de toutes les parties utilisées (**Ait Youssef, 2006**).

L'émodine produit sur la surface des feuilles à plusieurs activités biologiques. Il peut protéger la plante contre les effets nocifs de la lumière UV, comprenant aussi des effets purgatifs chez l'homme, et effets allélopathie, antibactériens et antifongiques (**Izhaki et al., 2002**). Cette plante est efficace dans le traitement des complications hépatique et certaines affections dermatologiques (**Ben Ammar et al., 2009**). D'autres indications sont rapportées comme le traitement des brûlures, d'odontalgie et pour le soin oculaire (**Ben Ammar et al., 2008**).

I-6-Activité biologique

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Rhamnus alaternus*, notamment sur les effets dus aux extraits de cette plante (**Ghedira, 2006**).

I-6-1-Effets antimicrobien

L'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* exercent une activité antimicrobienne contre une large gamme des microorganismes, particulièrement les bactéries résistantes aux multiples antibiotiques (**Percival, 2004**). L'EM de *Rhamnus alaternus* inhibe la croissance des bactéries Gram⁺ représentées par, *Staphylococcus aureus*, et Gram – représentées par *Escherichia coli* et sur une levure, *Candida albicans* (**Mashhadian et Rakhshandeh, 2005**).

I-6-2-Activité antioxydante

Des études in vitro ont démontré le potentiel antioxydant des flavonoïdes isolés à partir des feuilles de *Rhamnus alaternus* tel que les propriétés de piégeage des radicaux libres (DPPH), l'inhibition de la peroxydation des lipides et la chélation des cations divalents ainsi les espèces réactives de l'oxygène (**Ben Ammar et al., 2008 ; Ben Ammar et al., 2009**)

I-6-3-Activité antimutagène

L'effort oxydant provoqué par des espèces réactives de l'oxygène induit l'oxydation des biomolécules menant aux dommages cellulaires (**Ben Ammar et al., 2008**). L'extrait organique de *R. alaternus* a une propriété antimutagène qui se traduit par l'inhibition des agents mutagène (Aflatoxine B1) qui pourrait être due à l'abondance des flavonoïdes et des tannins (**Ben Ammar et al., 2005 ; Ben Ammar et al., 2007**).

I-6-4-Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* possèdent des activités anti-inflammatoires. Ces activités sont corrélées avec la composition en polyphénols surtout en flavonoïdes, tannins et les anthraquinones tels que l'émodyne, cette propriété est due principalement à leurs activités de piégeage des radicaux libre (**Ben Ammar et al., 2005**).

I-6-5- Activité anti-enzymatique

Des études in vitro ont montré que les extraits organiques de *R. alaternus* inhibent significativement l'activité des carboxyl estérases, enzymes largement distribuées dans les tissus animaux, essentiellement impliqués dans le catabolisme du nombreux xénobiotiques, tels que des carboxylesters, des thio-esters et des amides aromatiques. Cette propriété inhibitrice est attribuée aux flavonoïdes qui exercent une activité non compétitive (**Stocker et al., 2004**).

II-1-Généralités

On s'accorde généralement pour donner au mot toxicologie une origine grecque « Toxicon » désignant un arc et surtout les flèches empoisonnées dont certaines peuplades faisaient usage pour tuer efficacement leurs ennemis ; On connaît le père de toxicologie Paracelse et sa phrase célèbre « c'est la dose qui détermine si une chose est un poison » (**Lauwerys, 1999**). Le célèbre physiologiste Claude Bernard avait en effet observé qu'en plus de leur utilisation pour détruire la vie ou pour guérir, les poisons constituent un outil précieux dans les mains des physiologistes, en permettant l'étude des phénomènes causant la mort ceux-ci permettrait en même temps de comprendre les mécanismes physiologiques de la vie (**Gallo et Doull, 1991**).

La toxicologie est depuis longtemps reconnue comme étant la science des poisons c'est-à-dire qu'elle étudie les effets néfastes d'un xenobiotique sur les organismes vivants ; elle englobe une multitude de connaissances scientifiques et s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine et à différents environnements (**Frank, 1992**). Le toxique est un composé qui peut nuire à la santé des organismes vivants, en particulier à celle des hommes. L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose. Selon leur origine, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxines) provenant des microorganismes, des plantes ou des animaux (**Reichl, 2004**). Toute substance est un poison et aucune n'est inoffensive, c'est simplement la dose qui fait qu'une substance n'est pas toxique (**Heinz et al., 2006**).

Tableau II : Classe de toxicité selon l'échelle de Hodge et Sterner chez les rats de laboratoire (**Hodge et Sterner, 1949**)

DL50 orale	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	1 = extrêmement toxique
1 à 50 mg/kg	2 = hautement toxique
50 à 500 mg/kg	3 = modérément toxique
500 à 5000 mg/kg	4 = légèrement toxique
5000 à 15000 mg/kg	5 = Presque pas toxique
Plus de 15000 mg/kg	6 = relativement inoffensif

La toxicité est la capacité d'une substance de produire un effet délétère sur l'organisme, elle peut être modifiée par l'exposition préalable, simultanée, ou consécutive à une autre substance (**Lauwerys, 1992**). Les effets d'une substance peuvent soit s'additionner (synergie additive) ou s'amplifier (potentialisation), soit au contraire se combattre (**Bruneton, 1999**). On distingue classiquement trois formes essentielles de toxicité : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme subaiguë ou subchronique et la toxicité à long terme ou chronique (**Viala et Botta, 2007**).

II-1-1-Toxicité aiguë

La toxicité aiguë résulte par une administration unique, c'est une toxicité qui résulte de l'absorption d'une dose relativement élevée d'un xénobiotique en une seule fois ou en plusieurs fois très rapprochées (en moins de 24h), l'effet toxique peut se manifester en peu de temps après l'absorption du toxique, il s'agit d'une toxicité immédiate, soit après un temps de latence plus en moins long, il s'agit alors d'une toxicité médiate (**Dutertre et al., 2001**). La toxicité relative des produits est caractérisée par une valeur : la dose létale 50 (DL₅₀) (Tableau II) (**Claverie et Hedde, 2008**). On considère qu'il y a intoxication aiguë lorsque des effets biologiques surviennent après une période d'exposition à un contaminant ne dépassant pas 24h (**Winder et al., 1997**).

II-1-2-Toxicité subaiguë

Le toxique est administré plusieurs fois pendant une période plus longue n'excédant pas trois mois ; ce type de toxicité est employé pour définir les organes et les fonctions touchées par ce toxique (**Wipierre, 1981 ; Claverie et Hedde, 2008**).

II-1-3-Toxicité chronique

C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et de leur apparition en fonction du temps après administrations répétées de la substance, pendant un temps suffisamment long à faible dose de toxique, supérieur à 90 jours (**Dutertre et al., 2001**).

II-2- Foie et Hépatotoxicité

II-2-1- Morphologie et physiologie du foie

Le foie est un organe abdominal unique et asymétrique situé dans l'hypocondre droit et est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) dont l'unité fonctionnelle est le lobule hépatique, il est divisé en secteurs, eux-mêmes subdivisés en segments et c'est le plus volumineux des viscères humains (2 % du poids corporel avec une moyenne de 1500 g chez l'homme) (Couinaud, 1957). C'est l'organe effectuant le plus grand nombre de transformations chimiques ; ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (artère hépatique) qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie. Environ 80 % des cellules hépatiques sont des hépatocytes mais il existe d'autres types cellulaires (cellules des canaux biliaires, cellules endothéliales, cellules de macrophages) (Kutcher et al., 1995). Le foie est classiquement considéré comme un organe en parallèle, chaque unité étant constituée par les lobules sécrétoires (Jackson, 1995). Cet organe a une couleur rouge marron, ses cellules sécrètent une substance qui est la bile (Ramé et Thérond, 2007).

Le foie est un organe très richement vascularisé et joue un rôle important dans différents métabolismes (glucidique, lipidique et protéiques). Il joue aussi un rôle clé dans l'élimination des déchets endogènes ainsi que l'élimination des médicaments, xénobiotiques et toxines (Viala et Botta, 2007).

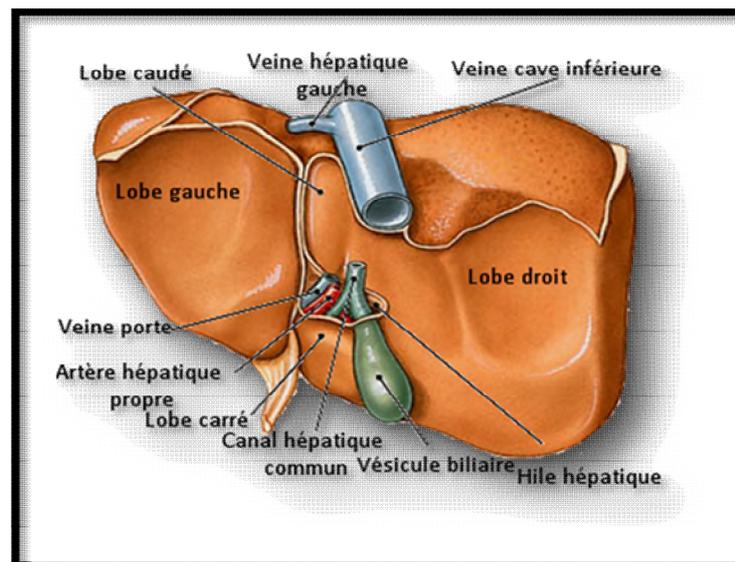


Figure 3 Schémas d'un foie (Marchall et Bangert,2005).

II-2-2- Hépatotoxicité

Le foie est l'un des cinq organes cibles les plus communs de toxicité, à la fois aiguë et chronique pendant des doses répétées (**Van Delft et al., 2014**). Le foie est aussi responsable de l'entretien des fonctions métaboliques ainsi que la détoxification des défis exogènes et endogènes. L'implication du foie dans la toxicité induite par des molécules administrées par l'organisme dépend de sa localisation anatomique, physiologique et biochimique, ces molécules à des surdoses ou même à doses thérapeutiques peuvent provoquer des lésions hépatiques chez les personnes sensibles. Ces molécules produisent des lésions hépatocellulaires qui peuvent se manifester par certaines pathologies, y compris l'hépatite, la cirrhose, l'inflammation, la phospholipidose, Cholestase et la stéatose ...etc. ses dernières sont la cause la plus fréquente de dysfonction hépatique (**Deepa et al., 2014**).

Lorsque le foie est endommagé par atteinte virale ou toxique, les fonctions citées ci-dessus peuvent être compromises. L'insuffisance chronique est due à un facteur précipitant compliquant une maladie préexistante. Les insuffisances aiguës peuvent être d'origine toxique ou virale, accompagnées d'une perte massive d'hépatocytes chez des individus préalablement sains. La forme la plus sévère est l'insuffisance hépatique fulminante (**Holt, 1999**).

La toxicité hépatique humaine n'a été estimée qu'à 50% et pourrait être utilisée qu'à l'aide de modèles animaux, c'est une pathologie provoquée par l'exposition du foie à un médicament ou un autre agent qui endommage la fonction du foie ou la mort cellulaire. L'hépatotoxicité expérimentale sur les animaux entiers est essentielle pour démontrer que le médicament, la substance ou l'extrait en étude induit un effet négatif sur le foie (**Zimmerman, 1999**). Le résultat des lésions induites par la substance toxique dépend de l'interaction entre le processus de lésion du foie et de la prolifération cellulaire et la régénération tissulaire compensatoire, nommée la réparation du foie (**Mehendale, 2005**).

II-2-3- Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

Habituellement, le Bilant hépatique « BH » comprend des dosages de substances sanguines qui apportent simplement une orientation sur l'existence, l'ampleur et le type d'une lésion hépatique. Une demande de BH consiste à doser la bilirubine, les transaminases et la phosphatase alcaline (**Gaw et al., 2004**).

II-2-3-1- Bilirubine

La bilirubine est le principal produit résultant de la dégradation des vieux globules rouges. Les globules rouges libèrent de l'hémoglobine, la portion « hème » est par la suite décomposée en bilirubine (Tim Teeter, 2005). On distingue la bilirubine libre non conjuguée qui est insoluble dans l'eau est donc prise en charge par le transporteur non spécifique du plasma, le sérum albumine. Cette dernière est captée par les cellules hépatiques pour être conjuguée pour former des mono et des di glucuronides qui sont beaucoup plus solubles dans l'eau que la bilirubine libre non conjuguée. La bilirubine conjuguée est éliminée dans la bile (Gaw et al., 2004).

Lorsque la fonction hépatique est endommagée, comme dans le cas d'une hépatite aiguë ou de la phase finale d'une maladie du foie, la bilirubine s'accumule dans le sang et entraîne le jaunissement de la peau et des yeux, cette condition s'appelle la jaunisse. La bilirubine est souvent indiquée comme totale, indirecte (la quantité de bilirubine non conjuguée) et directe (la quantité de bilirubine conjuguée qui est ensuite excrétée des cellules du foie.) La quantité totale normale de bilirubine est de 0,1 à 1,2 mg/dL. (Tim Teeter, 2005).

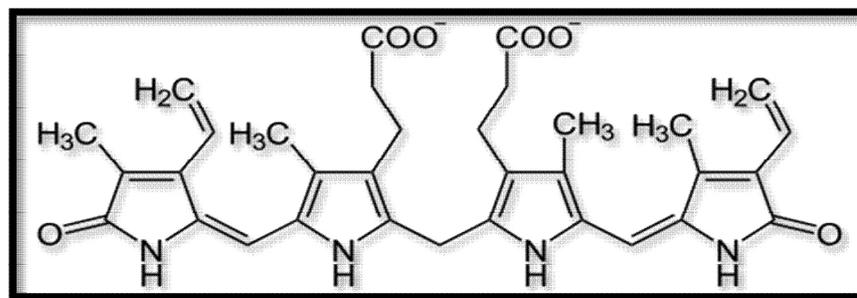


Figure 4 : structure de la bilirubine. (Horsfall et al., 2012).

II-2-3-2- Transaminases

Ces enzymes se trouvent normalement dans le sérum en faible quantité et à des taux bien déterminés. Dès qu'un organe ou un tissu est endommagé, il libère dans la circulation générale des enzymes qui lui sont propres. Par exemple, pour déterminer l'organe lésé, au lieu de faire une biopsie d'organe, il est beaucoup plus facile et confortable pour le patient une prise de sang (Valdigué, 2000).

L'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) est plus spécifique du foie que l'aspartate aminotransférase (ASAT), son taux plasmatique augmente jusqu'à 20 fois de son taux normal lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus élevé qu'à la normale, qui est souvent causé par l'hépatite, un surdosage de médicament, un choc, une hypoxie sévère ou une insuffisance cardiaque aiguë...etc. L'aspartate aminotransférase (ASAT) est une enzyme similaire à l'ALAT. Le niveau normal de ces enzymes varie de 0 à 37 UI/L (**Gaw et al., 2004**).

II-3- Rein et néphrotoxicité

II-3-1- Morphologie et physiologie du rein

Les reins sont des organes pairs de couleur rougeâtre en forme d'haricot mesurant 12 cm de longueur, 06 cm de largeur et 03 cm d'épaisseur chez l'homme. Ils sont situés de part et d'autre dans la colonne vertébrale dans le tissu rétropéritonéal, allant de la 11^{ème} dorsale jusqu'à la 2^{ème} vertèbre lombaire. Ils sont vascularisés par l'artère rénale qui naît de l'aorte, et par la veine rénale qui se jette dans la veine cave. Morphologiquement, topographiquement, les reins ne sont pas exactement symétriques. Le rein droit est situé plus bas, le rein gauche souvent un peu plus volumineux et un peu moins large et plus allongé. La face latérale du rein est convexe, tandis que sa face médiale est concave et porte une échancrure appelée : le hile rénal. (**Pellet, 1977 ; Dalmas et al., 2009**).

Chaque rein contient plus d'un million de minuscules néphrons qui sont des unités structurales et fonctionnelles qui assurent la formation de l'urine (**Marieb, 2008**). Une des fonctions essentielles du rein est de contrôler l'élimination du sel et de l'eau et donc d'éliminer les variations du volume et de l'osmolarité du milieu extracellulaire. Ils maintiennent la concentration du K⁺ extracellulaire et le pH sanguin constant et jouent un rôle dans le métabolisme (dégradations des protéines et des peptides) et dans la synthèse de certaines hormones (**Silbernagl et Despopoulos, 2008**).

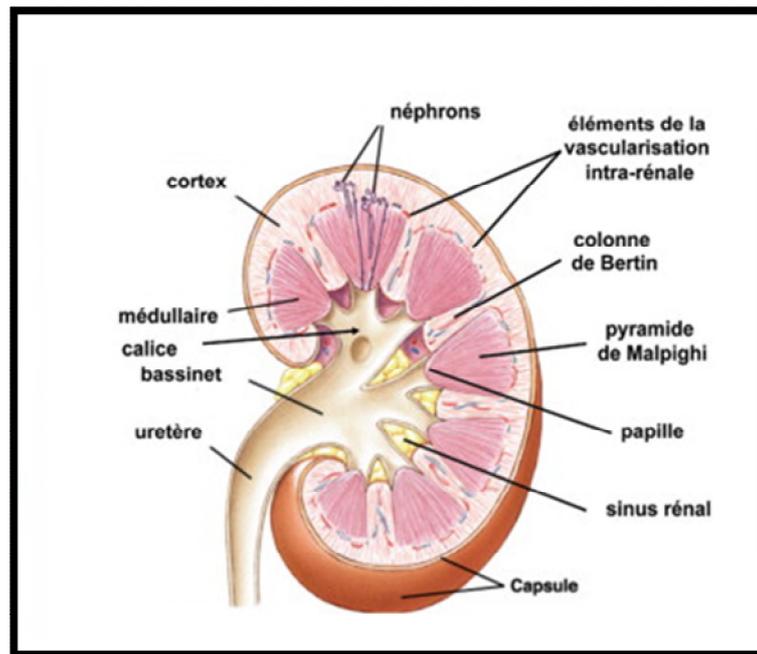


Figure 5 : Coupe frontale d'un rein (Magali et al., 2008).

Le rôle vital des reins est intimement lié à leur fonction dans l'homéostasie du milieu intérieur, permettant de protéger les cellules vis-à-vis des conséquences des variations environnementales de l'organisme, au cours de 24h les reins filtrent environ 150 à 180 litres de plasma sanguin à travers les glomérules et éliminent les produits métaboliques terminaux (urée, protons, acide urique, créatinine, bilirubine...etc.) (Blanchard et al, 2008). Chaque substance du plasma est traitée de façon spécifique par le rein. Leur devenir est la résultante d'une combinaison entre la filtration, la réabsorption, et la sécrétion. On distingue ainsi : des substances filtrées et en partie réabsorbées, comme l'eau ou les ions Na^+ . Des substances filtrées et totalement réabsorbées, comme le glucose. Des substances filtrées, sécrétées mais non réabsorbées, comme les ions H^+ et K^+ (Périlleux et al., 1999).

II-3-3- Marqueurs biochimiques de la fonction rénale

II-3-3-1- Créatinine

La créatinine est une molécule azotée inerte physiologiquement, produite par la créatine qui est un composé protéique (acide N-méthylguanidoacétique) contenu dans le tissu musculaire. Cela signifie qu'elle n'est ni métabolisée, ni utilisée d'une quelconque manière par l'organisme, cette dernière est strictement éliminée par les reins. Une faible partie de la créatinine produite par l'organisme est éliminée grâce au phénomène de sécrétion au niveau

des tubules proximaux des reins et son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale (Charriere et al., 2008).

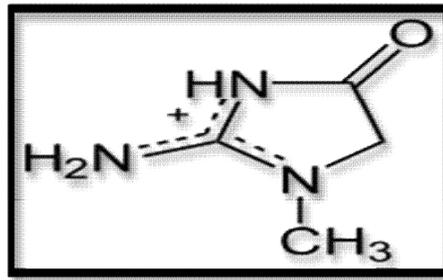


Figure 6: structure de créatinine (Koolman et Roehm, 2005).

Le taux plasmatique et la quantité de créatinine éliminée quotidiennement dans les urines constituent des paramètres biologiques remarquablement fixes. Pour ces raisons, la mesure de la concentration en créatinine est utilisée principalement pour l'évaluation de la fonction rénale (perfusion rénale détériorée, perte de fonction de néphron). Des données sur sa concentration sanguine et urinaire peuvent être utilisées pour estimer le taux de filtration glomérulaire (Friedman et Young, 2001).

II-3-3-2- L'urée

L'urée est une molécule de 60 daltons, Elle représente la forme principale d'élimination de l'azote, synthétisée lors du catabolisme des protéines par le foie. Très soluble, elle s'élimine à 90% dans les urines, un peu dans la sueur et la salive et très peu dans les matières fécales. Le dosage de l'urée dans le sang ou azotémie dans l'urine est le paramètre le plus ancien de la biochimie clinique et il reste jusqu'à aujourd'hui l'un des plus demandé même si actuellement est dépassé par celui de la créatinine (Valdiguié, 2000).

C'est un des premiers marqueurs qui a été utilisé pour mesurer le débit de filtration glomérulaire. L'urée passe dans les néphrons quelle que soit sa concentration dans le sang : c'est une substance sans seuil (Chanton et Paniel, 1966). Cette molécule est filtrée librement dans le glomérule mais est réabsorbée au niveau des tubes proximaux et distaux. Un taux élevé indique généralement une atteinte glomérulaire, mais la concentration peut être aussi modifiée par un régime riche en protéines, d'un catabolisme des protéines augmenté, un état de choc, insuffisance cardiaque ou une hépatotoxicité fréquente avec de nombreux toxique (Frank, 1992 ; Friedman et Young, 2001).

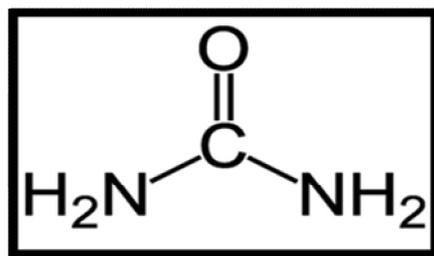


Figure 7 : structure chimique de l'urée (Valdigué, 2000).

III-1-Préparation du matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Rhamnus alaternus*, récoltées au niveau du village Taghzouit de la région de Bejaia durant le mois mars 2013. Une fois récoltée, les feuilles fraîches de *Rhamnus alaternus* ont été séchées à l'air libre pendant 20 jours, puis transférées à l'étuve à 35 °C pendant 02 jours pour affiner le séchage et pour obtenir un meilleur broyage et une meilleure extraction. Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules ainsi obtenues après broyage sont tamisées sur un tamis de diamètre de 250µm pour avoir une poudre homogène. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction (**Figure 8**).



Figure 8 : Les feuilles (fraîches et sèches) et poudre de *Rhamnus alaternus*

III-2-Extraction

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal selon le protocole préconisé par (**Owen et Johns, 1999**) avec de légères modifications. 50g de la poudre des feuilles de *Rhamnus alaternus* sont macérés dans 300 ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 07 heures à une température ambiante. Après macération, la solution obtenue a été filtrée plusieurs fois sur papier de Wattman N°03, et le filtrat est récupéré (filtrat 1). Ensuite, 200 ml de méthanol ont été ajoutés pour le précipiter, et le mélange a été laissé sous agitation pendant une nuit (afin d'avoir une extraction exhaustive) et ensuite filtré dans les mêmes conditions, le filtrat (filtrat 2) est récupéré. Les deux filtrats ont été mélangés et lavés avec l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter pour éliminer les matières lipophiles (chlorophylle, cires...etc.) et laissés évaporer dans une étuve à 40 °C jusqu'à ce que le poids de l'extrait reste constant et le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P0 : poids de la poudre avant extraction.

P1 : poids de l'extrait sec après extraction.

III-3- Matériel animal

Les étapes qui suivent ont été menées conformément à la directive de l'OCDE (organisation pour la coopération et le développement économique, Guideline-407, adopté le 03 octobre 2008).

L'étude a été menée sur des rats Wistar femelles âgés de 12 semaines pesant entre 202 et 265g. Ces rats sont élevés dans l'animalerie du laboratoire de pharmaco-toxicologie au niveau du CRD (Centre de Recherche et Développement) du groupe SAIDAL (Al-Mohammadia, Alger). Les animaux ont été identifiées, et placées dans des cages transparentes inoxydables en polypropylène huit jours avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire. Les rats sont élevés à une température ambiante de 20 à 24°C, et d'humidité relative de 50%, avec un cycle de 10/14 h (lumière/obscurité), et disposés de granules d'aliment standard provenant de L'ONAB (Office National Alimentation Bétail), El-Kseur de Bejaïa, et l'eau de robinet. La litière utilisée est la sciure renouvelée 3 fois par semaine pour garder le bon conditionnement hygiénique des rats (**Figure 9**).

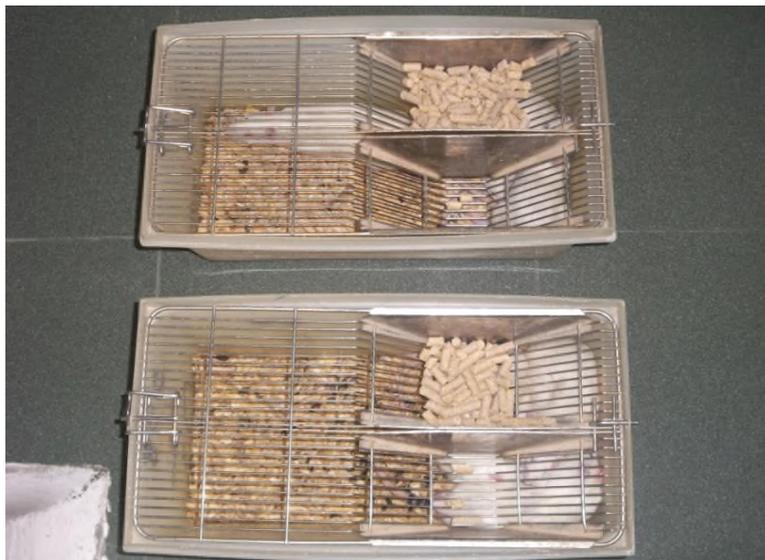


Figure 9 : Des rats Wistar femelles élevés dans des cages inoxydables

III-4-Etude de toxicité sub-chronique

La toxicité à moyen terme ou toxicité sub-chronique est la recherche à définir les organes et les fonctions touchées par un toxique administré plusieurs fois pendant une période allant de 04 semaines à 03 mois. Durant notre étude, 03 groupes de 06 rats Wistar femelle ont été utilisés dans cette expérience et répartie en 03 groupes de telle sorte que la différence de poids des rats à l'intérieur et entre les groupes ne dépasse pas $\pm 20\%$ des poids moyens des rats. Le groupe 1 (control normal) reçoit par voie orale de l'eau physiologique pendant 29jours. Les groupes 2 et 3 reçoivent aussi par voie orale des doses respectives de 200 et 400mg/kg/ jour de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus*. Le poids corporel des animaux a été mesuré chaque 05 jours pour suivre l'évaluation du poids corporel. (Figure 10)



Figure 10 : Administration orale de 1 ml pour chaque rat.

III-5-Bilan biochimique sanguin

Au 29^{ème} jour de l'étude, les rats ont été mis à jeun durant la nuit. Le prélèvement sanguin a été effectué sous anesthésie sous l'effet de l'éther au niveau du sinus retro orbitaire à l'aide des tubes capillaires. Une fois le sang est récupéré dans des tubes héparinés, il est centrifugé à 3000tours/minute pendant 30 minutes pour récupérer le sérum qui va servir au dosage des paramètres biochimiques (bilan hépatique, bilan néphrétique et glycémie) (Figure 11)



Figure 11 : Prélèvement sanguin dans des tubes héparinés

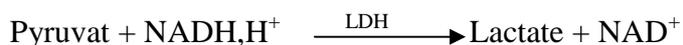
III-5-1-Paramètres hépatiques

III-5-1-1-Dosage de transaminases ALAT et ASAT

III-5-1-1-1-Alanine aminotransférase (ALAT ou GPT)

➤ *Principe de la méthode*

L'alanine aminotransferase (ALAT) ou le glutamate pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine en α - Cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate formé est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) et le nicotinamide adénine dinucleotide (NADH). La réaction est la suivante :



La diminution dans la concentration de NADH, H^+ mesurée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique de GPT (ALAT) dans l'échantillon (**Spinreact, Spain 2014**).

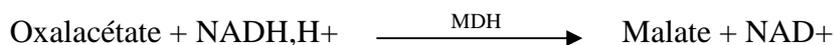
➤ *Mode opératoire*

On verse dans chaque tube (blanc et échantillons) 1000 μ l de réactif, puis on ajoute 100 μ l de sérum pour chaque échantillon et ne rien ajouter au blanc. Mélanger et incuber pendant 1min, lire l'absorbance initiale de l'échantillon, mettre en route le chronomètre et lire l'absorbance à chaque minute pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$). $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L d'ALT}$.

III-5-1-1-2- Aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT)

➤ *Principe de la méthode*

Aspartate aminotransferase (ASAT), autrefois appelée glutamate oxaloacétate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate en α - céto glutamate formant le glutamate et oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est réduit en malate par le malate déshydrogénase (MDH) et NADH. La réaction est la suivante :



La diminution dans la concentration de NADH mesurée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique de GOT (ASAT) dans l'échantillon (**Spinreact, Spain 2014**).

➤ *Mode opératoire*

On verse dans chaque tube (blanc et échantillons) 1000 μ l de réactif, puis on ajoute 100 μ l de sérum pour chaque échantillon et ne rien ajouter au blanc. Mélanger et incuber pendant 1min, lire l'absorbance initiale de l'échantillon, mettre en route le chronomètre et lire l'absorbance à chaque minute pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$). $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L d'AST}$.

III-5-1-2- Dosage de la bilirubine

➤ *Principe de la méthode*

La bilirubine est transformée en azobilirubine au moyen de l'acide sulfanilique diazote, et se mesure par photométrie. Deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine-glucuronide et la bilirubine libre associée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe). La deuxième ne réagit que par solubilisation avec du diméthylsulfoxyde (DMSO)- (bilirubine indirecte). L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé (**Spinreact, Spain 2014**).

➤ *Mode opératoire*

Bilirubine totale : On verse dans chaque tube (Blanc et échantillon) 1.5ml du réactif 2, on ajoute 50µl de réactif 3 pour chaque échantillon et ne rien ajouter au blanc , on mélange et on ajoute 100µl de BILIRUBIN CAL au blanc et 100µl de plasma pour chaque échantillon, après incubation à (15-25 °C) pendant 5min, on lit l'absorbance à 555nm.

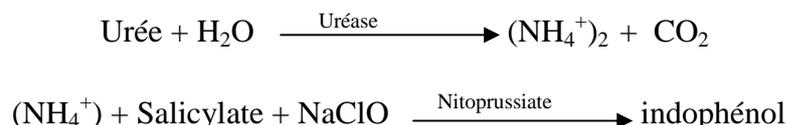
Bilirubine directe : On verse dans chaque tube (blanc et échantillon) 1.5ml réactif 1, on ajoute 50µl de réactif 3 pour chaque échantillon et ne rien ajouter au blanc , on mélange et on ajoute 100µl de BILURIBIN CAL au blanc et 100µl de plasma pour chaque échantillon, après incubation à (15-25 °C) pendant 5min , on lit l'absorbance à 555nm.

III-5-2-Paramètres néphrétiques

III-5-2-1-Dosage de l'urée

➤ *Principe de la méthode*

L'urée dans l'échantillon est hydrolysée par voie enzymatique en ammonium (NH_4^+) et en dioxyde de carbone (CO_2). Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et le l'hypochlorite (NaClO), en présence du catalyseur nitroprussiate pour former un indophénol vert. La réaction est la suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon (**Spinreact, Spain 2014**).

➤ *Mode opératoire*

On verse dans chaque tube (blanc, standard et échantillon), 1000µl du réactif A, puis on ajoute 10µl d'UREA CAL dans le tube standard, et 10µl du plasma pour chaque échantillon et ne rien ajouter au blanc. Après incubation à (15-25 °C) pendant 10mn, on ajoute 1000µl du réactif R₂ dans chaque tube, on mélange et on incube pendant 10mn à la même température, et enfin on lit l'absorbance du standard, blanc et les différents échantillons à 580nm. La quantité de l'urée dans le plasma est calculée de la façon suivante :

$[(A) \text{ échantillon} / (A) \text{ standard}] * 50 = \text{mg/dL d'urée dans l'échantillon}$

Facteur de conversion : $\text{mg/dL} * 0.1665 = \text{mmol/L}$

III-5-2-2-Dosage de la créatinine

➤ *Principe de la méthode*

L'analyse est basée sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium, la créatinine réagit avec le picrate alcalin, formant ainsi un complexe rouge. L'intensité de la couleur formé est proportionnelle à la créatinine présente dans l'échantillon (**Spinreact, Spain 2014**).

➤ *Mode Opératoire*

On verse dans chaque tube (blanc, standard et échantillons), 1000µl du réactif 1, puis on ajoute 100µl de CREATININE CAL dans le tube standard, et 100µl de plasma pour chaque échantillon, le tout est mélangé et l'absorbance (A₁) est lue après 30 secondes et l'absorbance (A₂) après 90 secondes après l'ajout de l'échantillon à 492 nm. La quantité de la créatinine dans le plasma est calculée de la façon suivante :

$[(\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}) / (\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc})] * 2 = \text{mg/dL de créatinine dans l'échantillon.}$

Facteur de conversion : $\text{mg/dL} * 88.4 \mu\text{mol/L}$

III-5-2-Dosage du glucose

➤ *Principe de la méthode*

Le glucose – oxydase (GOT) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène formé (H₂O₂) est détecté par l'accepteur chromogénique d'oxygène, le phénol- aminophénazone en présence de peroxydase (POD). La réaction est la suivante :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon (**Spinreact, Spain 2014**).

➤ *Mode opératoire*

On verse dans chaque tube (blanc, standard, et échantillon) 1000µl du réactif A. Puis on ajoute 10µl de GLUCOSE CAL dans le tube standard, ne rien ajouter au blanc et 10µl de plasma pour chaque échantillon. On incube à une température ambiante (15-25 °C) pendant 20- 30mn. L'absorbance du standard et les différents échantillons est lue à 505 nm la quantité du glucose dans le plasma est exprimé comme suit :

$$[A \text{ échantillon} / A \text{ standard}] * 100 = \text{mg/dL}$$

$$\text{Facteur de conversion : mg/dL} * 0.0555 = \text{mmol/L}$$

III-6-Etude histopathologique

III-6-1-Prélèvement des organes

Après la collecte du sang au 29^{ème} jour, les cadavres des rats sacrifiés après anesthésie sont fixés sur une plaque en liège sur sa partie dorsale en fixant ses quatre pattes à l'aide de punaises de fixation. Une petite incision est provoquée au niveau de périnée qui permet d'insérer une sonde d'incision. Suite à ça, on procède à la dissection de la cavité abdominale. Le foie, les reins, le cœur et la rate ont été isolés pour observer les changements histopathologique ou les anomalies tissulaires (lésions, couleur, consistance...etc.) (Figure 12).



Figure 12 : La dissection des rats (Saidal, 2014)

III-6-2-Fixation

La fixation consiste à figer les structures des organites cellulaires tout en conservant les constituants cellulaires et tissulaires dans un état proche du vivant. L'agent fixateur solidifie le gel protéique qui circule entre les mailles du réseau membranaire limitant le hyaloplasme et les organites. Les organes récupérés sont lavés avec de l'eau physiologique, et immédiatement immergés dans un liquide fixateur qui est le formol (10%) dont le volume est environ 10 fois le volume de l'organe afin d'éviter leurs dégradation et obtenir une rigidité tissulaire suffisante. Les organes sont coupés dans des endroits précis. Les pièces obtenues sont placées dans des cassettes en plastique numérotées et bien identifiées pour chaque groupe (figure 13).



Figure 13 : Préparation des cassettes (CHU de Bejaia, 2014)

III-6-3-Lavage déshydratation et éclaircissement

Les pièces fixées sont ensuite placées dans l'automate, celui-ci est réglé sur un cycle de 18 heures, on distingue trois étapes successives : déshydratation, désalcoolisation et éclaircissement et enfin inclusion. Les cassettes contenant les organes prélevés, sont baignées successivement dans 7 bacs d'alcool (éthanol à 70° et à 100°) pour réaliser une déshydratation. Ensuite ces prélèvements sont plongés dans 3 bacs de xylène qui est un excellent agent désalcoolisant et d'éclaircissement. Enfin, l'inclusion qui consiste à faire pénétrer une substance homogène qui est la paraffine (Figure 14).



Figure 14 : Les étapes d'inclusion par l'automate (CHU de Bejaia, 2014)

III-6-4- Enrobage à la paraffine et confection des blocs

Une fois les coupes sont réalisées, les cassettes sont immergées dans deux bains successifs de paraffine liquide pour que cette dernière s'infilte dans les échantillons. Ainsi elles sont protégées contre l'humidité et le dessèchement. (**Figure 15**). Après leur enrobage, les cassettes sont incubées a basse température jusqu'à refroidissement de la paraffine. Le refroidissement permet l'obtention d'un bloc pour chaque prélèvement. La coupe du bloc de paraffine au microtome permet de réaliser une coupe très fine de 3 à 5 μm d'épaisseur pour chaque prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires. La coupe est déposée et collée sur une lame en verre puis laissée sécher à l'étuve.



Figure 15: Distributeur de paraffine à gauche et réalisation des coupes au microtome LEICA RM 2145 à droite (CHU Bejaia, 2014).

III-6-5- Déparaffinage et coloration

Les lames sont baignées dans 02 bains successifs de Xylène pendant 5 min chacun, suivi de 02 bains successifs d'éthanol à 90% pendant 3mn chacun, puis rincées à l'eau. Les lames sont ensuite mises dans un bain d'hématoxyline pendant 3 min, suivi d'un bain d'éosine pendant 5 min, et rincée dans deux bains successifs d'éthanol à 90%, puis laissées sécher.(Figure16)

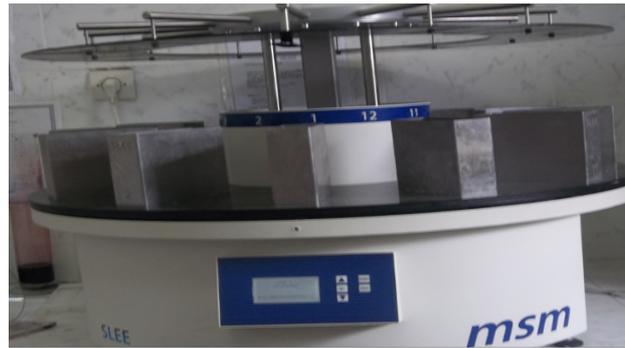


Figure 16 Coloration des coupes (SHADON O)

III-6-5- Visualisation microscopique

La visualisation microscopique est réalisé à l'aide de « l'Eukitt » une colle qui permet de coller la lame et la lamelle, ce montage permet la conservation ultérieure des coupes colorées. La visualisation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope optique doté d'un appareil photo « LEICA EC3 » qui nous a permit d'obtenir les photos des différents prélèvements.

III-6-5-Analyse statistique

L'analyse des résultats des tests a été réalisée sur la base du traitement statistique en utilisant le logiciel Graph Pad Prism (version 5). Two-way ANOVA test a été utilisé comme traitement statistique. Les différences sont considérées comme significatives si p est inférieur à 0.05.

IV-Résultats et discussion

IV-1- Evaluation du poids corporel

L'étude de la toxicité sub-chronique de l'EM de *R. alaternus* sur des rats Wistar pendant 29 jours à des doses de 200 et 400mg/kg ne révèle aucune variation significative du poids corporel n'a été observée pour les deux lots traités par rapport au lot témoin ($P < 0.05$) (figure 17).

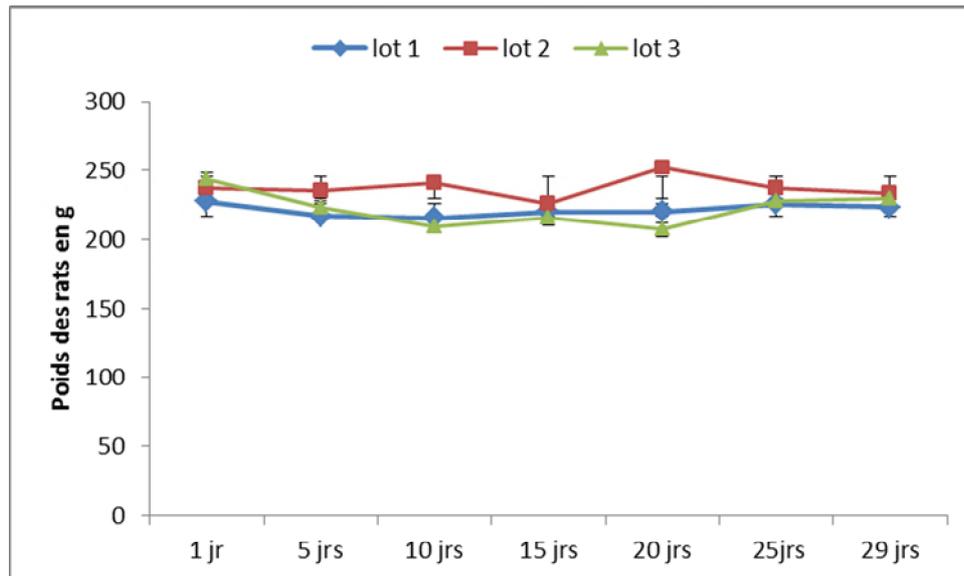


Figure (17) : Variation du poids corporel des différents lots au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

IV-2- Poids des organes

A la fin de l'expérimentation, les organes internes (foie, rein, rate et cœur) ont été récupéré. Aucun signe significatif de toxicité, de lésion ou de changement de couleur des organes n'a été observé. De plus, l'administration de l'EM de *Rhamnus alaternus* à des doses de 200 et 400 mg /Kg/jour pendant 29 jours ne montre aucune variation significative du poids des organes récupérés (figure 18).

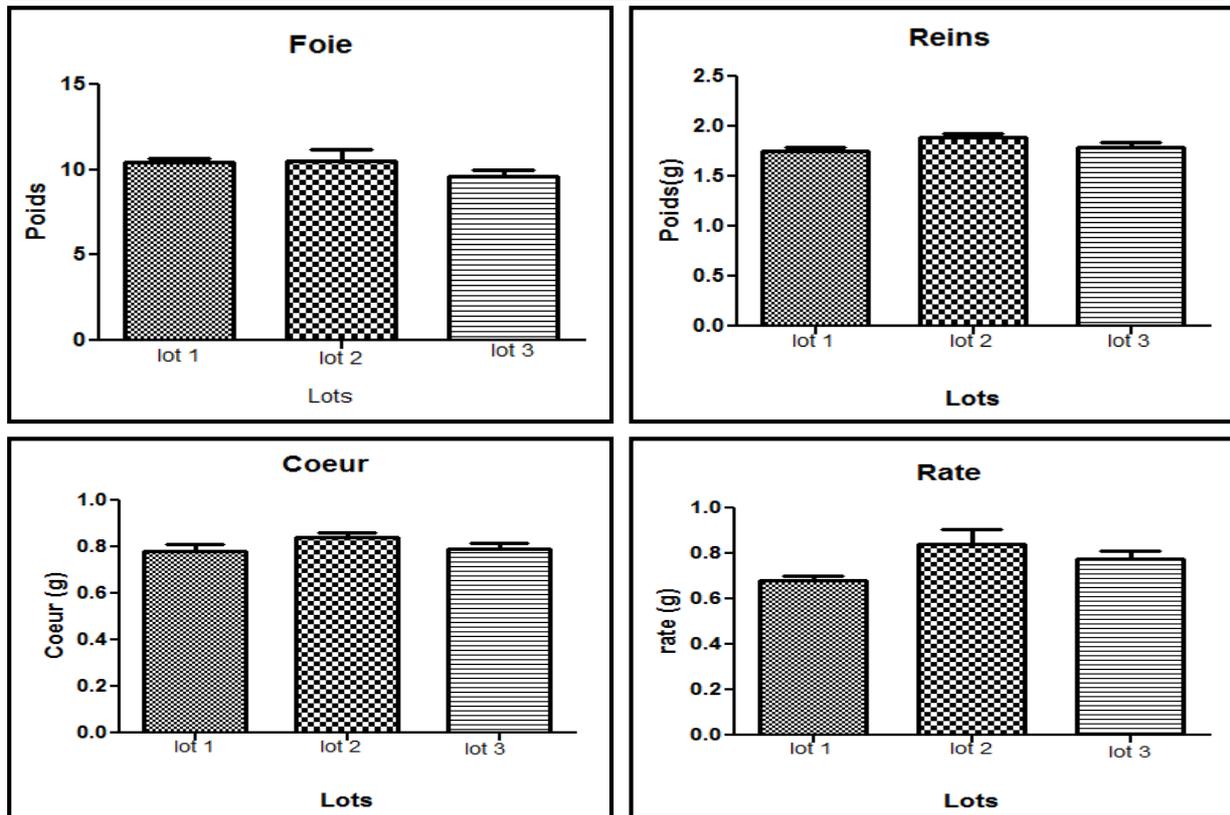


Figure 18 : Poids des organes (foie, reins, cœur et rate) des différents lots au cours de l'étude de la toxicité sub-chronique à des doses (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

Les poids du foie pour les lots traités (200 et 400 mg/kg/jours) sont respectivement de l'ordre de ($10,52 \pm 1,57$ et $9,58 \pm 1,03$), et ils ne présentent aucune différence significative par rapport à celui du lot témoin ($10,43 \pm 0,52$). L'analyse statistique pour les valeurs du poids des reins des trois lots ($1,88 \pm 0,08$ et $1,79 \pm 0,12$) n'a donné aucune différence significative par rapport au lot témoin ($1,75 \pm 0,10$). De la même façon, lors de la comparaison des poids de la rate et du cœur des lots traités sont respectivement de l'ordre de ($0,84 \pm 0,16$ et $0,77 \pm 0,07$), ($0,84 \pm 0,05$ et $0,79 \pm 0,05$), aucune variation significative n'a été remarquée avec le lot témoin qui est de l'ordre de ($0,67 \pm 0,05$ et $0,78 \pm 0,06$) respectivement.

Nos résultats ressemblent à ceux de **Gireesh et Vikas (2011)**, lors de l'étude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux du *Fumaria indican* qui ont montré que l'administration de cet extrait à des doses de 100 et 400 mg/Kg/jour pendant 30 jours, ne révèle aucun changement significatif du poids corporel des rats. Selon les rapports, la réduction du poids du corps et des organes internes est considérée comme un indice sensible de la toxicité après une exposition à une substance toxique (**Suriyavadhana et Tpakutharivu, 2011**).

IV-3- Paramètres biochimiques

IV-3-1 Paramètres hépatiques

Le dosage des paramètres biochimiques hépatiques à savoir les transaminases ALAT, ASAT et bilirubine a permis d'avoir les résultats suivants

IV-3-1-1 Dosage de la transaminase GPT (ALAT)

Les résultats du dosage de la GPT, montre que les lots 1 et 2 traités respectivement par 200mg/Kg/jour et 400mg/Kg/jours de l'EM de *R. alaternus* présentent des concentrations respectives de $21,23 \pm 1,94$ UI/L et $20,38 \pm 2,4$ UI/L, ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin qui est a un taux de GPT sérique de l'ordre de $(15,05 \pm 5,47)$ (Figure 19).

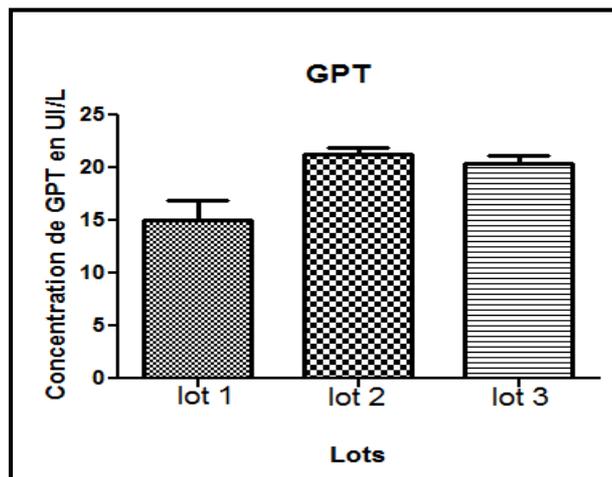


Figure (19) : Taux de GPT (ALAT) sérique chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0,05$ est considéré comme résultat significatif).

IV-3-1-2 Dosage de la transaminase GOT (ASAT)

Les résultats du dosage de la GOT, montre que les lots 1 et 2 traités respectivement par 200mg/Kg/jour et 400mg/Kg/jours de l'EM de *R. alaternus* présentant des concentrations respectives de $29,52 \pm 5,88$ UI/L et $23,73 \pm 5,53$ UI/L, ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin qui a un taux de GOT sérique de l'ordre de $(27,76 \pm 5,66$ UI/L) (Figure 20).

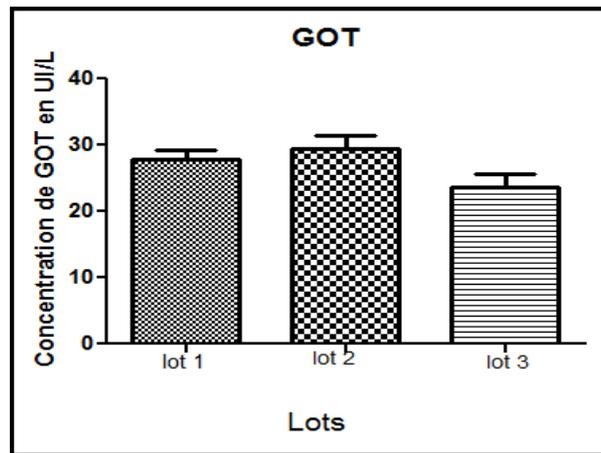


Figure (20) : Taux de GOT (ASAT) sérique chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

Les résultats obtenus par ces deux dosages (ALAT, ASAT) signifient l'absence de dommages des hépatocytes ou de leurs destructions à un rythme plus élevé qu'à la normale.

IV-3-1-3 Dosage de la Bilirubine totale et directe

Les résultats du dosage de la bilirubine totale et directe montrent que les lots 1 et 2 traités respectivement par 200 mg/Kg/jour et 400 mg/Kg de l'EM présentent des concentrations respectivement de ($6,76 \pm 1,56$ UI/L, $6,56 \pm 1,42$ et $0,07 \pm 0,07$, $0,06 \pm 0,02$) et ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin qui a des concentrations de l'ordre ($4,75 \pm 0,64$ et $0,22 \pm 0,09$) (**Figure 21**).

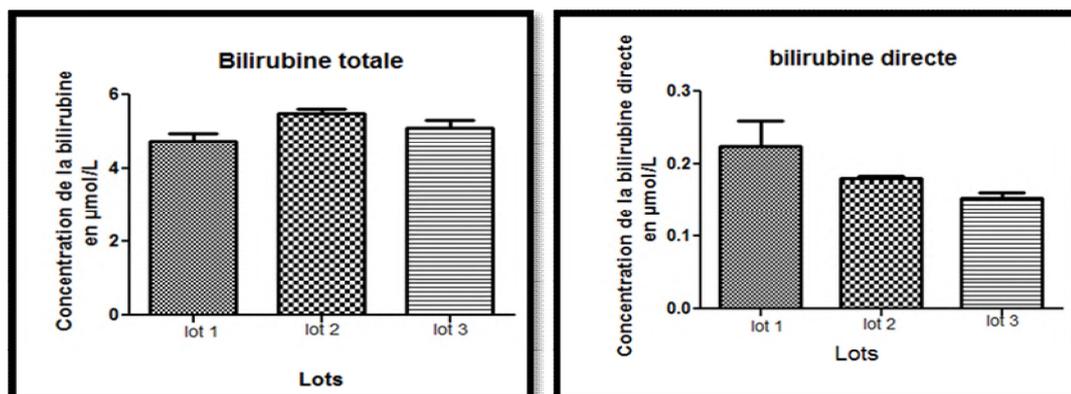


Figure (21) : Les concentrations de la bilirubine totale et directe chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

Les résultats obtenus après dosage de la bilirubine totale et directe signifient l'absence de lésions hépatiques : telle que l'augmentation de l'hémolyse et la cholestase hépatique.

D'après les résultats obtenus suite à l'administration orale de l'EM à des doses de 200 et 400mg/Kg/jour durant 29 jours, on constate de légères augmentations des enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) et de la bilirubine totale et une légère diminution de la bilirubine directe. Cependant, ces modifications restent non significatives et correspondent aux résultats de plusieurs études. Les travaux de **Das et al. (2011)** sur la toxicité sub-chronique de *Clerodendron infortunatum* à une dose de 500mg/Kg/jour pendant 28 jours montrent que les résultats du dosage des transaminases hépatique ASAT et ALAT ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin. Par contre, **Mukinda et al. (2010)** ont constaté une augmentation significative des taux d'ASAT et d'ALAT lors de l'étude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux de *Polygala fruticosa* à une dose de 1g/Kg/jour pendant 30 jours.

Nos résultats ressemblent à ceux de **Gireesh et Vikas (2011)** lors de l'étude de la toxicité sub-chronique d'extrait aqueux du *Fumaria indica*, qui ont montré que l'administration de cet extrait à des doses de 100 et 400mg/Kg/jours pendant 30jours ne révèle aucun changement significatif dans le taux d'albumine et de bilirubine totale. Par contre, lors de l'étude de **Nana et al. (2011)** sur la toxicité sub- chronique de l'extrait méthanolique de *Pteleopsis hyloendron* à des doses allant de 85 jusqu'à 680 mg/Kg/jour pendant 28 jours, ils ont constaté une augmentation significatives dose dépendante des transaminases hépatique (ASAT et ALAT) par rapport au témoin

IV-3-2 Paramètres néphrétiques

IV-3-2-1 Dosage de la créatinine

Les résultats du dosage de la créatinine, montre que les lots 1 et 2 traités respectivement par 200mg/Kg/jour et 400mg/Kg/jours de l'EM de *R. alaternus* présentent des concentrations respectives de (67.77 ± 9.12) et (55.98 ± 7.21) , ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin qui est a un taux de créatinine sérique de l'ordre de (66.13 ± 7.52) (**Figure 22**). Ces résultats indiquent qu'il y'a une bonne élimination de la créatinine du sang par les reins.

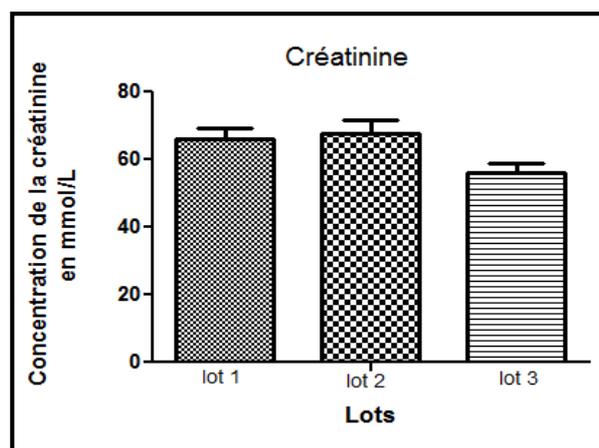


Figure 22: Taux de créatinine sérique chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

IV-3-2-2 Dosage de l'urée

Les résultats du dosage de l'urée, montre que les lots 1 et 2 traités respectivement par 200mg/Kg/jour et 400mg/Kg/jours de l'EM de *R. alaternus* présentent des concentrations respectives de (7.10 ± 0.62) et (7.18 ± 0.72) , ne présentent pas de différences significatives par rapport au lot témoin qui a un taux d'urée sérique de l'ordre de (8.77 ± 1.74) (**Figure 23**). Les résultats de ce dosage signifient l'absence de lésions au niveau des reins tels que la détérioration de leurs fonctions, insuffisance rénale ou hémorragies.

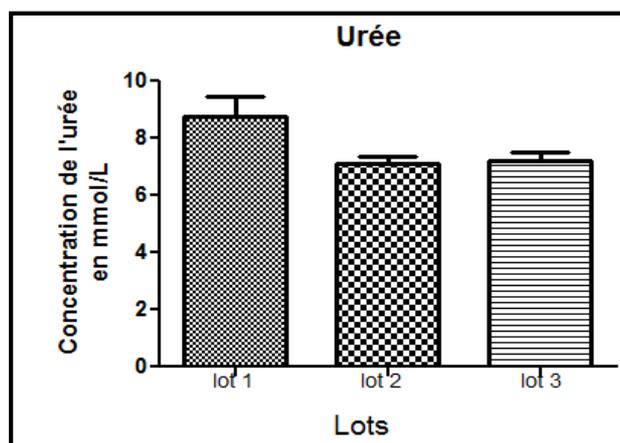


Figure 23 : Taux de l'urée sérique chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

L'administration orale de l'EM de *Rhamnus alaternus* à des doses de 200 et 400 mg/Kg/jour pendant 29 jours provoque de légères augmentations des concentrations plasmatiques en urée et en créatinine. Néanmoins les taux restent non significatifs lorsqu'on les compare avec les concentrations des rats témoins, ce qui signifie que cet extrait ne présente pas une toxicité néphrétique.

Les travaux de **Zaoui et ses collaborateurs (2002)**, ont montré qu'après 12 semaines de traitement par l'huile fixe de *Nigella sativa* à une dose de 1ml/Kg/jour, les concentrations en acide urique et en créatinine n'ont pas augmenté considérablement comparées aux valeurs des rats normaux. De même, lors de l'étude de **Nana et al. (2011)** sur la toxicité sub-chronique de l'extrait méthanolique de *Pteleopsis hylodendron* à des doses allant de 85 jusqu'à 680 mg/Kg/jour pendant 28 jours, ils ont constaté que le taux de la créatinine plasmatique augmente légèrement avec l'augmentation de la dose, néanmoins, cette augmentation reste toujours non significatives par rapport au témoin.

IV-3-2 La glycémie

D'après les résultats du dosage du glucose sanguin, on observe une légère augmentation de la glycémie mais qui est non significative par rapport au lot 1 témoin. Elle est de l'ordre de 5.81 ± 0.84 mmol/L chez le lot 1 traité par 200mg/Kg/jour, et de l'ordre de 5.59 ± 0.76 mmol/ chez le lot 2 traité par 400mg/Kg/jour, alors que chez le lot 1 témoin, la glycémie est estimée à 4.55 ± 0.375 mmol/L (**figure24**).

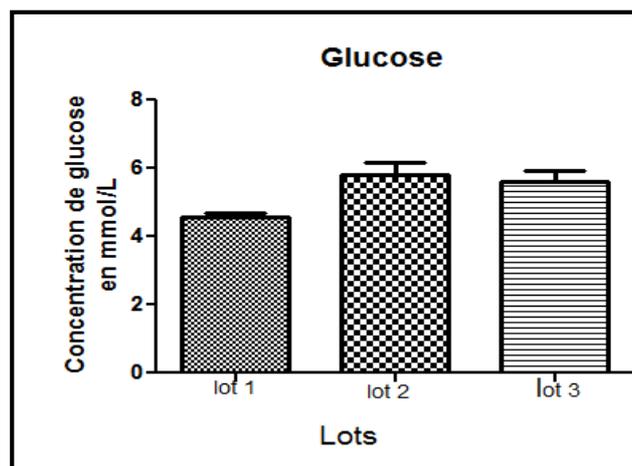


Figure 24 : Taux de glucose sanguin chez les 3 lots (L1 : 0mg/kg ; L2 : 200mg/kg et L3 : 400mg/kg). Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type ($P < 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

D'après ces résultats, on peut conclure que l'administration orale de 200 et 400 mg/kg/jour durant 29 jours de l'EM de *Rhamnus alaternus* n'affecte pas et n'entraîne aucun effet sur la glycémie des rats normaux. Par contre lors de l'étude de la toxicité sub- chronique faite par **Tahraoui et al. (2010)**, l'administration de l'extrait aqueux de *Centaurium erythraea* à des doses de 100, 600 et 1200mg/Kg/jour pendant 90 jours montre une diminution significative de la concentration du glucose pour les rats traités par rapport aux rats témoins.

IV-4- Etude histopathologique

IV-4-1 Etude histopathologique du foie

Notre étude a été réalisée sur trois rats de chaque groupe choisis aléatoirement. Les **figures (25 26, et 27)** représentent respectivement des coupes histologiques du foie colorées avec l'hématéine éosine réalisées après 29 jours de traitement avec 200 et 400 mg/kg/jour de l'extrait méthanolique de *R. alaternus*; lot I (témoin), lot II (200 mg/kg/jour) et lot III (400 mg/kg/jour).

Le foie des rats témoins présente un aspect normal sans modification hépatique avec un parenchyme d'architecture lobulé. Chaque lobule est constitué d'hépatocytes agencés en travées de Remak Disposées radialement autour d'une veine centrale appelée veine centrolobulaire (**figure 25**).

D'après l'étude histopathologie du foie des rats témoins, on constate que ce dernier a une architecture normale sans aucune modification au niveau des veines centrolobulaires et des espaces portes ; ce qui confirme que les rats sont sains et ne présentent aucune anomalie hépatique.

L'examen microscopique du foie des rats traités par 200mg/Kg/jour et 400mg/kg/jours d'EM de *Rhamnus alaternus* ne montre aucun changement significatif (**figure 26, 27**) et présente un parenchyme normal par rapport aux rats témoins. Néanmoins, certaine lésion hépatocytaire de nature congestive et dégénérative ont été observé chez les deux lots, cependant ces dernières restent minimales (**Annexe**).

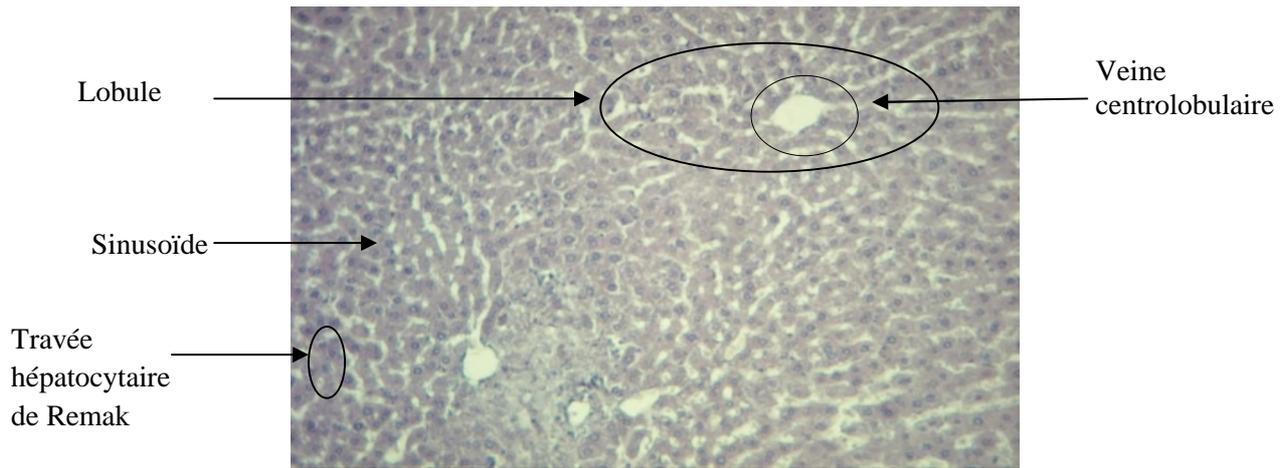


Figure 25: Coupe histologique du foie d'un rat du lot I (témoin) (Gx100)

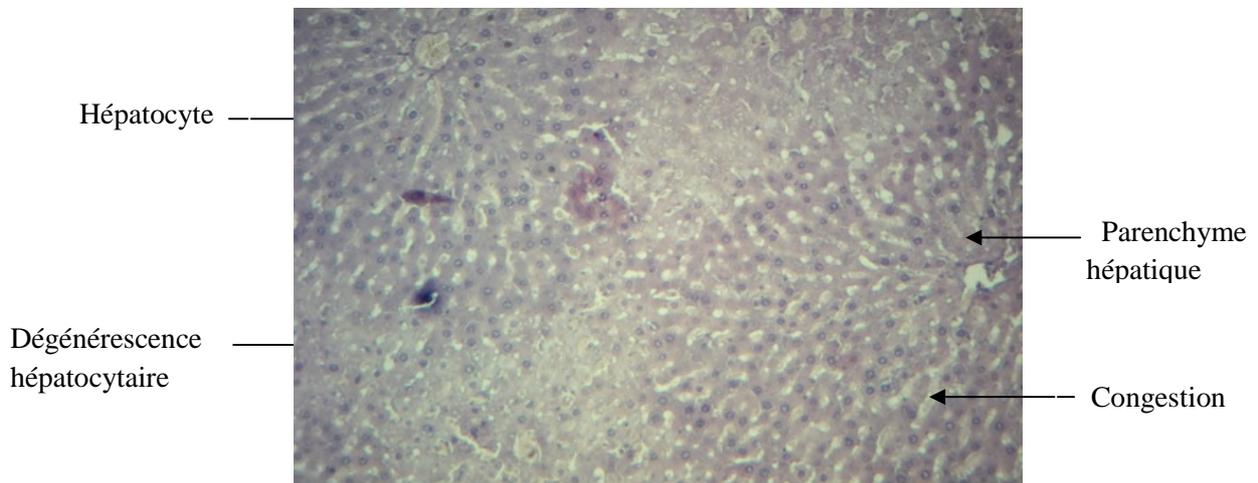


Figure 26: Coupe histologique du foie d'un rat du lot II (200 mg/kg/jour) (Gx100)

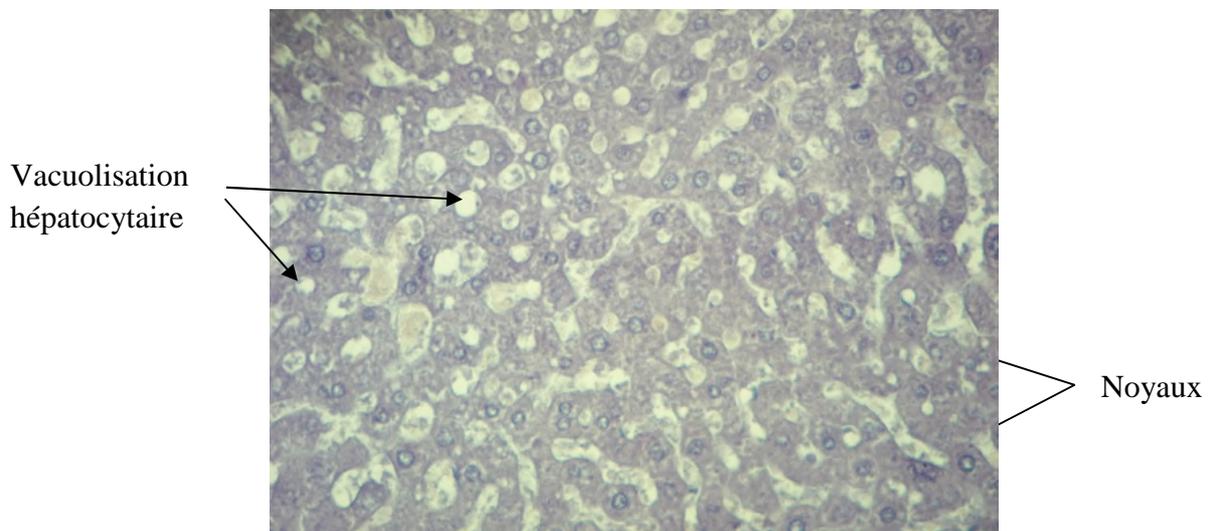


Figure 27: Coupe histologique du foie d'un rat du lot III (400 mg/kg/jour) (Gx200)

IV-4-2 Etude histopathologique des reins

Notre étude a été réalisée sur trois rats de chaque groupe choisis aléatoirement. Les **figures (28, 29, et 30)** représentent respectivement des coupes histologiques du rein colorées avec l'hématéine éosine réalisées après 29 jours de traitement avec 200 et 400 mg/kg/jour de l'extrait méthanolique de *R. alaternus*; lot I (témoin), lot II (200 mg/kg/jour) et lot III (400 mg/kg/jour).

Nous observons dans les reins des rats témoins des petites masses sphériques appelées glomérules rénaux entourés d'une capsule (la capsule de Bowman en blanc), qui se localisent dans le cortex (**figure 28**). D'après l'étude histopathologique des reins des rats témoins, on constate que ces derniers ont un aspect normal sans aucune modification rénale au niveau des cellules du parenchyme rénal, glomérules ; ce qui confirme que les rats sont sains et ne présente aucune anomalie néphrétique.

Les reins des rats traités par L'EM de *R. alaternus* (200 et 400 mg/kg/jours) ne présentent pas de modifications significatives au niveau du parenchyme rénal et des glomérules rénaux par rapport au reins des rats normaux (**figure 29, 30**). Des lésions d'allure ectasique et des dégénérescence épithéliales modérées sont observées au niveau du parenchyme rénal des rats traités par 400mg/Kg mais ces dilatations et ces dégénérescences restent non significatives par rapport au reins des rats témoins.

En conclusion, l'ensemble de ces observations est synonyme de légères toxicités hépatiques et néphrétiques, mais sans grande gravité (**Annexe**).

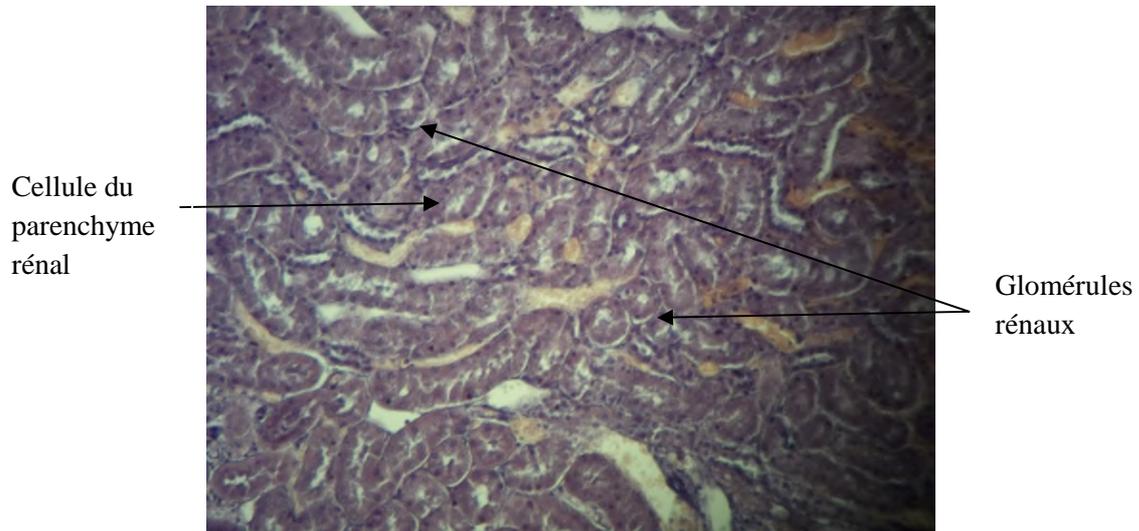


Figure 28: Coupe histologique du rein d'un rat du lot I (témoin) (Gx100)

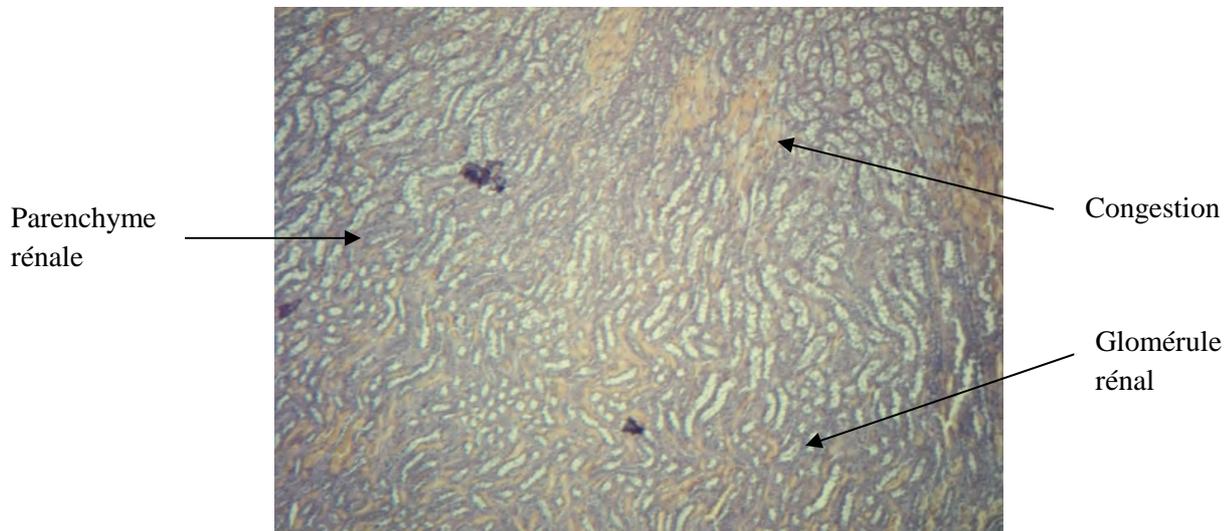


Figure 29: Coupe histologique du rein d'un rat du lot I (200mg/kg/jours) (Gx40)

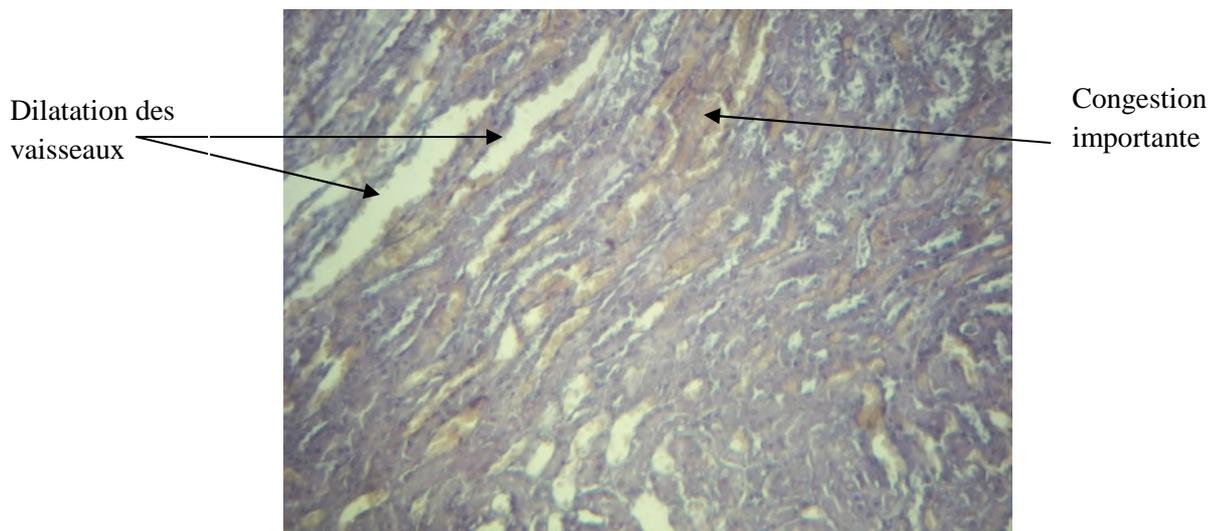


Figure 30: Coupe histologique du rein d'un rat du lot I (400mg/kg/jours) (Gx100).

Conclusion

Rhamnus alaternus constitue un important sujet de recherche vu ses multiples vertus thérapeutiques. Ses activités pharmacologiques sont attribuées à ses différents composants chimiques (polyphénols, flavonoïdes, tannins et anthraquinones ...etc.).

L' étude de la toxicité sub-chronique de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* à des doses de 200 et 400 mg/kg/jour pendant 29 jours n'a montré aucun effet sur les paramètres sanguins hépatiques. En effet, les taux de l'ALAT et de l'ASAT chez les groupes traités par 200 et 400 mg/kg/jours ne présentent aucune différence significative par rapport à ceux du groupe témoin.

De même, les résultats obtenus pour la bilirubine totale pour les groupes traités ne présentent aucune différence significative par rapport au groupe témoin.

Les deux paramètres néphrétiques qui ont été dosés, à savoir l'urée et la créatinine ne présentent pas de différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin.

De plus, l'administration de l'extrait à ses deux doses 200 et 400mg/kg/jour pendant 29 jours n'a révélé aucun effet sur la glycémie.

Les résultats de l'étude histopathologique, indiquent que l'administration orale et journalière de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* pendant 29 jours à des doses de 200 et 400mg/kg/jour, ne présente pas d'effet toxique majeur sur les deux organes étudiés et elle n'a révélé aucun changement histopathologique significatif. Néanmoins, quelques modifications au niveau de la structure vasculaire et des espaces portes ont été observées pour la dose de 400 mg/kg/jour. Ce qui confirme que cette plante n'a pas d'effets nocifs majeurs sur les deux organes ciblés par notre étude.

En terme de perspective, il serait intéressant de réaliser une étude beaucoup plus approfondie en utilisant des doses variées pendant une durée supérieure à 03 mois afin de pouvoir évaluer la toxicité chronique de *Rhamnus alaternus*.

Références Bibliographiques

Affek H. P. et Yakir D. (2002). Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiology*. 129: 269-277.

Ait youssef M. (2006): les plantes médicinales de kabylie ; *Edition Ibis press* PP:278-279.

Al-Jish, B. Abuo Hozaiifa (2002). Effect of Rhamnus alaternus on blood hemostatic function in rats. *Journal of Ethnopharmacology*.85:7-14

Aronne G. et Wilcock C-C. (1995): Reproductive lability in pre-dispersal biology of *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae). *Protoplasma* ,187:49-59.

Bas J-M., Oliveras J.et Gomez C. (2009): Myrmecochory and short-term seed fate in *Rhamnus alaternus*: Ant species and seed characteristics. *Acta Oecologica*, 35: 380–384.

Battandier JA, Debray FG, Flagey C(1888). Petit P and Trabut L. Flore de l'Algérie. Ed. A. Jourdan, Alge, p. 189-190.

Bekemeir H, Leuschner G, Schmollack W (1967).Antipyretic, antiedematous and phenylbutazone. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 168(1): 199-211.

Ben Ammar R., Ben Sghaier M., Boubaker J., bhoury W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2008): Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus L.* *Chemico-Biological Interactions*, 174:1-10.

Ben Ammar R., Bhoury W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux- Franca M.G.et Ghedira K. (2009): Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus L* (Rhamnaceae): A structureactivity relationship study. *Food Chemistry*. 116: 258-264

Ben Ammar R., Bouhlel I., Valenti K., Ben Sghaier M., Kilani S., Mariotte A-M, Dijoux-Franca M-G., Laporte F., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2007): Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays, *Chemico-Biological Interactio*.,168:171-183.

Ben Ammar R., Kilani S., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Chibani J., Chekir-Ghedira L. et Ghedira k. (2005): In vitro Mutagenicity, Antimutagenicity and free Radical scavenging Activities of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae) Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(3):439-445.

Bhourri W., Boubaker J., Kilani S., Ghedira K. and Chekir-Ghedira L (2012). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O- β -isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O- β -isorhamninoside. *S. Afr. J. Bot.*; 80: 57-62.

Blanchard Anne., Rosa Poussou., Pascal Houillier (2008). Exploration des fonctions fonction de nutrition. *Edition Doin Deren et Cie*, pp.127.

Boizot N et Charpentier J.P(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composées phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA*, pp : 79-82.

Bruneton J (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition.

Chancerel L. (1920). Flore forestière du globe. *Ed. Gauthier-Villars*, Paris : 1920, p. 561-562.

Chanton. R., Paniel. J. (1966) .Biologie animale; Anatomie et physiologie animals II fonction de nutrition. *Edition Doin Deren et Cie*, pp.127

Charriere S., Rognant N., Chiche F., Cremer A., Deray G., Priou M (2008). Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* Volume 58, Pages 40-52.

Claverie I. et HEDDE H. (2008). Pharmacologie générale, mécanismes fondamentaux, 2^{ème} édition santé Nathan.

Couinaud. C (1957).Le foie. Études anatomiques et chirurgicales, Masson et Cie, édit, Paris d'anesthésie de réanimation et d'urgences). *ISBN 2225835144, 9782225835148*.

Dalmas V., Brémond-Gignac D., Douard R., Dupont S., Latrémouille C., Le Minor J.M., Pirro N. Sèbe P. Vacher C., You R. (2009). In : Anatomie générale, *Edition Elsevier Masson*, pp : 173.

Das S. Bhattacharya S., Biswas M., Kar B., Kumar R.B.S., Pramanik G., Haldar P.K. (2011). Acute and sub-chronic toxicity study of *diospyros Cordifolia stem Bark* in swiss albinos mice. *Pharmacologyonline*, 3: 109-114.

Debeaux JO (1984). Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Ed. P. Klincksieck, Paris, p. 81-82.

Deepa K. Ingawale, Satish K. Mandlik, Suresh R. Naik. (2014). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol 37, Issue 1, January 2014, Pages 118-13.

Dutertre H, Dubernet.C.(2001), le paracetamol en pharmacie, *toxicologie.Dossier* 6.Pp 20-24.

Fieser.L.F; M. Fieser. (1935). Selected: J. Am. Chem. Soc., 57 ; p. 1679. Flammarion Médecine- Sciences. 3^{ème} édition. pp.326- 327.

Fouraste I (2000). Rappel de la toxicité de quelques plantes. *Revue Française des laboratoires*, N° 323 :51-55

Frank, Frank C.LU. (1992). Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris pp.: 73- 202.

Friedman R.B. and Young D.S. (2001): effects of disease on clinical laboratory tests. 5th Edition, AACC, pp: 60: 75.

Gallo,M.A et J.Doull.(1991) . "History and scope of toxicology" dans M.O.Amdur,J.Doull et C.D Klaassen 4^e édition,*casarett and doull ts toxicology*,Pergamon Press, New York ,p 3-11.

Gaw A, Murphy M.J, Cowan R.A, O'Reilly D.St.J, Stewart M.J, Shepherd J (2004). *Biochimie Clinique*, Edition Elsevier, pp: 52-57

Ghedira K (2006). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4: 162-169.

Gireesh K Singh, Vikas K (2011). Acute and sub-chronic toxicity study of standardized extract of *Fumaria indica* in rodents, *Journal of Ethnopharmacology*, 134:992-995.

Glomérules chez l'adulte. *Néphrologie & Thérapeutique* 4, 617—627.

Gubb AS (1913). .La flore Agerienne, naturelle et acquise. Ed.A Jourdan, Alger:p.16-17.

Gulias J., Traveset A., Riera N. et Mus M. (2004): Critical Stages in the Recruitment Process of *Rhamnus alaternus* L. *Annals of Botany* 93: 723-731.

Han X., Shen T., Lou H (2007) .Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. 2^{ème} edition pp: 54.

Heinz Iullmann et Klaus Mohr (2006). Rôle du foie dans la dégradation des médicaments, dans : « Atlas de poche de pharmacologie », 3^{ème} édition Flammarion, pp : 32

Hodge H.C.and Sterner J.H (1949).Tabulation of toxicity classes. *Am Indus. Hyg. A. Quart.* 10:93-96

Holt .A.W (1999). Acute liver failure *Crit Care Resusc*, 1 pp. 25–38.

Horsfall LJ, Nazareth I, Petersen I (2012). Cardiovascular events as a function of serum bilirubin levels in a large, statin-treated cohort , *Circulation*, 2012; 126:2556–2564.

Izhaki I., Tsahar E., Irena P and Jacob F. (2002): Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156: 217-223.

Joost van Delft, Karen Mathijs, Jan Polman, Maarten Coonen, Ewa Szalowska, Geert R. Verheyen, Freddy van Goethem, Marja Driessen, Leovan de Ven, Sreenivasa Ramaiahgari, Leo S. Price. (2014) .Toxicogenomics-Based Cellular Models, Pages 193-212.

Koolman J et Roehm K.H (2005). Color Atlas of Biochemistry.2nd Edition Thieme, pp : 336-337.

Kutcher. G.J, T.S. Lawrence.(1995).Analysis of clinical complication data for radiation hepatitis using a parallel architecture model *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 31 pp. 883–891.

Lauwery,R.R .(1999).Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles, Masson, Paris.2^{ème} édition pp : 532-541.

Lugasi A, Hovari J, Sagi k, v et Biro L.(2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* 47:119- 125.

Magali Colombat., Se´bastien Deleuze., Patrice Callard. (2008). Lesions élémentaires des **Marchall.W et Bangert .S.k (2005)**. Biochimie médicale, physiologie et diagnostic. *Edition Elsevier*, pp : 59-99.

Marieb E.N , Lachaine R .(2008).Biologie humaine, *Edition Pearson*, pp 547-549.

Mashhadian NV et Rakhshandeh H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of Rhamnus alaternus extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. *Pak J Med Sci*.21: 47-52.

Mehendale. María Noelia Lardizábal, Ramiro Esteban Rodríguez, Ana Lía Nocito, Stella Maris Daniele, Javier Fernando Palatnik, (2005). Environmental Toxicology and Pharmacology. *Issue 1, Vol 37, January.p.354-364.*

Mohamad mj Mohamad MD, PhD et Haytham Daradka PhD.(2009).Effects of Black Seeds (*Rhamnus alaternus*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats. *Research Journal of Medecine and Medical Sciences*: 4(2):386-390.

Mukinda J T., Eagles P.F.K. (2010). Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128:236-240.

Nanaa. H. Magnifouet, R.A. Ngono Nganeb,*, J.R. Kuatea, L.M. Koanga Mogtomob, J.D. Tamokoua, F. Ndiforb, R.S. Mouokeua, R.M. Ebelle Etamea, L. Biyiti c, P.H. Amvam Zolloc(2011).Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hylodendron* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*.137 :70.76

Owen P-L.et Johns T.(1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie*, 64: 149-160.

Paris, pp. 647-673.

Pellet.M.V. (1977). Le milieu intérieur. Le rein. *Physiologie humaine. 2 ème partie.* Sime pp: 58.

Percival SL.(2004). Microbiology of waterborne diseases. Ed. *Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston*, p. 480.

Périlleux. E., Anselme. B., Richard. D.(1999). Biologie humaine. Anatomie, physiologie, a new conducting *Journal de Microbiologiste*,pp 171-263.

Piro.B.M.C. Pham, E.A. Bazzaoui, M. Hedayatullah, J.C. Lacroix, P.C. Lacaze et al. (1998). A new conducting poly (aminoquinone) film with perspective for energy storage *Journal de Chimie Physique*, p.1522.

Ramé. A et Théron .S . (2007).Anatomie et physiologie. *Edition Elsevier Masson*, pp 201-254.

Reichl F.X .(2004). Toxicologie générale dans « Guide pratique de toxicologie » 2^{ème} 201-254.renal function. *Ann. Rev. Med.* 1988.39: 465-90.

Richardson J. E., Fay M. F., Cronk Q. C. B., Bowman D. (2000),and Chase M. W. A phylogenetic analysis of *Rhamnaceae* using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am. J. Bot* ; 87: 1309-1324.

Silbernagl et Despopoulos. (2008). Nutrition et digestion .dans « Atlas de poche de physiologie ».Medecine Sciences Publication, 4^{ème} Edition, pp : 212-216.

Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier. J., Amziani R., El Boustani. S; et Moulin A. (2004): Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86:919-925.

Suriyavadhana M et Tpakutharivu P (2001). Evaluation of acute and sub Acute Toxicity of Ethanol Extracts of *Entada pursaetha*, *Toddalia aculeate*, and *Ziziphus mauritia* .*World J Life Sci. and Medical Research*, 1(2):43-47.

Tahraoui A, Israili Z.H, Lyoussi B (2001).Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurim erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132:48-55.

Tim Teeter et Alan Franciscus .(2005). Tubulaires rénales. *Néphrologie & Thérapeutique* 5, 68—83.

Valdigué P.(2000). Biochimie Clinique.2^{ème} Editions *Medicales internationals,Cedex*, pp:247-279.

Viala A. et Botta A. (2007) : Toxicologie, 2^{ème} Edition *TEC et DOC. Cedex*, pp : 19-22.

Wei B. L., Lin C. N. and Won S. J. (1992). Nakahalene and Cytotoxic principles of Formosan *Rhamnus* Species. *J. Nat. Prod*; 55: 967-969

Winder,C,C. L Bai et N .H.Stacey. (1997). « occupational and Envirommental exposure » dans E.J,Massaro,Handbook of Human toxicology, *CRC Press Boca Raton*.p.117.148.

Wipierre.J. (1981). Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire, Pp 158.

Yi-ling C et Pan-Kai C. (1982): Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., *Fl. Reipubl. Popularis Sin.* 48(1):1-169.

Zaoui, YCherrah, N.Mahassini, K.Alaoui, H.Amarouch & M.Hassar. (2002). acute and chronic toxicity of *Rhamnus alaternus*. *Phytomedicine*. 9:69-74

Zimmerman HJ. (1999). The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, 2nd eds *Lippincott Williams et wilkins eds*; 9:23-125.

Glossaire

- **Lésion** : c'est un tissu biologique qui se trouve dans un état anormal, sa cause peut être multiple, il peut s'agir d'une coupure brûlure et aussi un résultat d'un état pathologique lié à un agent pathogène (infection, parasite).
- **Oculaire** : un oculaire est en fait une loupe perfectionnée pour fournir une image à l'infini, c'est-à-dire une image nette sans accommodation de l'œil.
- **Encéphalopathies** : Est une maladie de l'encéphale. Il désigne toute affection encéphalique d'origine toxique dégénérative ou métabolique.
- **Xenobiotique** : est une substance présente dans un organisme vivant mais qui lui est étrangère, il n'est ni produit par l'organisme lui-même, ni par son alimentation naturelle.
- **Retroperitonéal** : est la partie de l'abdomen en arrière de la cavité péritonéal, contient des organes des appareils urinaires et digestifs.
- **Biopsie** : est le prélèvement d'une très petite partie d'un organe ou d'un tissu pour effectuer des examens.
- **Rhizogenèse** : est un processus qui conditionne la formation et le développement de racines végétaux
- **Germination** : est la reprise du développement et du métabolisme.
- **Hémicellulose** : est l'une des composantes du bois, c'est le deuxième composant d'une paroi pectocellulosique chez les végétaux.
- **Hyaloplasme** : substance visqueuse dans laquelle baignent les organismes.

Annexe

Matériel

- Ampoule à décanter en verre
- Agitateur
- Balance SARTORIUS ;
- Balance CLATRONIC ;
- Broyeur MOULINEX ;
- Bain- MARIE ;
- Barrou magnétique ;
- Bécher ;
- Boite de pétri ;
- Capillaires pour hématocrite ;
- Centrifugeuse 631 .C04002000 ;
- Entonnoir ;
- Etuve PROLAB ;
- Fiole 50 et 100ml ISOLAB ;
- Gants chirurgicaux ;
- Lames LAMINAS Para microscopia Dim : 76× mm, Epai : 0,95/ 1,05mm ;
- Lamelles DECKGLASER 100st/PC, s 24 × 60 mm ;
- Micropipette 100- 1000µl;
- Microscope
- Microtome LEICA MICROSYSTEMS; RM 2125 RT;
- Pipette 5ml
- Spectrophotomètre SHIMADZU UV mimi 1240 UV-VIS;
- Seringues B/BRAUN injekt de 2ml ;
- Sonde de gavage pour rats ;
- Tubes héparinés de 4ml, 4ml, eppendorfs de 1.5 ml :
- Trousse à dissection contenant, des aiguilles, des pinces hémostatiques, la sonde cannelée, la paire de ciseaux fins, de gros ciseaux ect.

Produits

- Carbonate de sodium
- Chloroforme
- Eau physiologique
- Formol 10%
- Méthanol

Les réactifs utilisés

Alanine aminotransferase (ALT)

R1 Tampon	Tris PH 7,3 L-alanine Lactate- déshydrogénase	150mmol/L 750mmol/L > 1350U/L
R2 Substrat	NADH 2- oxoglutarate Hydroxyde de sodium Sodium azide	1,3mmol/L 75mmol/L 148mmol/L 9,5g/L

Aspartate aminotransferase (AST)

R1 Tampon	Tris PH 7,3 L-aspartate Malate- déshydrogénase Lactate- déshydrogénase	121mmol/L 362mmol/L > 460U/L > 660U/L
R2 Substrat	NADH 2- oxoglutarate Hydroxyde de sodium Sodium azide	1,3mmol/L 75mmol/L 148mmol/L 9,5g/L

Bilirubine

R1	Acide sulfanilique Acide hydrochlorique	30mmol/L 150mmol/L
R2	Acide sulfanilique Acide hydrochlorique Diméthylsulfoxyde DMSO	30mmol/L 50mmol/L 7mmol/L
R3	Nitrite de sodium	29mmol/L
Standard	ALBUMIN CAL	ref : 1002250

Urée

R1 Buffer	TRIS pH 7.8 α -cétooglutarate	80mmol/L 6mmol/L
R2 Enzyme	Uréase Glutamate déshydrogénase NADH	3750U/L 6000U/L 0.32mmol/L
UREA CAL	Patron primaire de détection d'urée	50mg/dL

Créatinine

R1 Réactif picrique	Acide picrique	17.5mmol/L
R2 Réactif alcalinisant	<i>Hydroxyde de sodium</i>	<i>0.29mol/L</i>
CREATININE CAL	<i>Patron premier de detection de la creatinine</i>	<i>2mg/dL</i>

Glucose

R1 <i>Buffer</i>	TRIS Ph 7.4 Phenol	92mmol/L 0.3mmol/L
R2 <i>Enzymes</i>	Glucose oxidase (GOD) Peroxidase (POD) 4-Aminophenazone (4-AP) 2.6mmol/L	15000U/L 1000U/L
GLUCOSE CAL	Glucose primaire aqueue standard 100mg/dL	

Tableau récapitulatif des résultats des différents paramètres biochimiques étudiés.

Lots	ALAT (UI/L)	ASAT (UI/L)	Bilirubine totale (μmol/L)	Bilirubine directe (μmol/L)	Créatinine (μmol/L)	Urée (μmol/L)	Glucose mmol/L
Lo1	(15,05 \pm 5,4)	(27,76 \pm 5,66)	(4,75 \pm 0,64)	(0,22 \pm 0,09)	(66,13 \pm 7,52)	(8,77 \pm 1,74)	(7,56 \pm 0,5)
Lo2	(21,23 \pm 1,9)	(29,52 \pm 5,88)	(6,76 \pm 1,56)	(0,07 \pm 0,07)	(67,77 \pm 9,12)	(7,10 \pm 0,65)	(5,80 \pm 0,08)
Lo3	(0,38 \pm 2,40)	(23,73 \pm 5,53)	(6,56 \pm 1,42)	(0,06 \pm 0,02)	(55,98 \pm 7,21)	(7,18 \pm 0,72)	(5,59 \pm 0,78)

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques Vétérinaires
DR. Y. BENALI

IPA N° : VR02/14

Animal : rats Wistar
Age : NC
Vétérinaire traitant :
Nature du prélèvement : lames histologiques
Siège du prélèvement : reins, foie

COMPTE RENDU

Examen histopathologique réalisé sur un lot de 28 lames de mauvaise qualité technique, colorées en Hémateïne Eosine dans le cadre de l'évaluation de la toxicité hépatique et néphrique de la plante Rhamnus alaternus sur des rats Wistar.

Les lames sont divisées en trois lots et identifiées comme suit :

- **Reins :**
 - Lot témoin L1R.
 - Lot 200 mg/Kg L2R.
 - Lot 400 mg/ Kg L3R.
- **Foie :**
 - Lot témoin L1F.
 - Lot 200 mg/Kg L2F.
 - Lot 400 mg/Kg L3F.

L'examen histopathologique a mis en évidence les lésions réparties selon leur nature et intensité dans les tableaux suivants :

Reins

	témoin	L1	L2
congestion	Seuil de référence	minime	modérée
Dégénérescence épithéliale (tubes collecteurs)	Seuil de référence	minime	modérée

Foie

	Témoin	L1	L2
Congestion	Seuil de référence	minime	minime
Vacuolisation cytoplasmique Hépatocytaire	Seuil de référence	Minime	///////
Dégénérescence cytoplasmique hépatocytaire	Seuil de référence	///////	minime

Conclusion :

- Les lésions mises en évidence sont de natures congestives et dégénératives à la fois au niveau des prélèvements rénaux et hépatiques. Ces lésions sont d'intensité minime à modérée selon l'échantillon examiné.
- Lésions observées dans la limite des lames adressées. Résultats à confronter aux données bibliographiques.



Résumé

Rhamnus alaternus est l'une des plantes appartenant à la famille des Rhamnaceae ; elle est cultivée dans plusieurs pays surtout dans le bassin méditerranéen et est connue pour ses propriétés guérissantes depuis l'antiquité.

Peu d'études ont été réalisées sur la toxicité de *Rhamnus alaternus*. Cette étude est portée afin de déterminer le profil de la toxicité de l'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* sur des rats wistar. Deux doses différentes (200 et 400mg/kg/jour) ont été administrées oralement à ces rats pendant 29 jours, les rats sont observés pour tous changements dans le poids corporel. Des études biochimiques et histopathologiques ont été effectuées à la fin du traitement. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative pour les différents dosages effectués et pour les deux organes ; le foie et les reins.

Mots clés : *Rhamnus alaternus*, extrait méthanolique, toxicité, histopathologie.

Abstract

Rhamnus alaternus is a plant belonging to the family Rhamnaceae, it is cultivated in many countries especially in the Mediterranean and is known for its healing property since antiquity.

Few studies have been conducted on the toxicity of *Rhamnus alaternus*. Scope of this study is to determine the toxicity profile of the methanol extract of *Rhamnus alaternus* on Wistar rats. Two different doses (200 and 400mg/kg/jour) were administered orally to rats for these 29 days, rats were observed for changes in body weight. Biochemical and Histopathological studies were performed at the end of treatment. Results obtained show no significant difference for the different assays performed and for the two bodies and the liver and kidneys.

Keywords: *Rhamnus alaternus*, methanol extract, toxicity, histopathologie.