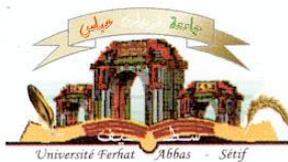


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس سطيف 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2015

THÈSE

Présentée par

KRACHE Imane

Pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Biochimie**

THÈME

Effets anti-inflammatoire, antioxydants et toxiques de l'extrait de *Teucrium polium* L.

Soutenue publiquement le 21/02/2015

Devant le Jury

Président :	Dr DAHAMNA Saliha	Prof	Université Sétif 1
Directeur:	Dr ARRAR Lekhmici	Prof	Université Sétif 1
Examineurs:	Dr LAHOUEL Mesbah	Prof	Université de Jijel
	Dr ZRIZER Sakina	Prof	Université de Constantine 1
	Dr BOUMERFEG Sabah	MCA	Université de BBA
Invitée	Dr OUHIDA Soraya		

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publication

1. **Krache I.**, Boussoualim N., Charef N., Trabsa N., Ouhida S., Benbacha F., Daamouche Z., Benzidane N., Baghiani A., Khennouf S., Arrar L. 2015. Evaluation of acute and chronic toxic effects of Algerian Germander in *Swiss albino* mice. *J. App. Pharm. Sci.* 5 (Suppl 3): 027-032.

Proceeding

1. **Krache I.**, Boussoualim N, Trabsa H, Baghiani A, Charef N, Arrar L. *In vivo* antioxidant scavenging, antihemolytic activity effects of *Teucrium polium* extract. Proceeding of the 2nd African congress on biology and health, 10-12 Novembre 2012 à Sétif, Algérie.

Communications:

- **Krache I.**, Boussoualim N, Trabsa H, Baghiani A, Charef N, Arrar L. *In vivo* antioxidant scavenging, antihemolytic activity effects of *Teucrium polium* extract. 2nd African congress on biology and health, 10-12 Novembre 2012, Sétif, Algérie.
- **Krache I.**, Boussoualim N, Trabsa H, Baghiani A, Arrar L. Hypouricemic effects of *Teucrium polium* and *Tamus communis* extracts. 5^{ème} Symposium International des Plantes Aromatiques et Médicinales, 14-16 Novembre 2013, Marrakech, Maroc.
- **Krache I.**, Boussoualim N, Trabsa H, Ouhida S, Daamouche Z, Charef N, Baghiani A, Arrar L. Acute and chronic toxicological evaluation of the total methanolic extract of *Teucrium polium* in male white mice. 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods Inhibitory, 14-17 October 2014, Istanbul, Turkey.
- **Krache I.**, Boussoualim N, Trabsa H, Ouhida S, Daamouche Z, Charef N, Baghiani A, Arrar L. Evaluation of acute and chronic toxic effects of Algerian germander in *Female Swiss albino* mice. 3^{ème} Congrès International de la biodiversité végétale, 9-11 Octobre 2015, Marrakech, Maroc.

Dédicaces

A Mon père KRACHE Djamil et à ma mère KHABAT Charazed
Vous n'avez ménagé aucun effort pour nous pour nous donner une meilleure éducation. Vous avez su créer en nous l'amour du travail bien fait. Vous nous avez guidés avec rigueur mais aussi avec amour. Vous avez été toujours là quand nous avons besoin de vous et sans vous, nous ne serions pas devenus ce que nous sommes aujourd'hui.

Mon fils " Wassim "

Mon frère " Zinnedine "

Mes sœurs Rima, Nouha et Rania.

Mes neuvoux Adem et Youcef

A mes amies fidèles Naouel Boussoualim et Hayet Trabsa

A la pensée de ma grande mère "Zouina" et mon frère "Said"

Vous nous avez été arrachés au moment où nous nous y attendions le moins. Vous resteriez à jamais gravés dans nos cœurs. Paix à vos âmes.

A toute ma famille

Mes amies et mes collègues de travail.

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

Imane KRACHE

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à **Allah** le tout puissant de m'avoir accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de mon rêve et le bonheur d'achever ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon promoteur **Pr. Lekhmici ARRAR** qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant toute aide disponible, et en me consacrant de son temps précieux.

Ma vive reconnaissance au **Pr. Saliha DAHAMNA**, professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse,

Mes remerciements vont également à **Pr. Mesbah LAHOUEL**, Université de Jijel, **Dr Sabah BOUMERFEG**, Université de Bordj Bouarréridj et **Pr. Sakina ZRIZER**, Université de Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement **Pr. Djamel ABDELOUCHE**, **Dr Soraya OUHIDA** maître assistante au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif, **Dr. Faycel BENBACHA** ainsi que tous les techniciens et stagiaires du laboratoire d'anatomo-pathologie pour leur aide précieuse dans la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Je remercie **Pr. Abderezak TOUABTI** responsable du laboratoire Central de l'Hôpital Hospitalo-Universitaire de Sétif. Mes sincères remerciements vont également à **Mr. Rachid BENADI** et **Mr Mourad YEHIA-CHERIF** et tout le personnel de ce laboratoire pour leurs diverses contributions.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

RESUME

La Germandrée (*Teucrium polium*) est couramment utilisée comme plante médicinale en Algérie contre une variété de pathologies humaines. La présente étude vise à évaluer les effets antioxydant, anti-hémolytique, anti-hyperuricémique, anti-inflammatoire et toxique de l'extrait méthanolique de *T. polium* de (*Teucrium polium* methanolic extract : TPME). Les activités antioxydantes ont été évaluées *in vivo* où le TPME n'a pas montré un effet protecteur net contre le stress oxydatif dans les érythrocytes. L'ensemble du système de défense antioxydant ne semble pas être amélioré dans le plasma (tests FRAP et DPPH). La capacité protectrice des globules rouges a été déterminée en utilisant la cinétique de l'hémolyse par la détermination du temps de demi-vie de l'hémolyse (HT₅₀) qui était de 179.6± 10.53 min et pour le groupe Vit C et le témoin est de 158.2 ± 3.85 et 146.5 ± 1.78 min, respectivement. Le TPME, administré par voie intrapéritonéale avec la dose de 50 mg / kg souris *Swiss albino* hyperuricémiantes induit par l'oxonate de potassium a causé une diminution du taux d'acide urique sérique (3.3 ± 0.18 mg/l) par rapport au groupe qui a reçu l'oxonate de potassium OP (6.33 ± 0.46 mg/l). L'évaluation du taux de la créatinine et de l'urée après le traitement avec l'extrait de la plante est normale avec absence de dommages rénaux. L'effet anti-inflammatoire du TPME *in vivo* (100 mg / kg de poids corporel) réduit l'œdème de l'oreille induit par l'acétate de phorbolmyristate (PMA) mais avec un degré d'activité anti-inflammatoire modéré (I% = 18.46 ± 1.59 %) comparé au diclofénac utilisé comme médicament de référence (I% = 38.84 ± 1.87 %). L'étude de la toxicité du TPME a été effectuée sur des souris *Swiss albino* des deux sexes. Les paramètres biochimiques, la morphologie et l'histopathologie des organes ont été étudiés. Le TPME a montré une DL₅₀ égale à 442.81 et 686.77 mg/kg de poids corporel chez des souris mâles et femelles, respectivement. Le traitement aigu pendant 7 jours avec une dose de 100 mg/kg n'a pas montré de différence dans le poids corporel, la masse relative et les paramètres biochimiques sanguins. Par contre, l'examen histopathologique a révélé une congestion modérée dans les reins et un infiltrat inflammatoire dans le foie. L'effet chronique (30 jours) avec les doses de 50 et 75 mg de TPME / kg a entraîné une augmentation significative des paramètres de la fonction rénale (urée) et hépatique (aspartate aminotransférase et alanine aminotransférase), accompagnée d'une diminution du taux de cholestérol total à environ 73-77% et 78-79% avec les deux doses étudiées, respectivement. L'examen histopathologique a confirmé les analyses biochimiques par l'observation de zones de nécrose, ballonnisation dégénérescente et péliose dans des sections du foie et une remarquable congestion vasculaire des reins chez les deux sexes. En conclusion, *Teucrium polium* possède un pouvoir pharmacologique, qui soutient son utilisation en médecine traditionnelle. Cependant, son administration prolongée peut provoquer des dommages hépatotoxiques et néphrotoxiques.

Mots-clés: *Teucrium polium*, anti-inflammatoire, antioxydant, DL₅₀, DPPH, FRAP, hémolyse, hyperuricémie, paramètres biochimiques, toxicité.

Abstract

The Germander (*Teucrium polium*) is commonly used as a medicinal plant in Algeria against a variety of human diseases. This study aims to evaluate the antioxidant, anti-hemolytic, anti-hyperuricemic, anti-inflammatory and toxic effects of the methanol extract of *T. polium* (*Teucrium polium* methanolic extract: TPME). Antioxidant activities were evaluated *in vivo* where the TPME didn't show a clear protective effect against oxidative stress in erythrocytes. Across antioxidant defense system did not appear to be improved in the plasma (FRAP and DPPH test). The protective capacity of red blood cells was determined using the kinetics of hemolysis by determining the half-life of hemolysis (HT₅₀) which was 179.6 ± 10.53 min for Vit C group and 158.2 ± 3.85 and 146.5 ± 1.78 min for the control, respectively. The TPME, administered intraperitoneally with a dose of 50 mg / kg to *Swiss albino* mice was induced hyperuricemia by potassium oxonate caused a decrease in serum uric acid levels (3.3 ± 0.18 mg/l) compared to group treated with potassium oxonate OP (6.33 ± 0.46 mg / l). The evaluation of the rate of creatinine and urea after treatment with the plant extract is normal with no kidney damage. The *in vivo* anti-inflammatory effect of TPME (100 mg / kg body weight) reduced the ear edema induced by phorbolmyristate acetate (PMA) but with a moderate degree of anti-inflammatory activity (I % = $18.46 \pm 1.59\%$) compared to diclofenac drug (I% = $38.84 \pm 1.87\%$). The study of the toxicity of TPME was performed on *Swiss albino* mice of both sexes. Biochemical parameters, morphology and histopathology of the organs were studied. The LD₅₀ of TPME was 442.81 and 686.77 mg / kg body weight in male and female mice, respectively. Acute treatment for 7 days with a dose of 100 mg / kg showed no difference in the body weight, the relative mass and blood biochemical parameters. By cons, histopathological examination revealed moderate congestion in the kidneys and an inflammatory infiltrate in the liver. The chronic effect (30 days) with doses of 50 and 75 mg of TPME/kg resulted in a significant increase of the parameters of renal function (urea) and liver (aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), accompanied by a decrease of the cholesterol with both doses studied to 73-77% and 78-79%, respectively. Histopathological examination confirmed the biochemical analysis by observing areas of necrosis, ballooning, degenerative and peliosis in liver sections and remarkable vascular congestion of the kidneys in both sexes. In conclusion, *Teucrium polium* has a pharmacological power that supports its use in traditional medicine. However, its prolonged administration may cause nephrotoxic and hepatotoxic damages

Keywords: *Teucrium polium*, anti-inflammatory, antioxidant, LD₅₀, DPPH, FRAP, hemolysis, hyperuricemia, biochemical parameters, toxicity.

الملخص

نبتة الجعدة (*Teucrium polium*) مستعملة بكثرة كنبتة طبية في معالجة الامراض البشرية الأمراض. تهدف هذه الدراسة إلى تقدير التأثيرات المضادة للأوكسدة ولانحلال الدم وفرط حمض اليوريا في الدم وللإلتهاب وكذا سمية المستخلص الميثانولي لنبتة الجعدة (TPME). تم تقدير النشاط المضاد للأوكسدة في الكائن ولم يعط المستخلص أي تأثير واق لكريات الدم الحمراء من الإجهاد التأكسدي حيث لم يبدي أي تحسن للأنظمة المضادة للأوكسدة في البلازما (إختباري FRAP و DPPH). تم تحديد القدرة الواقية للكريات الحمراء بالإعتماد على حركية تحللها بتقدير زمن نصف الهدم (HT_{50}) الذي كان 179.6 ± 10.53 د بالنسبة للشاهد و 158.2 ± 3.85 د للمستخلص الميثانولي و 146.5 ± 1.78 د للفيتامين C . عند حقن TPME داخل الصفاق بجرعة 50 ملغ / كغ للفئران البيضاء السويسرية التي تم تحريض فرط حمض يوريك الدم لديها بواسطة أوكساليت البوتاسيوم، تسبب في انخفاض مستويات حمض اليوريك في المصل (0.18 ± 3.3 مغ / ل) مقارنة بالمجموعة المعالجة بأوكساليت البوتاسيوم (0.46 ± 6.33 مغ / ل). كان معدل الكرياتينين واليوريا طبيعيا بعد المعالجة بالمستخلص TPME مع عدم وجود تلف الكلى. أما التأثير المضاد للإلتهاب في الحي باستعمال TPME (100 مغ / كغ من وزن الجسم) فبين تخفيض وذمة الأذن الناجم عن خلاصات (PMA) phorbolmyristate، ($I = 18.46 \pm 1.59\%$) مقارنة بديكلوفيناك المستخدم كمنتج مرجعي ($I = 38.84 \pm 1.87\%$). من جهة أخرى، أجريت دراسة على سمية TPME على الفئران البيضاء السويسرية من الجنسين. وتمت دراسة العوامل البيوكيميائية، المورفولوجيا والتشريح المرضي للأعضاء. فأظهرت النتائج لـ TPME ان LD_{50} مساوية لـ 442.81 و 686.77 مغ / كغ عند الذكور والإناث على التوالي. المعالجة الحادة لمدة 7 أيام بجرعة 100 مغ / كغ لم تظهر أي اختلال في وزن الجسم، والكتلة النسبية والعوامل البيوكيميائية الدموية. على العكس، بين التشريح المرضي للأنسجة وجود احتقان في الكلى وارتشاحا التهابيا في الكبد. أدى التأثير المزمن (30 يوما) بالجرعتين 50 و 75 مغ TPME / كغ إلى زيادة كبيرة في مؤشرات وظيفة الكلى (اليوريا) والكبد (alanine aminotransférase، aspartate aminotransférase)، يقابلها انخفاض في الكولسترول مع كل جرعة إلى 73-77% و 78-79%، على الترتيب. وأكد فحص الأنسجة التحليل البيوكيميائي من خلال ملاحظة مناطق للنخر، البالونات، تدهور والتهاب في أقسام الكبد واحتقان الأوعية الدموية للكلى في كلا الجنسين. في الختام، تملك نبتة الجعدة قدرة دوائية تدعم استخدامها في الطب التقليدي. ومع ذلك، قد يسبب تناولها لفترات طويلة تضرر الكلى والكبد.

الكلمات المفتاحية: *Teucrium polium*، المضادة للإلتهابات، ومضادات الأوكسدة، LD_{50} ، DPPH، FRAP، انحلال الدم، فرط حمض يوريك الدم، القياسات البيوكيميائية، سمية.

Liste des abréviations

AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS :	Anti-inflammatoires stéroïdiens
AU:	Acide urique
AAPH :	2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)
BHT:	Butylatedhydroxytoluene
CAT :	Catalase
Chol T :	Cholestérol total
COX :	Cyclooxygénase
CNTL :	Control
Créat :	Créatine
CYP :	Cytochrome P ₄₅₀
CYP3A4 :	Cytochrome P ₄₅₀ 3A4
DL₅₀ :	Dose létale 50
DPPH :	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMSO:	Diméthyle sulfoxyde
EQ :	Equivalent quercétine
ER :	Equivalent rutine
EqAG :	Equivalent acide gallique
ERA :	Espèces réactives d'azote
FRAP :	Ferric Reducing Antioxidant Power
Glu :	Glucose
GPx :	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion disulfure
HT₅₀ :	Temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50 %
IP :	Intrapéritonéale
iNOS :	inductible nitric oxyde synthase
LOO' :	Lipidique peroxyde
NOS :	Nitric Oxyde synthase
O.M.S :	Organisation mondiale de santé
PAL :	Phosphatase alcaline

PNNs :	Polynucléaires neutrophiles
RL :	Radical libre
RNS :	Reactive nitrogen species
RO[•] :	Radical alkoxyde
ROO[•] :	Radical peroxyde
ROOH :	Peroxyde organique
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
SEM :	Erreur standard de la moyenne
SD :	Standard déviation
SOD :	Superoxyde dismutase
<i>t</i>-BHP :	tert-butyle hydroperoxyde
TGP :	Transaminase Glutamate Pyruvate
TPME :	<i>Teucrium polium</i> methanolic extract
UI/L :	Unité internationale par litre
XO :	Xanthine oxydase
XOR :	Xanthine oxydoréductase

Sommaire

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

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. <i>Phytothérapie</i>	4
1.1. Classement des plantes médicinales	4
1.2. Métabolites secondaires.....	5
1.2.1. Hydrates de carbone.....	5
1.2.2. Glucosides ou hétérosides.....	5
1.2.3. Alcaloïdes	7
1.2.4. Huiles essentielles	8
1.2.5. Composés aromatiques	8
1.2.6. Tanins.....	10
2. <i>Toxicité des plantes</i>	11
2.1. Phytotoxicité par administration unique «Toxicité aiguë».....	12
2.2. Phytotoxicité par administration réitérée « Toxicité subaiguë et chronique ».....	13
3. <i>Hépatotoxicité liée à la phytothérapie</i>	13
3.1. Mécanisme de l'hépatotoxicité.....	18
3.2. Evaluation d'une hépatotoxicité.....	19
3.3. Néphrotoxicité et phytothérapie.....	20
3.4. Evaluation de la néphrotoxicité.....	21
3.5. Marqueurs biochimiques de la fonction rénale.....	22
4. <i>Stress oxydant</i>	23
4.1. Définition.....	23
4.2. Radicaux libres.....	23
4.3. Sources des ROS.....	24
4.3.1. Sources exogènes	25
4.3.2. Sources endogènes	25
4.4. Rôles des ROS.....	26
5. <i>Antioxydants</i>	28
6. <i>Inflammation</i>	29
6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	31
6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	32
6.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale	32
7. Présentation de la plante : <i>Teucrium polium</i>	33
7.1. Description botanique	33
7.2. Utilisation traditionnelles et médicales	34
7.3. Données phytochimiques	35
7.4. Données pharmacologiques.....	37
7.5. Données toxicologiques.....	39

MATERIEL ET METHODES

1. <i>Matériels biologiques</i>	41
1.1. Animaux	41
1.2. Matériel végétal	41
2. <i>Méthodes</i>	41
2.1. Extraction et analyse de l'extrait	41
2.2. Dosage des composés phénoliques	42
2.3. Dosage des flavonoïdes	43
2.4. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	43
2.5. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	44
2.5.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang	44
2.5.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH	45
2.5.3. Pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP	46
2.6. Activité anti-hémolytique	47
2.7. Activité anti-inflammatoire	47
2.8. Effet hypouricémiant	48
2.9. Evaluation toxicologique	49
2.9.1. Toxicité aiguë	49
2.9.2. Toxicité de 7 jours	51
2.9.3. Toxicité chronique	51
2.9.4. Examens biochimiques	52
2.9.5. Histopathologie	52
2.10. Analyses statistiques	53

RESULTATS ET DISCUSSION

1. <i>Caractérisation phytochimique</i>	55
2. <i>Activité antioxydante in vitro</i>	57
3. <i>Activité anti-hémolytique</i>	59
4. <i>Activité antioxydante in vivo</i>	62
4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang	62
4.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH	64
4.3. Pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP	65
5. <i>Activité anti-inflammatoire</i>	66
6. <i>Effet hypouricémiant et évaluation de la fonction rénale</i>	69
7. <i>Evaluation toxicologique</i>	74
7.1. Toxicité aiguë et estimation de la DL ₅₀	74
7.2. Chronologie de l'évolution pondérale.....	78
7.3. Masses relatives des organes.....	80

7.4. Effets du TPME sur les paramètres biochimiques.....	85
7.5. Histopathologie.....	88
7.5.1. Histopathologie rénale.....	89
7.5.2. Histopathologie hépatique.....	91
Conclusions et perspectives	98
Références bibliographiques	101

Liste des figures

Figure. 1 : Structures des terpènes.....	7
Figure. 2 : Structures des alcaloïdes naturels importants.	8
Figure.3: Représentation de microstructure hépatique.....	14
Figure. 4 : Zonation structurale et fonctionnelle du foie	16
Figure. 5 : Mécanismes d'action des hépatotoxiques.	19
Figure. 6 : Organisation anatomique et fonctionnelle du rein	21
Figure. 7 : Sources des EOR et ERA.....	24
Figure. 8 : Macromolécules cibles de radicaux libres	28
Figure. 9 : Digramme de classification des antioxydants.	29
Figure. 10 : Médiateurs et cibles impliqués dans les réponses inflammatoires.	31
Figure. 11 : Aspect morphologique de <i>Teucrium polium</i> L.....	34
Figure. 12 : Structure des métabolites secondaires isolés des parties aériennes de <i>T. polium</i>	36
Figure. 13 : Neoclérodanes diterpénoides 8-18 de <i>T. polium</i>	40
Figure. 14 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	42
Figure. 15 : Droite d'étalonnage de la quercétine.....	43
Figure. 16 : Les courbes d'étalonnage de FeSO ₄	58
Figure. 17 : Activité antiradicalaire de TPME.....	60
Figure. 18 : Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (Témoin) et en présence de Vit C et en présence de TPME.....	62
Figure. 19 : Relation entre la valeur Δt et la concentration de TPME et Vit C.	63
Figure. 20 : Cinétique de l'hémolyse provoquée par le <i>t</i> -BHP des groupes traités par ; NaCl 0.9% (CNTL), Vit C (50 mg/kg) et TPME (100 mg/kg).	64
Figure. 21 : Temps de demi-hémolyse (HT ₅₀) pour les différents groupes traités par par ; NaCl 0.9% (CNTL), Vit C (50 mg/kg) et TPME (100 mg/kg).	66
Figure. 22 : Pourcentage d'inhibition de poids et d'épaisseur d'œdème des groupes traités avec le Diclofénac (10 mg/kg) et le TPME (100 mg/kg).	84
Figure. 23 : Coupes histologiques des oreilles des souris mâles témoin traitées avec l'eau physiologique.	68
Figure. 24 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec le Diclofénac.....	68
Figure. 25 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique de <i>T. polium</i> (TPME).	70

Figure. 26 : Concentration d'acide urique plasmatique et hépatique des groupes traités avec NaCl 0.9 % (Témoin), OP (200 mg/kg), OP+Allopurinol (10 mg/kg), OP+TPME (100 mg/kg).....	73
Figure. 27 : Evaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine	76
Figure. 28 : Courbe dose réponse chez les souris mâles (A) et femelles (B) traités par voie intrapéritonéale par le TPME.	79
Figure. 29 : Changement du poids corporel des souris mâles (a) et femelles (b) dans les conditions de toxicité chronique par le TPME	81
Figure. 30 : Valeurs de la masse relative des organes des souris mâles pour les différentes doses au cours du traitement aigu avec le TPME.	82
Figure. 31 : Valeurs de la masse relative des organes des souris femelles pour les différentes doses au cours du traitement aigu avec le TPME.	83
Figure. 32 : Valeurs de la masse relative des organes des souris mâles pour les différentes doses au cours du traitement chronique avec le TPME	84
Figure. 33 : Masse relative des organes des souris femelles pour les différentes doses au cours du traitement chronique avec le TPME.	85
Figure. 34 : Coupes histologiques du tissu rénal des souris mâles (A: témoin, B: traitée) et femelle (C: témoin, D: traitée).....	89
Figure. 35 : Coupes histologiques du tissu rénal après traitement chronique des souris avec les doses de 50 et 75 mg/kg de TPME des souris mâles (A: témoin, B et C traitées avec 50 et 75 mg / kg, respectivement) et femelles (D: témoin, E et F traitées avec 50 et 75 mg / kg, respectivement).....	90
Figure. 36 : Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins mâles et femelles (A et C) et traitées (B et D) respectivement avec la dose de 100 mg/kg de TPME.	92
Figure. 37 : Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins mâles et femelles (A et D) et traitées par le TPME dans les conditions de toxicité chronique (B et E) et (C et F) avec les doses de 50 et 75 mg /kg respectivement.....	93
Figure. 38 : Bioactivation proposé de la Teucrine issue de <i>Teucrium chamaedrys</i>	70

Liste des tableaux

Tableau. 1 : Structures et classification des principaux acides phénoliques	9
Tableau. 2 : Structure chimique de quelques flavonoïdes	10
Tableau. 3 : Valeurs de DL ₅₀ de quelques plantes médicinales.....	12
Tableau. 4 : Exemples des cas d'hépatotoxicité associés à la phytothérapie.	17
Tableau. 5 : Marqueurs biochimiques des atteintes hépatiques toxiques	20
Tableau. 6 : Principaux biomarqueurs sériques des atteintes rénales	22
Tableau. 7 : Différents types des espèces réactives.....	24
Tableau. 8 : Principaux rôles physiologiques des radicaux libres	27
Tableau. 9 : Principaux composés bioactifs isolés des parties aériennes de <i>Teucrium polium</i>	37
Tableau. 10 : Principales actions pharmacologiques des parties aériennes de <i>T. polium</i>	38
Tableau. 11 : Comparaison des rendements des différentes techniques d'extraction de <i>T. polium</i> Erreur ! Signet non défini.	
Tableau. 12 : Temps de demi-hémolyse (HT ₅₀) pour les différentes concentrations étudiées de TPME et Vit C.	55
Tableau. 13 : Pouvoir réducteur (PR) par le FRAP (mmol/μl) des groupes traités avec NaCl 0.9 % (CNTL), Vit C (50 mg/Kg) et le TPME (100 mg/Kg).....	75
Tableau. 14 : Symptômes de toxicité aiguë observés avec le TPME.	75
Tableau. 15 : Détermination des différentes doses létales (DL) de TPME chez les souris par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (distribution normale).....	77
Tableau. 16: Approche comparative des valeurs de DL ₅₀ des différents extraits de <i>T. polium</i>	78
Tableau. 17 : Effet du traitement aigu sur le poids (g) des groupes ; témoin (NaCl) et traité avec le TPME (100 mg/kg).	85
Tableau. 18 : Analyses biochimiques de traitement aigu des souris males et femelles par NaCl 9‰ (témoin) et le TPME avec la dose 100 mg/kg (IP, n = 8).....	85
Tableau. 19 : Analyses biochimiques de traitement aigu des souris males et femelles par NaCl 9‰ (témoin) et le TPME avec les doses 50 et 75 mg/kg (IP, n = 8)..	86

Introduction générale

L'ancienne «matière médicale», qui répertoriait les végétaux dans leurs aspects thérapeutiques, a d'ailleurs maintenant pris le nom, plus scientifique, de «pharmacognosie». Les plantes médicinales constituent une alternative idéale aux médicaments chimiques ou spécialités trop chers à fabriquer ou à acheter pour les pays en voie de développement. Aujourd'hui, en Algérie, comme partout en Afrique on constate que les populations face au problème des coûts et/ou d'accessibilité des spécialités notamment en zone rurale, se retournent de plus en plus vers les pharmacies traditionnelles et les tradipraticiens (herboristes), (Bruneton, 1999).

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S); la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit), (Gouille *et al.*, 2004). La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : efficacité, qualité et sécurité (Barnes *et al.*, 2007).

Les plantes consommées comme médicaments ou compléments alimentaires bénéficient de l'image d'une médecine douce car naturelle. Il faut pourtant être vigilant quant aux effets secondaires potentiels engendrés par ces thérapies. En réalité, la nature abrite toute une série de plantes toxiques, comprenant des plantes vénéneuses et hallucinogènes, capables de provoquer des symptômes graves causant des perturbations des métabolismes des différents organes et pouvant même provoquer la mort. Les effets secondaires de la phytothérapie ont été souvent évoqués ces dernières années : néphrotoxicité et carcinome urothélial dus à *Aristolochia fangchi* (Selvan *et al.*, 2013), hépatotoxicité du kava kava ou de *Teucrium chamedrys* (germandrée petit-chêne), interactions médicamenteuses avec

Hypericum perforatum (Reem et Consolato, 2013). *Teucrium polium*, espèce voisine de *Teucrium chamedrys* (Larrey et Faure, 2011), connue dans la région de Sétif par « Jaada », est une plante traditionnellement réputée sans risque peut s'avérer hépatotoxique lorsqu'elle est utilisée à large échelle. L'intoxication liée aux plantes se fait généralement par l'ingestion directe de plantes, que les individus croient comestibles ou bénéfique pour sa santé (Savvidou *et al.*, 2007).

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel consiste à l'étude des effets bénéfiques (antioxydant, anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-hyperuricémiant) et toxiques, chez les souris males et femelles, de l'extrait méthanolique de la Germandrée: *Teucrium polium* L. qui possède des effets antioxydants et scavenger des radicaux libres (Ljubuncic *et al.*, 2006 ; Ardestani et Yazdanparast, 2007; Boumerfeg *et al.*, 2009). Les objectifs visés dans la présente étude sont :

- Analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium*,
- Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait *in vitro* (DPPH), *in vivo* (DPPH et FRAP) et la capacité antioxydante totale du sang ; étude des effets de l'extrait sur l'hémolyse des globules rouges,
- Action anti-inflammatoire des extraits sur des souris comme modèle animal,
- Effet hypouricémiant, également sur des souris soumises à un traitement hyperuricémiant par l'oxonate de potassium,
- Détermination de la variation des paramètres liés aux complications engendrées suite au traitement par l'extrait méthanolique de la plante *in vivo* (toxicité aiguë et chronique) avec une évaluation histopathologique (foie et reins) de l'action de l'extrait brut méthanolique de *T. polium*.

Ce travail s'inscrit dans cette perspective et a été motivé par :*(i)* la volonté de promouvoir et de valoriser les plantes médicinales en Algérie, plus précisément dans la région de Sétif, *(ii)* la nécessité de faciliter l'accès du public aux médicaments à moindre coût compte tenu du coût élevé des médicaments conventionnels et *(iii)* la sécurité d'utilisation de ces plantes qui doit être le critère primordial de choix des plantes médicinales.

Partie bibliographique

1. Phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La phytothérapie utilise les plantes ayant des propriétés médicinales (ou plus précisément la "partie active" ou une préparation de celles-ci). Les préparations peuvent être obtenues par macération, infusion, décoction, ou sous forme de teinture, poudre totale, extraits etc. Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais dans la plupart des cas des espèces sauvages d'où la nécessité de l'identification précise des plantes employées. Étant donné que le nombre considérable de végétaux supérieurs, plus de 250000 dans le monde, il est nécessaire d'avoir un système de classification à la fois simple et rationnel. Encore faut-il, au préalable, pouvoir désigner toute espèce végétale, d'une façon claire, précise et identique pour tous (Arun *et al.*, 2012).

1.1. Classement des plantes médicinales

D'une manière générale, les plantes peuvent être classées en 3 catégories (Sanjoy et Yogeshwer, 2003):

- **Plantes aliments** ou plantes comestibles et qui représentent une part très importante de la ration alimentaire de l'homme et des animaux herbivores.
- **Plantes médicinales**; ce sont les espèces botaniques utilisées en phytothérapie et médecine populaire pour guérir certaines affections chez l'homme et les animaux.
- **Plantes poisons ou plantes toxiques** ; ce sont les plantes qui peuvent entraîner des accidents toxicologiques chez les individus qui les ingèrent.

La phytothérapie revient à la mode depuis quelques années dans les pays occidentaux et s'appuie sur des traditions millénaires. Une des principales origines vient de l'Asie où

l'utilisation de plantes médicinales constitue une partie très importante de la médecine traditionnelle basée sur l'idée que ce qui est naturel ne peut être que bénéfique et la notion que les plantes médicinales, à défaut d'être très efficaces, sont au moins complètement inoffensives (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2004). Les composés phytochimiques, dont beaucoup s'accumulent en concentrations élevées chez certaines espèces végétales, sont considérés comme des métabolites secondaires. Bien ignoré pendant longtemps, leur fonction attire de plus en plus l'attention car certains métabolites sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, des antibiotiques, insecticides et herbicides (Bruneton, 2001).

1.2. Métabolites secondaires

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui ne sont pas synthétisés directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Les plus importants sur le plan pharmaco-toxicologiques sont :

1.2.1. Hydrates de carbone

Ce sont des composés apparentés d'origine végétale ayant un potentiel médicinal et thérapeutique incluant les fibres de la cellulose et ses dérivés, l'amidon et ses dérivés de dextrines, les fructanes, les mucilages, les pectines, les gommes et les résines. Ces composés sont révélés avoir des activités immunomodulatrices, anti-tumorales, anticoagulantes, hypoglycémiantes et antivirales (Bruneton, 2001 ; Kashani *et al.*, 2012).

1.2.2. Glucosides ou hétérosides

Se composent de deux parties ; l'une contient un sucre, par exemple le glucose, et est le plus souvent inactive, tout en exerçant un effet favorable sur la solubilité du glucoside et son absorption et distribution dans le corps. L'effet thérapeutique est déterminé par la

seconde partie, la plus active, nommée aglycone (ou génine). Selon leur composition chimique, on distingue plusieurs groupes de glucosides: les saponosides représentés par les st ro ides et les terp no ides (Figure 1). Ainsi on distingue les cardiotoniques, les anthraquinoniques, les cyanogènes, les lactoniques et les glucosinolates (Kashani *et al.*, 2012).

Les terp no ides sont une classe de produits naturels formés par des motifs d'isoprène   5 atomes de carbones (C₅H₈). Ils sont classés en fonction du nombre des unités isoprène en monoterp no ides qui ont deux motifs d'isoprène (Geranyl pyrophosphate, Eucalyptol, Limonène, Citral, Camphore et Pinène), sesquiterp no ides qui ont trois motifs d'isoprène (Artemisinine, Bisabolol et Farnesol), diterp no ides composés par quatre unités isopréniques (Rétinol, r tinal), triterp no ides formés par six unités isopréniques (Lanosterol et scalène) et tetraterp no ides qui contiennent huit unités isopréniques acycliques (lycopène), monocyclique (gamma-carotène) et bicyclique (α et β carotènes), (Kashani *et al.*, 2012).

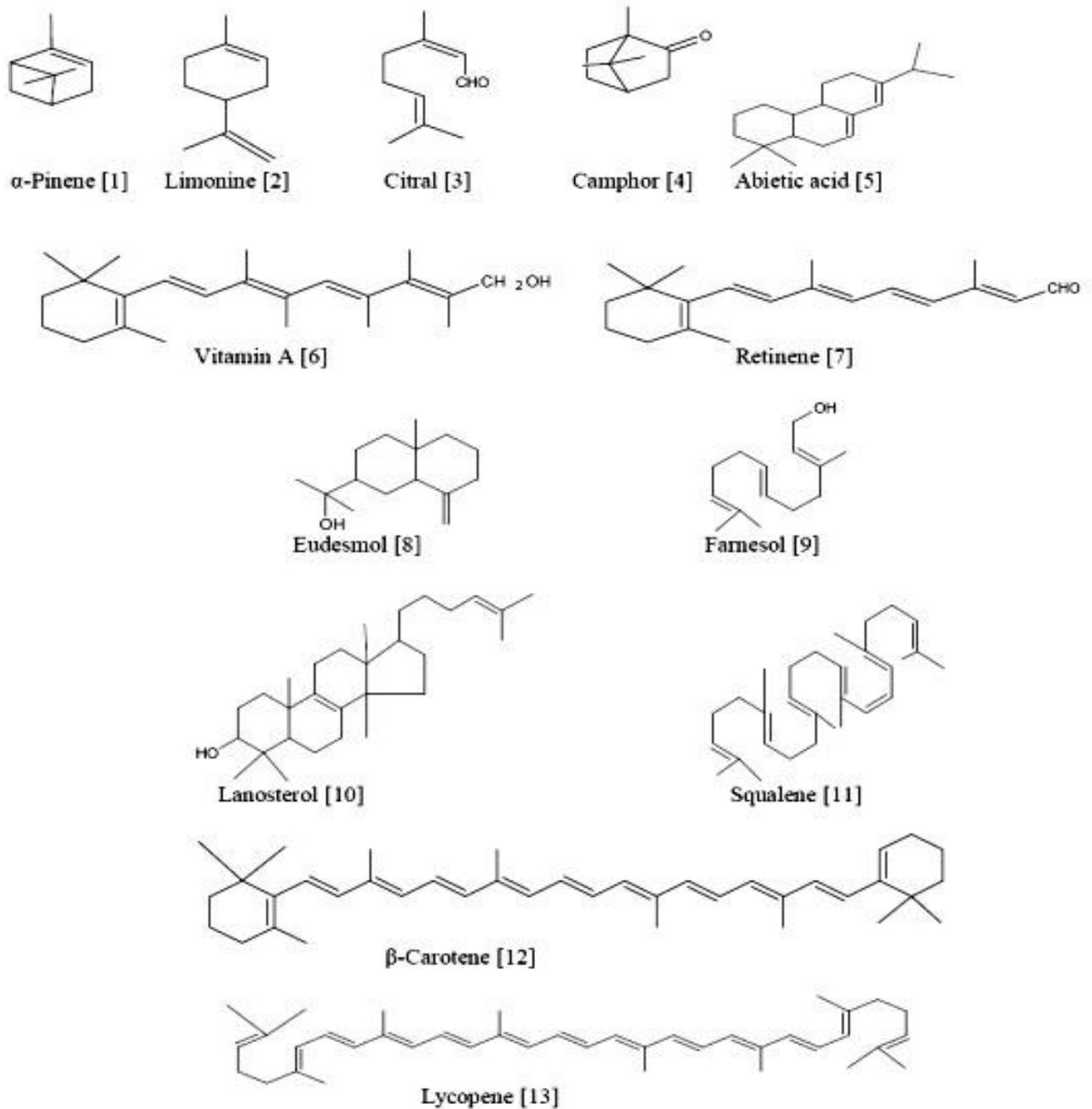


Figure. 1 : Structures des terpènes (Kashani *et al.*, 2012).

1.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales, azotés, basiques, doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées (Figure 2). Cependant, la plupart des alcaloïdes sont très toxiques (Kashani *et al.*, 2012).

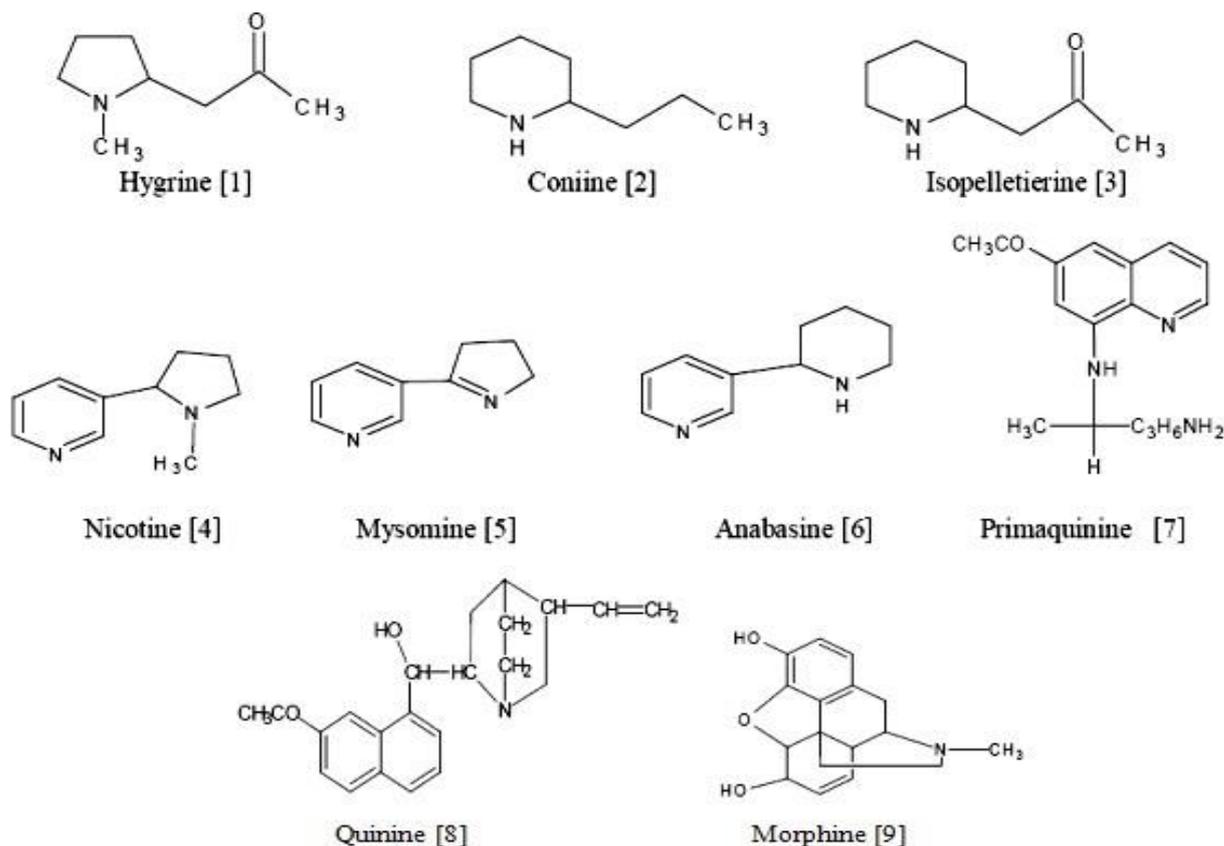


Figure. 2 : Structures des alcaloïdes naturels importants (Kashani *et al.*, 2012).

1.2.4. Huiles essentielles

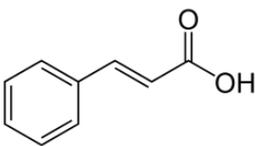
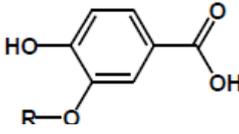
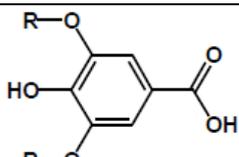
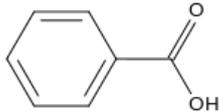
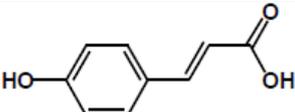
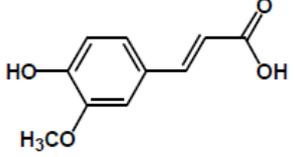
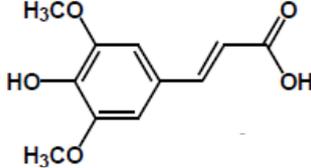
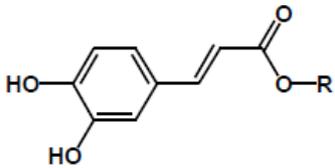
Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. Ce sont en effet les produits de base utilisés pour ajouter des odeurs caractéristiques, en raison de leur forte volatilité dans les industries de parfumerie telles que des produits cosmétiques et ménagers ainsi que les arômes alimentaires pour incorporer aux aliments des saveurs spécifiques (Bruneton, 1999).

1.2.5. Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des composés cycliques formés à partir du benzène et de ses dérivés. Ces molécules, bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes dont les plus simples sont les acides phénoliques, qui sont des composés polyphénoliques non-

flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux classes principales qui sont des dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (Tableau 1).

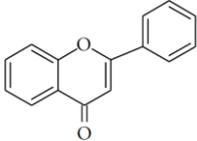
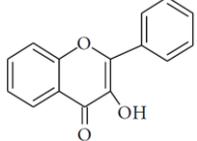
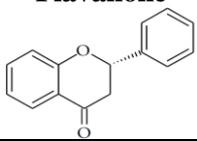
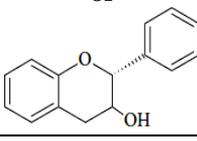
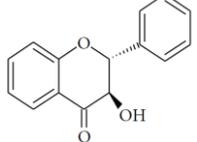
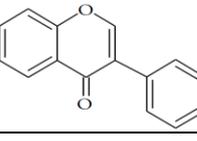
Tableau 1 : Structures et classification des principaux acides phénoliques (Oroian et Escriche, 2015)

Classe	Structure	Acide phénolique
 Acide cinnamique	 Acide vanillique (R = OCH ₃) Acide Protocatechuique (R=H)	
	 Acide gallique (R = H) Acide syringique (R = OCH ₃)	
 Acide benzoïque	 Acide <i>p</i> -coumarique	
	 Acide férulique	
	 Acide sinapique	
	 Acide caféique (R = H) Acide chlorogénique (R = 5-quinonyl)	

Les polyphénols sont des métabolites secondaires ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes (Tableau 2) qui sont des composés polyphénoliques naturels hydrosolubles douées d'une multitude d'actions biologiques (Yao *et al.*, 2004). Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrone (anneaux A et C). Ils sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisées ; ce sont les

flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, les flavanols et les isoflavones (Saxena *et al.*, 2013).

Tableau 2 : Structure chimique de quelques flavonoïdes (Oroian et Escriche, 2015)

Formule chimique	Nom	Substitution								
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'
	Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
	Chrysin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H
	Lutéoline	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
	Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
	Myricétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
	Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
	Rutine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
	Naringénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
	Hespérétine	H	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
	Catéchine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
	Epicatechine	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	OH
	Taxifoline	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
	Génistéine	/	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
	Daidzéine	/	H	H	OH	H	H	H	OH	H

1.2.6. Tanins

Les tanins constituent un mélange de nature polyphénolique hydrosoluble avec polymérisation. Ces substances de composition chimique variable présentent un caractère commun: leur capacité de complexer les protéines (albumines), les polysaccharides (cellulose, hémicellulose, pectine), les acides nucléiques, les métaux lourds et les alcaloïdes. Les tanins

sont répartis en quatre groupes : gallotannins, ellagitannins, tannins complexes et tannins condensés (Bruneton, 1999 ; Kashani *et al.*, 2012).

2. Toxicité des plantes

Avant d'examiner l'activité thérapeutique d'une drogue ou de ses phyto-constituants, il est nécessaire de connaître sa toxicité. Toute substance biologiquement active est susceptible, du moins à fortes doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs (Soetan et Aiyelaagbe, 2009). Les effets secondaires de la phytothérapie ont été souvent évoqués ces dernières années telles que la néphrotoxicité due aux plantes du genre *Aristolochia*, l'hépatotoxicité du *kava kava* ou de *Teucrium chamedrys* ou d'*Hypericum perforatum*. Des plantes traditionnellement réputées sans risque peuvent aussi s'avérer toxiques lorsqu'elles sont utilisées à large échelle (Stickel *et al.*, 2005).

Un toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener à la mort (Viala et Botta, 2007). La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, médicaments et contaminants. Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, saponines et autres. Ceci augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques (Saad *et al.*, 2006). La toxicité d'une substance dans l'organisme vivant dépend de sa nature, sa dose et de la durée d'exposition. Les différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques participent également au degré de toxicité. Les facteurs propres à chaque individu peuvent modifier l'absorption, la distribution, l'excrétion,

les transformations métaboliques et la sensibilité du récepteur dans l'organe cible (Singh *et al.*, 2011).

2.1. Phytotoxicité par administration unique «Toxicité aiguë»

L'étude de la toxicité aiguë permet d'estimer la dose qui tue 50% des animaux d'expérience (dose létale DL₅₀) par rapport au lot témoin (Diallo, 2005). La DL₅₀ est un indice de classement des substances toxiques et/ou végétales selon leurs degrés de gravité (Oduola *et al.*, 2007). Le tableau 3 rapporte quelques valeurs de DL₅₀ de plantes médicinales fréquemment utilisées en médecine traditionnelle.

Tableau 3 : Valeurs de DL₅₀ de quelques plantes médicinales (Saad *et al.*, 2006) avec modification.

Espèce	Famille	Parties étudiées	DL ₅₀
<i>Alchemilla vulgaris</i> L.	Rosaceae	feuilles	17.3
<i>Atriplex halimus</i> L.	Chenopodiaceae	feuilles	21.5
<i>Cichorium pumilum</i> Jacq.	Asteraceae	feuilles	23.6
<i>Eruca sativa</i> Miller	Brassicaceae	feuilles	21.6
<i>Eryngium creticum</i> Lam.	Apiaceae	feuilles	20.7
<i>Ferula hermonis</i> Boiss	Apiaceae	racines	8.8
<i>Hypericum triquetrifolium</i> Turra	Hypericaceae	feuilles	14.7
<i>Inula viscosa</i> L.Ait. Inula	Asteraceae	feuilles	11.9
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	feuilles	16.9
<i>Mentha longifolia</i> L.	Lamiaceae	feuilles	14.8
<i>Nigella sativa</i> L.	Ranunculaceae	Graines	19.8
<i>Olea europaea</i> L.	Oleaceae	feuilles	19.3
<i>Saponaria officinalis</i> L.	Caryophyllaceae	racines	5.1
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	feuilles	22.1
<i>Ziziphus spina-christi</i> L. Desf	Rhamnaceae	feuilles	22.2

Les valeurs des DL₅₀ des parties des plantes testées exprimées en g /kg poids des rats étudiés. Des extraits aqueux préparés à partir de matériel végétal séché ont été utilisés. Les valeurs présentées sont des moyennes de 30 à 35 rats testés.

2.2. Phytotoxicité par administration répétée « Toxicité subaiguë et chronique »

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active examinée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie (durée de 2 semaines jusqu'à 6 mois). L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes extérieurs ainsi que la base des comptes rendus nécropsiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent (Ifeoma et Oluwakanyinsola, 2013).

3. Hépatotoxicité liée à la phytothérapie

Le foie est le plus grand organe du corps humain pesant environ 1500 g, et est situé dans le coin supérieur droit de l'abdomen au-dessus de l'estomac, rein droit et des intestins (Bin Hashim *et al.*, 2014). Le foie est constitué de cellules hépatiques épithéliales nommées hépatocytes organisées en travées autour des sinusoides (capillaires hautement perméables où le sang circule) et forment une monocouche autour de chaque capillaire qui sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques (Figure 3), (Singh *et al.*, 2011). 60% à 80 % des cellules du foie sont des hépatocytes mais il existe d'autres types cellulaires : cellules des canaux biliaires (cholangiocytes), cellules endothéliales, cellules de Küpffer (macrophages), cellules stellaires (aussi appelées cellules étoilées), lymphocytes hépatocytaires et cellules pluripotentes ovales (Malhi *et al.*, 2010).

Le foie assure plus de 500 fonctions métaboliques vitales, il intervient dans les métabolismes:

- glucidique (néoglucogénèse, synthèse et catabolisme du glucose),

- lipidique (synthèse des acides gras, des lipoprotéines et des acides biliaires, synthèse et excrétion du cholestérol, hydroxylation de la vitamine D et cétogenèse),
- protidique (catabolisme des protéines plasmatiques telles que l'albumine et les facteurs de coagulation),
- hormonal (hormones stéroïdiennes et polypeptiques),
- de stockage du glycogène, vitamines A, B₁₂ et du Fer.

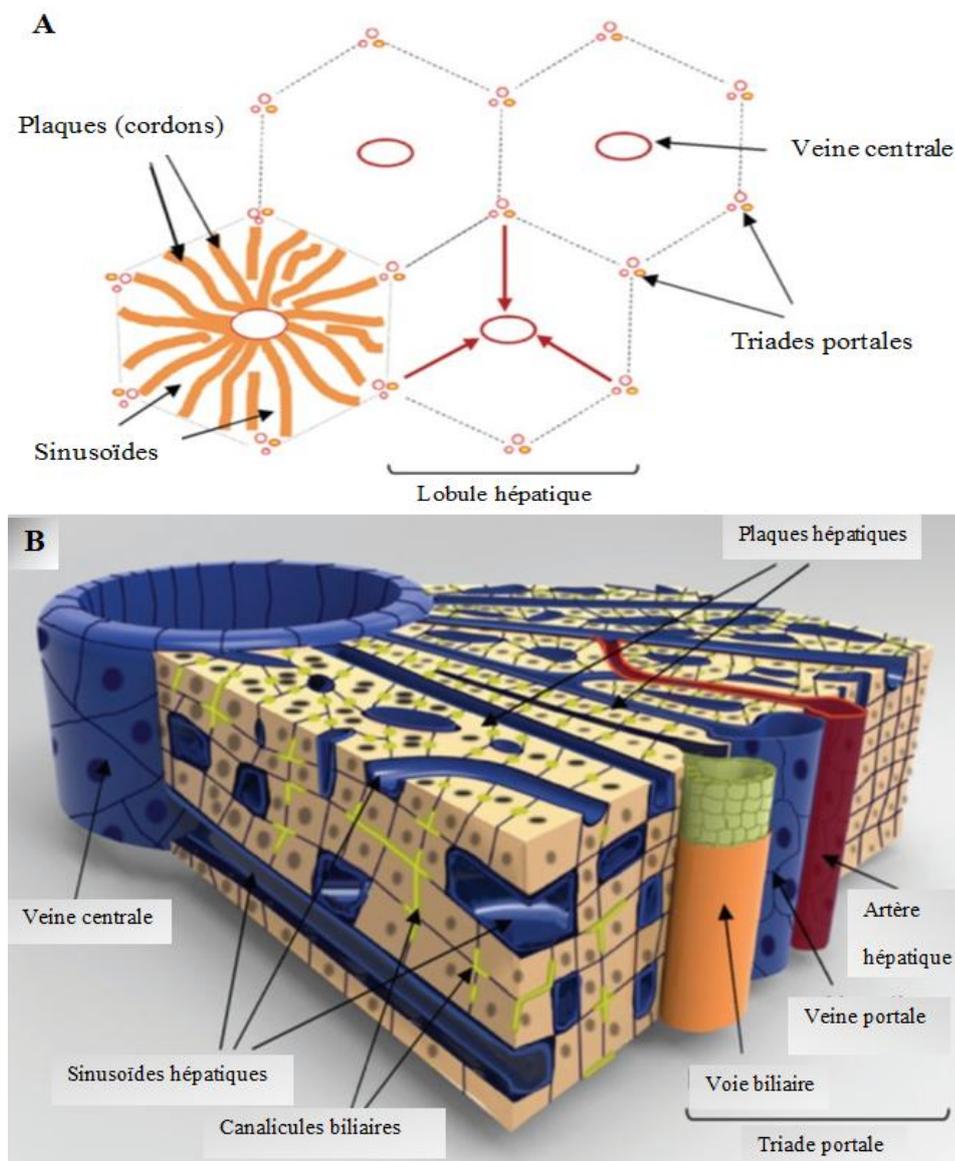


Figure. 3 : Représentation de microstructure hépatique (LeCluyse *et al.*, 2012). (A) Schéma du lobule hépatique et sous-structure de base d'acinus indiquant la direction relative du flux sanguin à partir de des portes triades du flux sanguin vers les veines centrales (flèches rouges). (B) Schéma illustrant l'architecture tridimensionnelle du foie entre la triade portale et la veine centrale. Les réseaux de canalicules biliaires (Jaune-verts parallèles et à l'encontre du flux sanguin à travers les sinusoides).

Le foie est l'organe principal du métabolisme des xénobiotiques (Figure 4). Les enzymes responsables sont principalement les cytochromes P₄₅₀ (CYP), jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme et catalysent les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse. Par-ailleurs, d'autres enzymes dites de la phase II (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyl-transférases ou UGT, sulfoconjugaison SULT), dites de conjugaison, catalysent les réactions de conjugaison.

Généralement, après fonctionnalisation, les transporteurs de la phase III (transportent au travers des membranes les xénobiotiques, et surtout leurs dérivés, en vue de leur élimination de la cellule (Tissandie, 2012). Pour cela, plusieurs processus biochimiques sont mis en jeu, ils aboutissent en général à la formation de produits plus polaires (hydrophiles) que la molécule d'origine, par conséquent facilement éliminables par le rein (Singh *et al.*, 2011).

Le foie est la cible la plus habituelle des atteintes toxiques. Les pathologies hépatiques d'origine médicamenteuse sont fréquentes. Dans la gamme pharmacologique, les antibiotiques et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont les plus fréquemment impliqués (LeCluyse *et al.*, 2012). Les principales atteintes hépatiques d'origine toxique peuvent être soit des atteintes aiguës ; cas de la stéatose (surcharge graisseuse), cholestase (arrêt de l'écoulement biliaire) et nécrose hépatique (cytolysse hépatique ou hépatite), soit des atteintes chroniques ; cas de l'hépatite chronique qui peut être à l'origine d'une insuffisance hépatique telle que la fibrose, tumeurs, cirrhose et cirrhose lobulaires (Singh *et al.*, 2011).

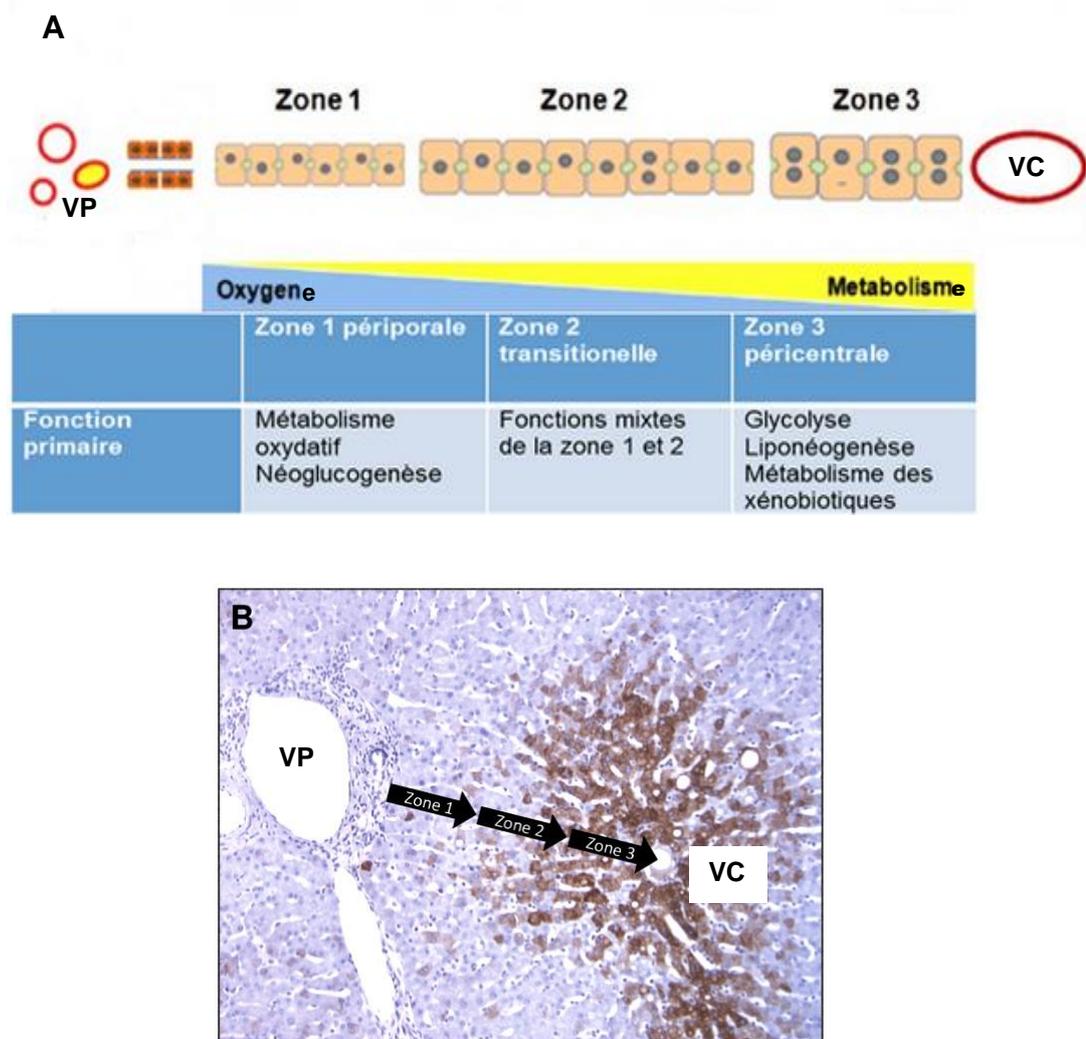


Figure. 4 : Zonation structurale et fonctionnelle du foie (LeCluyse *et al.*, 2012 avec modification). **(A)** Discrettes zones du foie entre la veine porte (VP) et la veine centrale (VC) illustrant des différences dans la taille des cellules, le phénotype, les gradients de pression d'oxygène et le métabolisme. **(B)** Tissu hépatique humain avec des anticorps CYP3A4 (coloration brune) montrant l'expression différentielle des enzymes CYP dans les zones de la microstructure du foie.

L'hépatotoxicité des plantes médicinales est maintenant largement documentée. Le spectre des lésions et manifestations induites est très varié reproduisant une large part des maladies hépato-biliaires. De nouveaux produits s'ajoutent chaque année à la liste de l'hépatotoxicité de la phytothérapie (Tableau 4), (Eschke et Eickhoff, 2015). Par ailleurs, diverses préparations de plantes médicinales peuvent interférer avec le métabolisme des médicaments « classiques », en particulier en induisant ou en inhibant certains systèmes

enzymatiques hépatiques. Il peut en résulter des effets indésirables sérieux (Teschke *et al.*, 2012).

Tableau 4 : Exemples de cas d'hépatotoxicité associés à la phytothérapie (Stickel *et al.*, 2005 ; Reem et Consolato, 2013 avec modification). IHF : Insuffisance hépatique fulminante.

Plantes	Parties utilisées	Applications	Toxines	Mécanisme d'action	Présentation clinique
<i>Atractylis gummifera</i>	racines	Antiémétique, diurétique,	Atractylosides	Inhibition de la gluconéogenèse par interférence avec la phosphorylation oxydative	Hépatite aiguë, IHF
<i>Actea racemosa / Cimicifuga racemosa</i>	Racines et rhizomes	symptômes de la ménopause	Triterpènes glycosides	nécrose et fibrose septale	Auto-immune, Rare
Chaparral (<i>Larrea tridentata</i>)	feuilles	Antioxydant, morsures des serpents	acide nordihydroguaiaretique	Inhibition de la cyclooxygénase et des cytochromes P ₄₅₀	Cholestase, cholangite, Hépatite chronique, cirrhose
Germandrée <i>Teucrium chamaedrys</i>	Parties aériennes	Réduction du poids	Neo-clérodanes diterpénoides	apoptose des hépatocytes	Hépatite aiguë et chronique, fibrose (forme subaiguë)
<i>Teucrium polium</i>	Parties aériennes	Anti-inflammatoire	inconnu	inconnu	IHF (forme aiguë)
Kava (<i>Piper ethysticum</i>)	Racines et rhizomes	Anxiolytique, somnifère	Kava lactones (kavain, dihydrokavain)	Idiosyncratique, dose toxicité dépendante ?	Hépatite aiguë et chronique, cholestase, FHF
Alcaloïdes pyrrolizidines <i>Symphytum officinale Heliotropium</i>	/	thé, contamination des fleurs	Pyrroles toxiques	Toxification par cytochrome P450 3A4	maladie véno-occlusive
Sassafras (<i>Sassafras albidum</i>)	Racines et écorces de racines	thé d'herbe	Safrole	inconnu	Hépatocarcinogénèse (animaux)
St. John's Wort (<i>Hypericum perforatum</i>)	Parties aériennes	Antidépresseur	Hyperforine	induction du Cytochrome P ₄₅₀ et du P-glycoprotéine	Réduction du niveau de la cyclosporine, Anticancéreux, et réduction des niveaux de médicaments antirétroviraux,
Mistletoe (<i>Viscum album</i>)	Plante entière	Hypertension, insomnie, épilepsie, asthme, infertilité, troubles urinaires	Diterpénoides	inconnu	hépatite aiguë

3.1. Mécanisme de l'hépatotoxicité

Un foie pathologique sert comme un outil important pour identifier et caractériser des lésions hépatiques. Les effets hépatotoxiques d'agents chimiques peuvent impliquer différents mécanismes de cyto-létalité. Ces mécanismes peuvent avoir un effet direct sur les systèmes cellulaires et enzymatiques critiques (membrane plasmique, mitochondries, réticulum endoplasmique, noyau et les lysosomes) perturbant ainsi leurs activités ou un effet indirect sur les organites cellulaires grâce à l'activation ou l'inhibition de kinases, facteurs de transcription et des profils d'expression génétique et de signalisation. Les conséquences peuvent conduire à la mort cellulaire provoquée par rétrécissement et démontage nucléaire des cellules (apoptose) ou par la lyse dite nécrose (Rajender et Faust, 2006). L'activation métabolique enzymatique de la molécule mère peut conduire à la formation d'un métabolite réactif, qui peut être détoxifié par liaison à de petites molécules endogènes comme le glutathion (GSH). S'il n'y a pas de désintoxication ou si le pool de petites molécules est épuisé, le métabolite réactif peut conduire au stress oxydatif avec atteinte mitochondriale, soit directement, soit par l'intermédiaire de la liaison covalente aux protéines cellulaires (Kaplowitz, 2004). Ceci peut influencer les facteurs de régulation qui peuvent affecter différents processus tels que le métabolisme des lipides et l'apoptose. La formation d'haptène (protéine cellulaire liée de manière covalente aux toxiques) peut déclencher une réponse immunitaire, soit en attirant des cellules de la réponse immunitaire innée, ou l'activation de la réponse adaptative par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigène et intervention des lymphocytes T ou B (Figure 5), (Van Swelm, 2013).

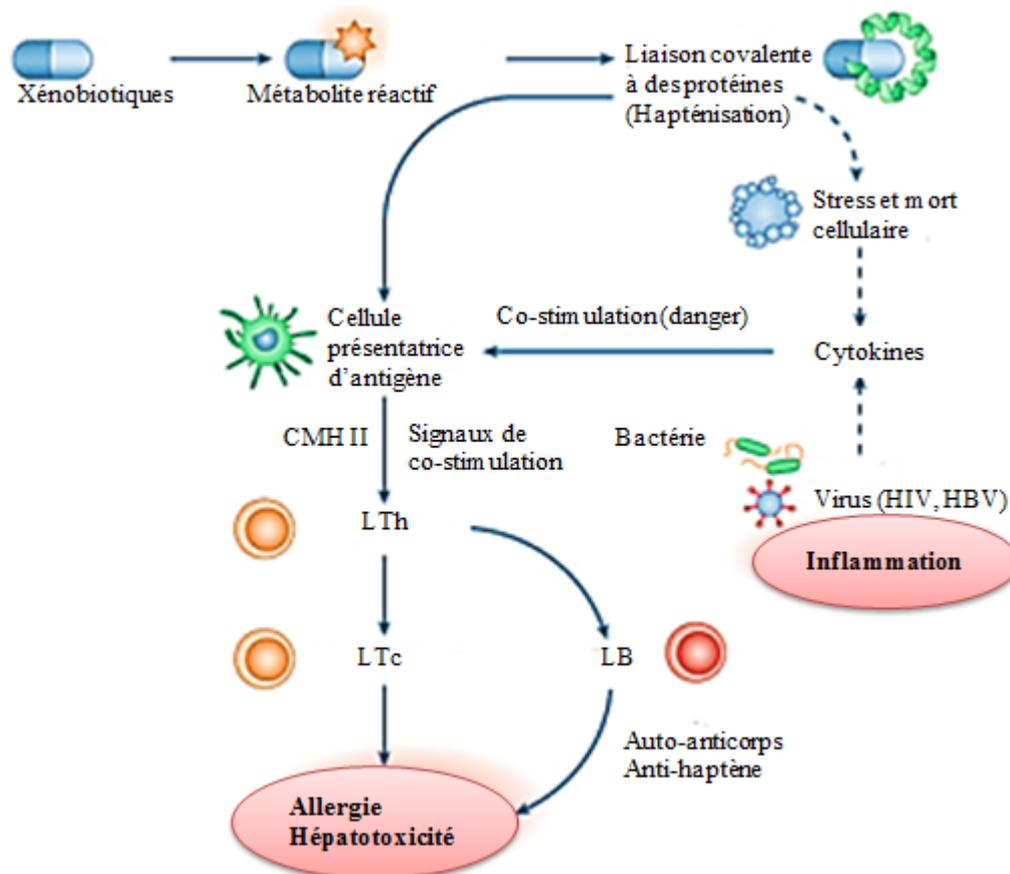


Figure. 5 : Mécanismes d'action d'hépatotoxiques. Quatre processus sont responsables de l'induction d'hépatotoxicité par les xénobiotiques: stress oxydatif, altération des voies de régulation, réponse immunitaire innée et adaptative (Kaplowitz, 2004 avec modification).

3.2. Evaluation d'une hépatotoxicité

Pour évaluer l'état du foie, un examen approfondi doit être mis en place. Il comporte des tests biochimiques des enzymes et protéines plasmatiques, et histologiques (Amacher, 1998 ; Eschke et Eickhoff, 2015). Le Tableau 5 résume l'ensemble des principaux marqueurs biochimiques d'hépatotoxicité avec une description histopathologique des différences lésions observées.

Tableau 5 : Marqueurs biochimiques des atteintes hépatiques toxiques (Singh *et al.*, 2011, avec modification).

Paramètres biochimiques	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire	Lésions histopathologiques
Alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2)	principalement foie ; des traces dans les muscles squelettiques et cardiaques	cytoplasme et mitochondries	Nécrose hépatocellulaire
Aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1)	foie, cœur, muscles, cerveau et rein	cytoplasme et mitochondries	Nécrose hépatocellulaire
γ -Glutamyl transférase (EC 2.3.2.2)	foie, voies biliaires, rein et pancréas	membrane cellulaire	Atteintes hépatobiliaires et cholestase
Glutathion-Stransférase (EC 2.5.1.18)	foie, reins, cellules centro-lobulaires	Cytoplasme mitochondrial	Lésion des hépatocytes précoce; nécrose hépatocellulaire
Bilirubine totale	Directe (foie, bile, l'intestin grêle, gros intestin), Indirecte (cellules réticulo-endothéliales de la rate, sérum)	liquide extracellulaire	Atteintes hépatobiliaires et cholestase
Phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1)	foie, voies biliaires, os, placenta, rein et intestin	membrane cellulaire	Atteintes hépatobiliaires et cholestase
Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27)	Peroxisomes du foie, les muscles, rein, de cœur	mitochondries et réticulum sarcoplasmique	Nécrose hépatocellulaire
Sorbitol déshydrogénase (EC 1.1.1.14)	Foie, reins, vésicule séminale, intestin	Cytoplasme, mitochondrie	Nécrose hépatocellulaire
Albumine	Produit dans le du foie	plasma sanguin	Dysfonction hépatique
Protéines totales	Produit dans le foie et le système immunitaire	plasma sanguin	Dysfonction hépatique
Acides biliaires	Produis dans le foie, stocké dans la vésicule, la vessie et libération dans les intestins	/	Maladies hépatobiliaires

3.3. Néphrotoxicité et phytothérapie

Structurellement, les reins produisent l'urine en filtrant le sang et les déchets métaboliques à l'aide de millions d'unités structurelles appelées néphrons (Figure 6). Le glomérule, partie primaire du néphron contribue à la filtration sélective du sang et des déchets métaboliques (urée, créatinine, acide urique) pour former l'urine. La membrane basale

glomérulaire et les cellules endothéliales constituent une barrière permettant la filtration de l'eau et de petites substances, tout en préservant les protéines (Liu *et al.*, 2015).

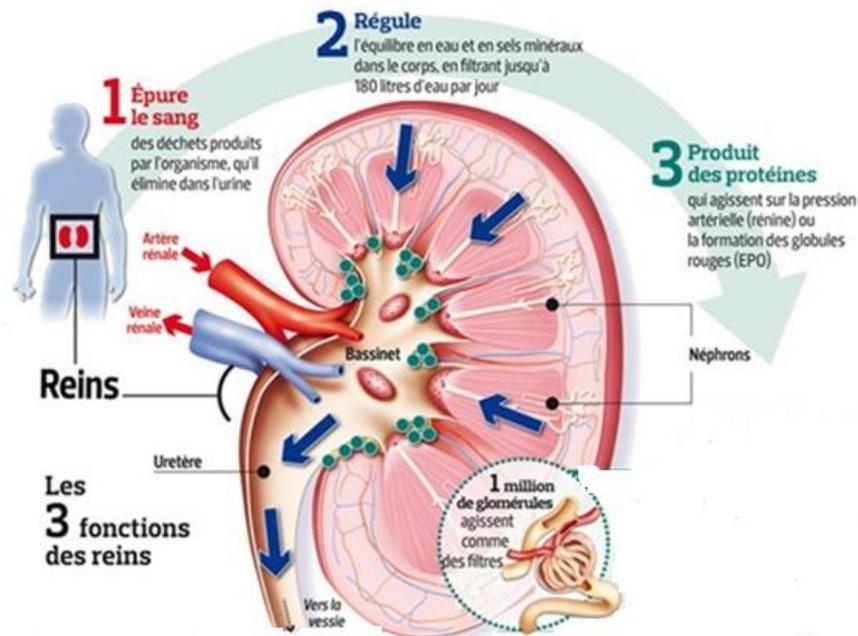


Figure. 6 : Organisation anatomique et fonctionnelle du rein (<http://www.rein-echos.fr/insuffisance-renale/les-reins/>).

Le rein est l'un des principaux organes cibles de la toxicité induite par les xénobiotiques du fait de ses fonctions de filtration, transport, réabsorption et métabolisme de substances chimiques (Gueguen *et al.*, 2012). Particulièrement, il est vulnérable à plusieurs substances toxiques notamment d'origine végétale qui sont susceptibles de causer des dommages à différents sites et de perturber certaines de ses fonctions (Pranav *et al.*, 2013).

3.4. Évaluation de la néphrotoxicité

En raison de la nature complexe et les multiples fonctions du rein, il n'y a pas de test unique peut détecter une néphrotoxicité (Gueguen *et al.*, 2012). L'évaluation de la néphrotoxicité implique donc des études *in vitro* et *in vivo*. Les techniques *in vitro* s'intéressent au maintien de la relation anatomique entre les cellules (microponction, perfusion) et l'isolement des fragments tubulaires et des glomérules. *In vivo*, les études comprennent l'évaluation de la fonction glomérulaire et tubulaire, la protéinurie, l'excrétion urinaire de protéines plasmatiques et de prostaglandines (Jose et Adikay, 2015).

Les mécanismes causant une néphrotoxicité incluent les changements dans l'hémodynamique glomérulaire, la toxicité des cellules tubulaires, l'inflammation, la néphropathie cristale, la rhabdomyolyse et la microangiopathie thrombotique (Kim et Moon, 2012). Les principales lésions rénales rencontrées sont des nécroscubulaires aiguës, vasodilatation ou vasoconstriction de l'artéiole afférente, néphrite interstitielle immunoallergique, lésions de néphroses osmotiques et vacuolisation où les cellules épithéliales tubulaires sont gonflées, comblant plus ou moins la lumière du tube, le cytoplasme clarifie et contient de nombreuses petites vacuoles (Schortgen, 2005).

3.5. Marqueurs biochimiques de la fonction rénale

Le bilan rénal "standard" sert à dépister des biomarqueurs temoins d'un état normal ou d'un éventuel dysfonctionnement du rein. Il comprend des examens sanguins et urinaires complétés par d'autres histologiques si besoin (Gueguen *et al.*, 2012). Le tableau 6 récapitule l'ensemble de marqueurs biochimiques de la fonction rénale.

Tableau 6 : Principaux biomarqueurs sériques d'atteintes rénales (Gueguen *et al.*, 2012).

Marqueur	Fonction ou structure cible	Utilisation expérimentale/ clinique
Marqueurs classiques créatinine urée	Estimation du débit de filtration glomérulaire	Marqueur de référence pour classer les atteintes rénales en clinique mais manque de spécificité.
Electrolytes (sodium, potassium, chlore, calcium, phosphore), glucose, pH et volume urinaire	Fonction tubulaire (réabsorption) évaluée même en cas de faible altération	
Protéines de haut poids moléculaire : Albumine, immunoglobuline, transferrine, haptoglobine	Excrétion élevée de protéines qui indique une altération glomérulaire	Marqueur d'atteinte aiguë ou chronique en clinique (microalbuminurie), degré d'atteinte glomérulaire
Protéines de bas poids moléculaires : α 1-microglobuline, β 2 microglobuline, β -trace protein (BTP), cystatine C, retinol binding protein (RTP)	Marqueurs précoces de dysfonction tubulaire. La BTP et la RBP permettent une meilleure estimation du débit de filtration glomérulaire	Utilisation pour prévoir si une greffe rénale est nécessaire
Enzymes : phosphatase alcaline γ -glutamyl transpeptidase alanine aminopeptidase glutathion-S-transférase (GST)	Tubule proximal (GST α tubules proximaux et GST μ ou π tubules distaux)	Utilisation comme marqueur tubulaire peut être limitée car augmentation lors de pathologies glomérulaires chroniques

4. Stress oxydant

4.1. Définition

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres ou espèces oxygénées réactives (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs (système antioxydant) et à réguler leur production. Ceci conduit à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversibles (Zweier et Talukder, 2006).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, qui lui confère une réactivité (demi-vie courte) vis-à-vis d'autres molécules, soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant, soit à le céder ; c'est alors un radical réducteur. La réactivité des radicaux libres est très variable selon la nature du radical. Les espèces radicalaires sont produites d'une manière continue au sein de l'organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (Favier, 2003 ; Fontaine, 2009).

4.2. Radicaux libres

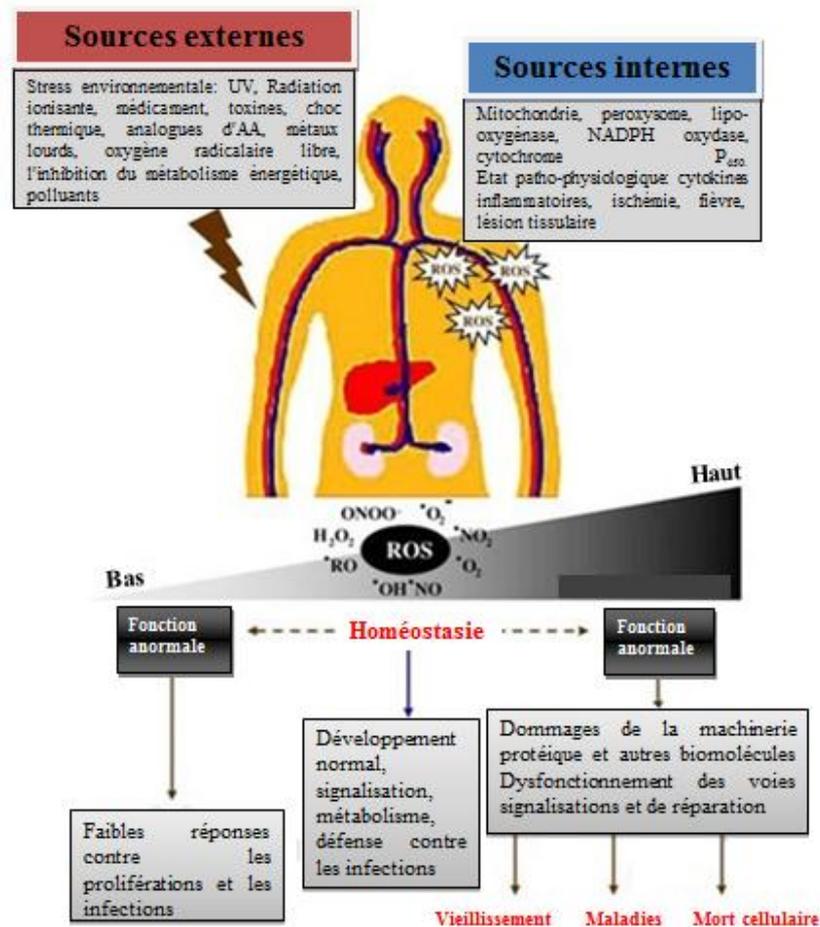
Les radicaux libres peuvent être dérivés de l'oxygène (Espèces réactive d'oxygène : ROS de l'anglais Reactive oxygen species). Il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que sont appelés radicaux primaires (Glasauer et Chandel, 2014). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. D'autres espèces dérivées de l'oxygène ou de l'azote, comme le montre le Tableau 7, ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Choudhari *et al.*, 2014).

Tableau 7 : Différents types des espèces réactives (Choudhari *et al.*, 2014, avec modification)

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Acide hypochlorique	HOCl
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Oxygène singulet	1O_2
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Peroxynitrite	$ONOO^-$

4.3. Sources des ROS

Les ROS sont produites dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes (Figure 7).

**Figure. 7 :** Sources des ROS (Campos *et al.*, 2013).

4.3.1. Sources exogènes

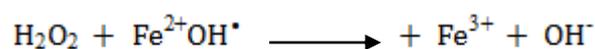
L'organisme humain est soumis à de différentes agressions par des agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Des rayonnements X ou γ , les polluants de l'air (fumée des cigarettes et contaminants industriels) ainsi qu'une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides) et médicaments (antibiotiques et anticancéreux) peuvent contribuer à une production importante des ROS qui se forment comme un produit de leur métabolisme (Chen *et al.*, 2012).

4.3.2. Sources endogènes

Les systèmes intracellulaires (endogènes) sont plus importants du fait que les ROS sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule dans l'organisme. La chaîne respiratoire mitochondriale est l'une des sources physiologiques majeures des $O_2^{\bullet-}$. Elle est une source permanente des ROS cellulaires au niveau des deux sites de production: les complexes I et III (Kardeh *et al.*, 2014). La seconde source est la xanthine oxydoréductase (XOR) qui est une enzyme présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires sanguins et de façon très importante dans le foie et les intestins, sa localisation cellulaire est principalement cytoplasmique (Quiney *et al.*, 2011). La XOR existe sous deux formes interconvertibles connues : la xanthine oxydase (XO) et xanthine déshydrogénase (XDH). La XOR qui est une enzyme qui génère les ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde. La XOR joue un rôle crucial dans la génération de l' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 (Harrison, 2002). Trois autres enzymes peuvent générer les ROS : (1) l'oxyde nitrique synthase (NOS) est une enzyme représentée par trois isoformes : neuronale (nNOS), inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS). Les trois isoformes de NOS sont des générateurs importants du radical NO^{\bullet} (Quiney *et al.*, 2011). Le NO^{\bullet} permet la production des autres espèces réactives de l'azote (reactive nitrogen species : RNS) tel que le peroxy-nitrite (Favier,

2003) ; (2) la lipo-oxygénase présente une source importante de production de ROS dans les parois vasculaires ; cette enzyme catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés (comme les esters de cholestérol et celles trouvées dans les phospholipides) en des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques pour la cellule (Madamanchi, 2005 ; Maccarrone, 2008) et (3) la NADPH oxydase enzyme présente dans différents types cellulaires telle que les cellules phagocytaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de muscles lisses. En effet, cette enzyme génère la formation d' $O_2^{\cdot-}$ par la réaction suivante (Kardeh *et al.*, 2014).

En plus de ces enzymes, il existe deux autres générateurs des ROS. Le peroxyosome qui est une source importante dans la production cellulaire de H_2O_2 , cet organite contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 (Kardeh *et al.*, 2014). Toutefois, ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxydomale afin d'assurer des réactions de superoxydation de d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein (Sandalio *et al.*, 2013). Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont de remarquables promoteurs des processus radicalaires *in vitro*: ils transforment l' H_2O_2 en OH^{\cdot} . La destruction des cellules (hémolyse, cytolyse hépatique) entraîne une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydant. La formation du OH^{\cdot} à partir du H_2O_2 en présence du fer ferreux est dite réaction de Fenton (Fontaine, 2007).



4.4. Rôles des ROS

Le paradoxe des ROS en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des

.....

espèces indispensables à la vie (Kardeh *et al.*, 2014). Selon Dröge (2002), les radicaux libres assurent les fonctions physiologiques résumées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Principaux rôles physiologiques des radicaux libres (Campos *et al.*, 2013).

Espèce	Quelques rôles physiologiques
$^1\text{O}_2$	Amélioration des fonctions immunologiques des lymphocytes. Transduction du signal ; Relaxation du muscle lisse ; Activation de la protéine kinase C ;
$\text{O}_2^{\cdot-}$ et dérivés	Amélioration des fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire dans les lymphocytes T ; Induction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales ; Induction et exécution du phénomène d'apoptose ; Induction de l'expression de la p21; inhibiteur du cycle cellulaire.
NO^{\cdot}	Relaxation des muscles lisses. Modulation des fonctions des protéines kinases, phosphodiesterases, et des canaux ioniques. Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes. Protection contre l'apoptose par inhibition de certaines cascades.

Lors d'un stress oxydant, les ROS non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent les macromolécules contenues dans les cellules (Roleira *et al.*, 2015). Les principaux dommages des cibles biologiques sont montrés sur la figure 8.

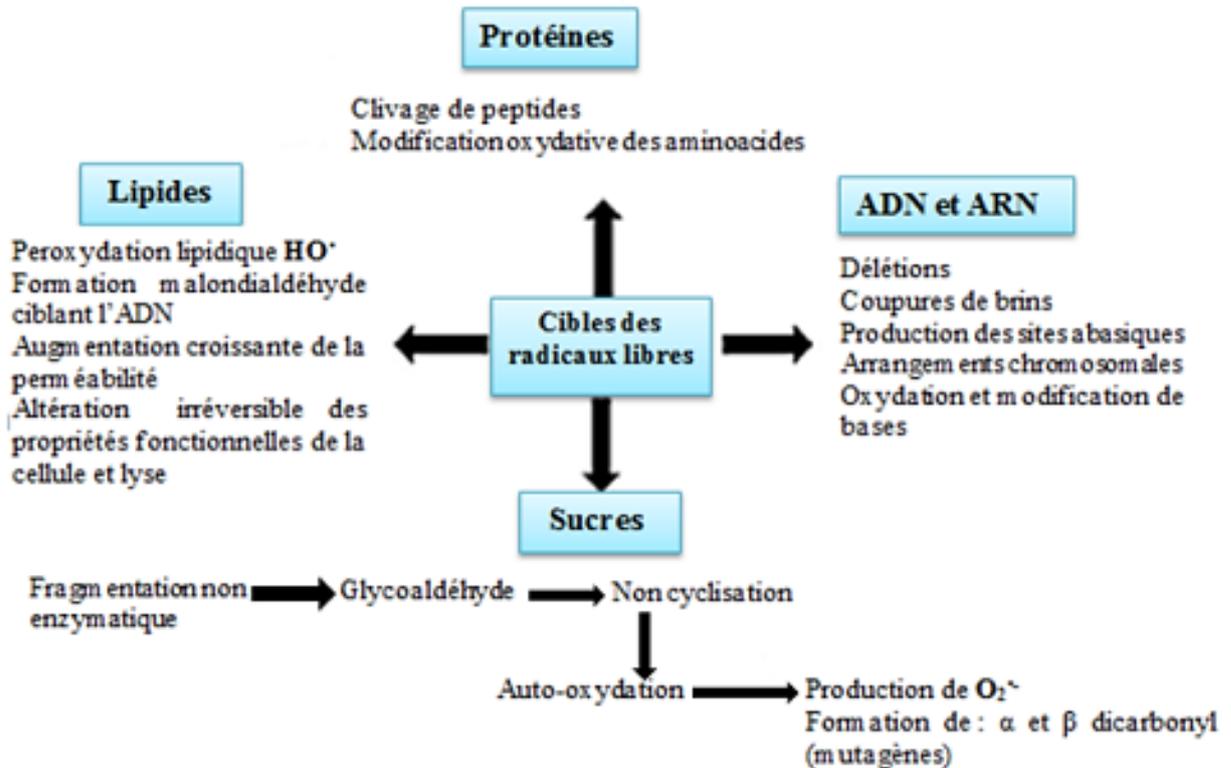


Figure 8 : Macromolécules cibles de radicaux libres (Carocho et Ferreira, 2013 avec modification).

5. Antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des ROS est particulièrement fragile. La production des ROS est strictement régulée par l'organisme qui possède des moyens de défense antioxydante contre les effets potentiellement destructeurs des ROS. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et retarder ou empêcher l'oxydation de ses substrats (Berger, 2006).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et le type cellulaire et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Oroian et Escrich, 2015). Les défenses antioxydantes de l'organisme peuvent être divisées en systèmes deux classes (Figure 9):

(1) enzymatiques, principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (G) (Roleira *et al.*, 2015), et (2) non enzymatiques, telles que les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols (Oroian et Esriche ,2015 ; Saeidnia et Abdollahi, 2013).

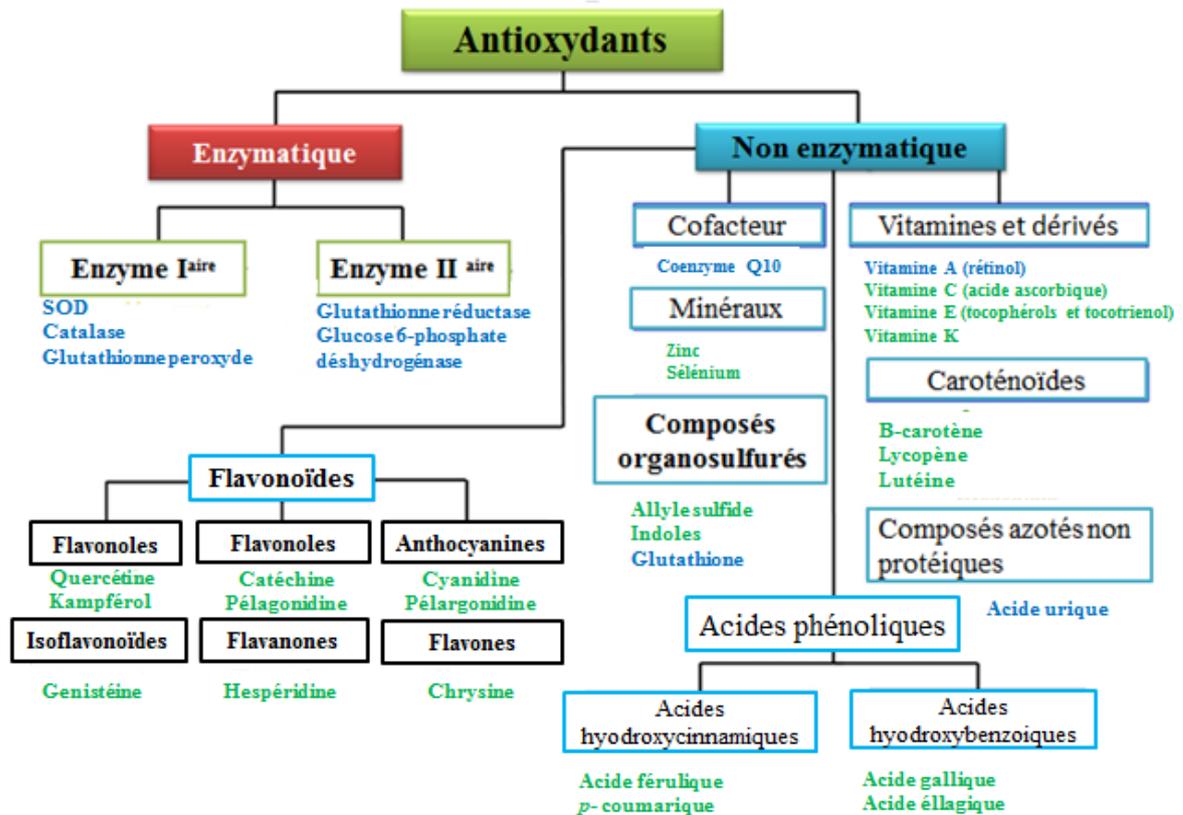


Figure. 9 : Digramme de classification des antioxydants. Les mots verts représentent les antioxydants exogènes, tandis que les bleus représentent antioxydants endogènes (Carocho et Ferreira, 2013).

6. Inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Elle se repose sur tout un réseau de facteurs cellulaires et humoraux, qui oeuvrent en

coordination immédiatement après l'agression, pour éliminer les stimuli nocifs et réparer les tissus endommagés (Ashley *et al.*, 2012).

Les réponses inflammatoires sont classées en deux catégories : l'inflammation aiguë, de courte durée de quelques jours à quelques semaines et l'inflammation chronique qui échappe au contrôle physiologique conduisant ainsi à la persistance des stimuli inflammatoires. Elle peut durer plusieurs mois, voir même des années et être à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, l'emphysème pulmonaire et la goutte (Das *et al.*, 2011).

L'inflammation aiguë peut être artificiellement divisée en quatre grandes étapes : (1) la reconnaissance de l'agent initiateur, (2) une étape vasculaire impliquant le recrutement de cellules immunocompétentes au foyer inflammatoire, (3) une amplification de la réaction par l'ensemble des cellules effectrices de l'inflammation accompagnée par une libération subséquente de médiateurs inflammatoires et enfin, (4) l'élimination de l'agent initiateur et la réparation tissulaire (Figure 10), (Hellal, 2007). Les médiateurs chimiques tels que les amines vasoactives (histamine, sérotonine), les leucotriènes et les prostaglandines, les cytokines et les chimiokines provoquent la vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire, ainsi que l'extravasation et l'infiltration des polynucléaires. De plus, les molécules d'adhérence permettent le ciblage du foyer inflammatoire par les cellules immunitaires (Crean et Godson, 2015).

Les maladies inflammatoires sont des maladies d'étiologie inconnue, et affectent aussi bien le système nerveux central (sclérose en plaque) que les tissus périphériques (polyarthrite rhumatoïde et maladies inflammatoires intestinales chroniques).

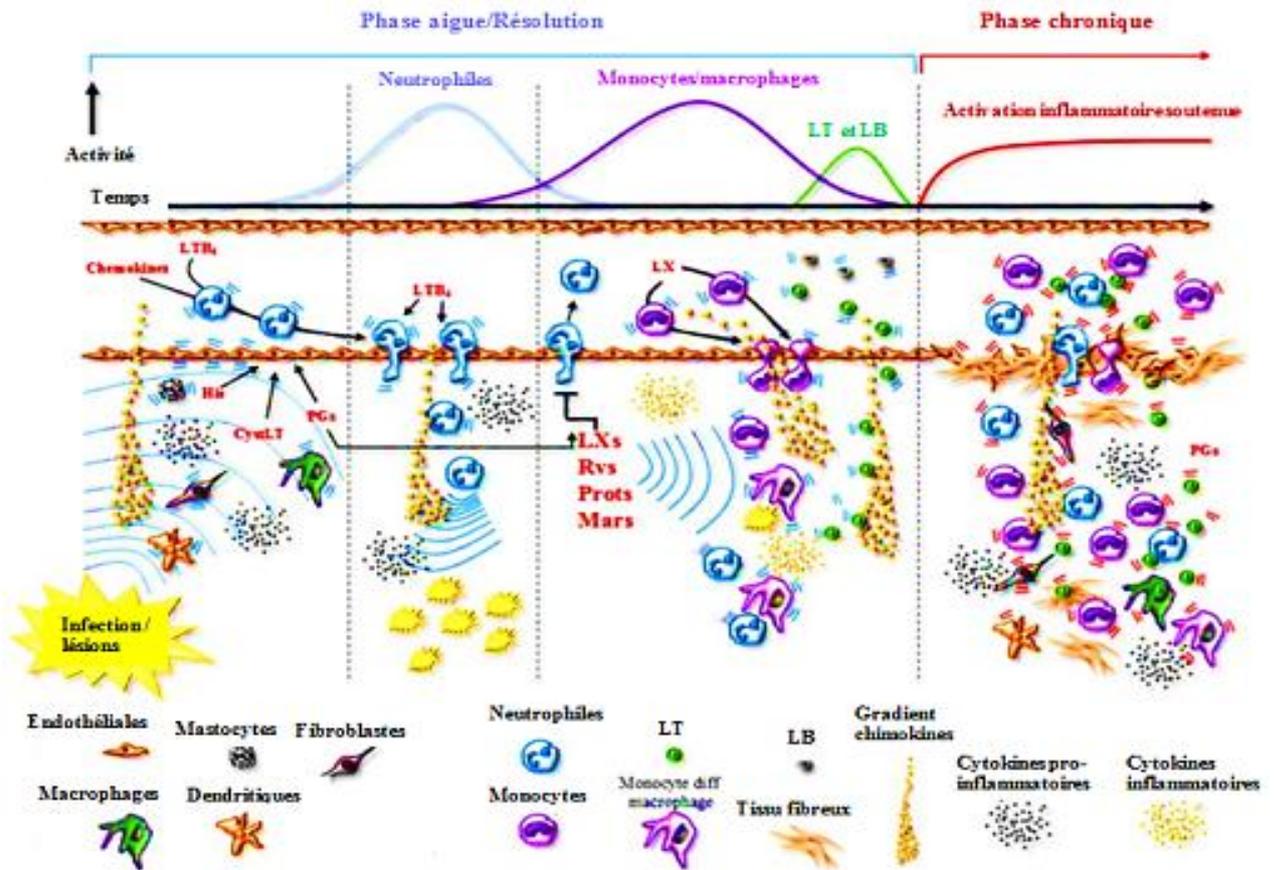


Figure. 10 : Médiateurs et cibles impliqués dans les réponses inflammatoires. His : histamine LTB₄ : leucotriène B₄, CystLT : cystéinyl-leucotriènes, PGs : prostaglandines, LXs : lipoxines, Rvs : resolvines, Prots : protectines, Mars : maresines. A la résolution du processus inflammatoire, une phase d'adaptation des réponses immunitaires est initiée (cellules T et B). Un dysfonctionnement de ces processus peut évoluer en maladies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète et l'arthrite (Crean et Godson, 2015).

Les traitements de synthèse les plus couramment utilisés et/ou les plus efficaces en clinique humaine sont classés en deux groupes : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens (corticoïdes). Ces médicaments sont largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier leur toxicité sur le système rénal et digestif (Hellal, 2007).

6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils regroupent l'ensemble des inhibiteurs non sélectifs, préférentiels, ou sélectifs des cyclo-oxygénases (COX) capables de synthétiser les

prostaglandines (COX-1 et COX-2). Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout générées dans des conditions inflammatoires (Shaikh *et al.*, 2015). Bien que les actions thérapeutiques des AINS justifient leur consommation généralisée, mais peuvent exercer des actions toxiques en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique), (Pereira-Leite *et al.*, 2013).

6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes (GC) sont des dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques (arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes). Le mode d'action des AIS se situe essentiellement au niveau transcriptionnel, ils se lient à leurs récepteurs intracellulaires pour exercer leurs effets par la répression ou l'induction de gènes. Les GC suppriment la libération des prostaglandines, des leucotriènes, des cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α), des chimiokines comme l'IL-8 et du NO. De plus, ils inhibent l'expression des molécules d'adhésion et la prolifération et la différenciation des lymphocytes T par des mécanismes multiples. Malheureusement, l'usage des GC est associé à de nombreux effets indésirables avec des risques d'apparition qui s'accroît avec la durée du traitement et peut conduire à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et d'ulcères gastro-duodénaux (Hellal, 2007).

6.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, la bronchite, l'eczéma, l'arthrose, la goutte, la rhinite allergique, les ulcères gastriques et duodénaux.

.....

(Kumar *et al.*, 2013). L'activité anti-inflammatoire de ces plantes revient à leur composition en métabolites secondaires doués d'activités biologiques en particulier les polyphénols et flavonoïdes, les stérols, les alcaloïdes, les saponines, les coumarines et les terpènes. Plusieurs investigations, *in vitro* et *in vivo*, ont démontré l'effet anti-inflammatoire d'un grand nombre de plantes médicinales ainsi que leurs mécanisme d'action (Shaikh *et al.*, 2015). Les substances bioactives des plantes peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, la modulation de l'activité de la cyclo-oxygénase et la production des espèces oxygénées réactives (Kumar *et al.*, 2013).

7. Présentation de la plante : *Teucrium polium*

7.1. Description botanique

Le genre *Teucrium*, encore dénommé les germandrées, regroupe environ 260 espèces de plantes herbacées ou de sous-arbrisseaux appartenant à l'ordre des Lamiales et à la famille des Lamiacées (Krishnaiah *et al.*, 2011). Cette plante peut être connue par plusieurs noms communs: jaada, khayata, Katabet ledjrah (Arabe), par 'mountain germander' (Anglais), pouliot de montagne, germandrée tomenteuse, germandrée blanc-gisâtre (Français), poliot, camendrio di montagna, timo bianco, polio primo (Italien).

Teucrium polium est originaire du sud-ouest d'Asie, d'Europe et d'Afrique du nord. Elle pousse dans les pelouses arides, les rocailles de basse altitude, collines et les déserts arides (Abdollahi *et al.*, 2003). C'est une espèce très variable ; de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce (Naghbi *et al.*, 2005)

et peut avoir des synonymes tel que : *Teucrium tomentosum*, *Teucrium gnaphalodes*, *Teucrium chamaedrys* et *Teucrium capitatum* (Autore *et al.*, 1984 ; Rasekh *et al.*, 2005).

Cette plante herbacée vivace a une odeur poivrée par frottement. Les tiges sont de 10-30 cm de hauteur, blanches-tomenteuses portant des feuilles opposées sessiles, linéaires-lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut. Ces feuilles, blanches-tomenteuses sur les deux faces ont les bords enroulés. Les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées (Figure 11), (Christodoulakis *et al.*, 2010).

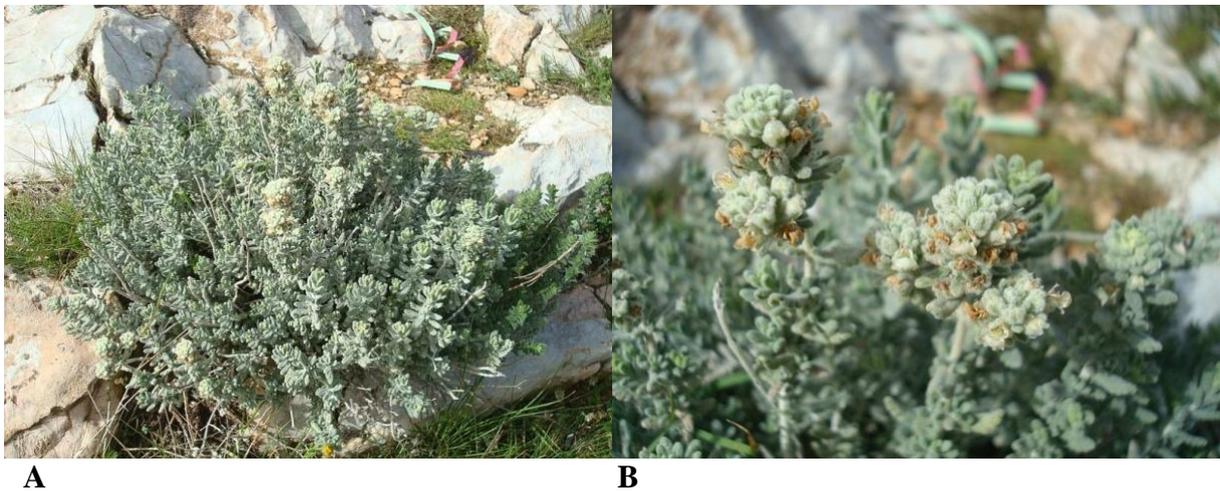


Figure. 11 : Aspect morphologique de *Teucrium polium* L. (**A** : plan de la plante, **B** : sommités fleuries), (https://it.wikipedia.org/wiki/Teucrium_polium).

7.2. Utilisation traditionnelles et médicales

Des espèces de *T. polium* ont été employées en tant qu'herbes médicinales pendant plus de 2000 ans comme diurétique, inotropique et chronotropique (Niazmand *et al.*, 2008), tonique, antipyrétique, antiulcéreuse (Khleifat *et al.*, 2001) antibactérienne, anti-inflammatoire et anticonvulsivante (Khoshnood-Mansoorkhani *et al.*, 2010)

En médecine traditionnelle, la Germandrée est employée comme agent analgésique, antispasmodique et hypolipidémique. Cette plante peut avoir quelques intérêts d'ordre

cliniques on cite : fièvre, affections du foie, guérisseur des plaies, abaissement de la pression artérielle, désordres stomacaux (Dehghani *et al.*, 2005 ; Kaileh *et al.*, 2007) et gastro-intestinaux tels que la colite et la diarrhée. Ces données soutiennent également, son large spectre d'emploi folklorique pour soulager ces douleurs (Krishnaiah *et al.*, 2011). Cette plante est abondamment distribuée comme agent antibiabtétique, sa décoction dispose d'un effet hypoglycémiant (Gharaibeh *et al.*, 1988 ; Sabet *et al.*, 2013).

7.3. Données phytochimiques

Plusieurs études, basées sur l'analyse des extraits de *Teucrium polium* par les méthodes chromatographiques en phase gazeuse, ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les flavonoïdes, polyphénols (Proestos *et al.*, 2004 ; Sharififar *et al.*, 2009), iridoïdes, tannins, huiles essentielles, diterpénoïdes (Ramnathan *et al.*, 2005 ; Mahmoudi et Nosratpour, 2013), glycosides phenylethanoides, notamment poliumoside B (De Marino *et al.*, 2012), alcaloïdes (Shakhanbeh et Atrousse, 2000 ; Parsaee et Shafiee-Nick, 2006), (Figure 12) .

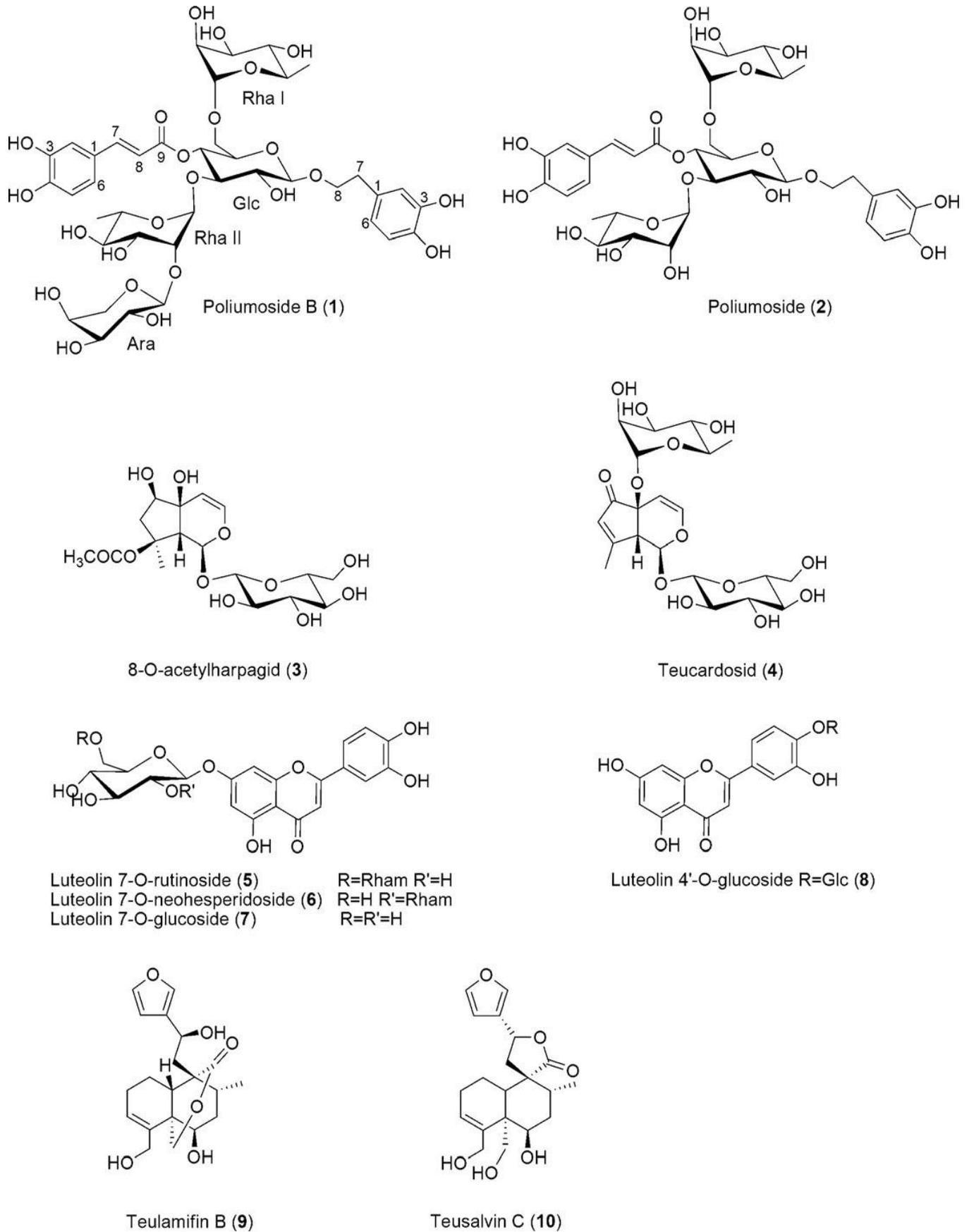


Figure. 12 : Structure des métabolites secondaires isolés des parties aériennes de *T. polium* (Di Marino *et al.*, 2012).

Plusieurs investigations phytochimiques montrent que les propriétés bénéfiques peuvent être attribuées aux composants flavonoidiques et phénylethanoidiques. D'autre part, la cytotoxicité accrue des fractions riches en néoclérodanes confirme l'hypothèse de leur implication dans l'étiologie de certaines lésions et/ou maladies hépatiques liées à la consommation prolongée de *T. polium* (Pacífico *et al.*, 2012), (Tableau 9).

Tableau 9 : Principaux composés bioactifs isolés des parties aériennes de *Teucrium polium*

Classes	Composés majeurs	Références
Flavonoïdes	Luteoline, apigenine, diosmetine cirsimaritrine, cirsilole, cirsilineol, 5-hydroxy-6,7,3',4' tétraméthoxyflavone, salvigenine, apigenine 5-galloylglucoside, apigenine-7-glucoside, vicenine, luteoline-7-glucoside	Kadifkova Panovska <i>et al.</i> , 2005 ; Hasani <i>et al.</i> , 2007 ; Al Bahtiti ; 2012 ; Bahramikia et Yazdanparast ; 2012
Huiles essentielles	α - pinène, β - pinène, myrténal, terpinol, α - humulène, spathulenol, β - myrcène, germacrene B, germacrene D, bicyclogermacrene, linalool, carvacrol	Skouti <i>et al.</i> , 2012 Mahmoudi et Nosratpour ; 2013 ; Belmekki <i>et al.</i> , 2013
Glycosides	Verbascoside et poliumoside (phénylethanoïde)	Rasekh <i>et al.</i> , 2001 ; Di Marino <i>et al.</i> , 2012
Diterpénoïdes néoclérodanes	Sept néo-clérodanes (teupolins VI - XII) et onze d'autres ont été isolés.	Fiorentino <i>et al.</i> , 2011 ; Pacífico <i>et al.</i> , 2012

7.4. Données pharmacologiques

Plusieurs recherches ont démontré certaines activités pharmacologiques liées à l'utilisation de la Germandrée. Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires maintenant pour élucider le mécanisme d'action pharmacologique et identifier les composants bioactifs responsables de telles actions afin d'expliquer leur efficacité thérapeutique (Tableau 10).

Tableau 10 : Principales actions pharmacologiques des parties aériennes de *T. polium*

Activité	Mécanisme	Principes actifs	Références
Antioxydante	Inhibition des processus oxydatifs <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> (DPPH, FRAP, TAP et TBARS)	Polyphénols et flavonoïdes	Ljubuncic <i>et al.</i> , 2006 ; Sharififar <i>et al.</i> , 2009 ; Krishnaiah <i>et al.</i> , 2011 ; Goulas <i>et al.</i> , 2012 ; Mahmoudi et Nosratpour ; 2013
Antibactérienne et antifongique	Contre les bactéries Gram positive (<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogens</i> , <i>S. aureus</i>) et Gram négative (<i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>S. typhimurium</i>)	Huiles essentielles	Esmaeili et Yazdanparart, 2004 ; Zerroug <i>et al.</i> , 2011 ; Aouadhi <i>et al.</i> , 2013 ; Belmekki <i>et al.</i> , 2013
Antinociceptive et antispasmodique	Propriétés antiscélerales contre la douleur comparables à ceux de l'hyoscine et de l'indométhacine	Flavonoïdes et stérols	Abdollahi <i>et al.</i> , 2003, Parsaee et Shafiee Nick ; 2006
Anti-inflammatoire	/	Sesquiterpènes et huiles essentielles	Menichini <i>et al.</i> , 2009
Antipyrétique	Inhibitor la synthèse de prostaglandines au niveau périphérique et la formation d'œdème	Huiles essentielles	Shakhanbeh et Atrousse, 2000
Hypoglycémiant et hypolipidémique	Réduction du taux du glucose sérique en augmentant la sécrétion d'insuline par le pancréas	Ne sont pas encore élucidés	Rasekh <i>et al.</i> , 2001 ; Esmaeili et Yazdanparast, 2004 ; Shahraki <i>et al.</i> , 2006 ; Vahidi <i>et al.</i> , 2010 ; Mousavi <i>et al.</i> , 2011
Anti tumorale	Inhibition de la génération de colonies de quelques lignées cellulaires, réduction des index mitotiques et suppression leurs croissance sur des cultures primaires des hépatocytes des rats	Furano-diterpénoides	Nematollahi-Mahani <i>et al.</i> , 2004 ; Khader <i>et al.</i> , 2007 ; Kandouz <i>et al.</i> , 2010

7.5. Données toxicologiques

Des espèces du genre *Teucrium* ont été caractérisées par une teneur plus élevée en composés terpéniques, en particulier sesquiterpénoides (Mahmoudi et Nosratpour, 2013) qui peuvent exercer de multiples actions. D'autre part, la toxicité de ces composés peut conduire à des dommages plus au moins importants. En effet, les néoclérodanes diterpènes furaniques provoquent la mort rapide et massive des cellules par apoptose en augmentant le calcium intracellulaire par stimulation de diverses enzymes calcium dépendantes (endonucléases, transglutaminase), (Stickel *et al.*, 2005). Des auteurs ont pu démontrer expérimentalement que la nécrose hépatique peut être provoquée par un extrait de Germandrée enrichi en furano néoclérodanes diterpénoides (Pacifico *et al.*, 2012).

Les néoclérodanes diterpénoides sont formés par un cycle *furanique* issu de la cyclisation d'un précurseur désigné labdanique. Sept néo-clérodanes (teupolines VI - XII) et onze composés connus ont été isolés et caractérisés à partir d'extraits de feuilles de *T. polium* L (Figure 13), (Fiorentino *et al.*, 2011). Des études ont montré que l'administration préalable d'activateurs ou d'inhibiteurs du cytochrome P₄₅₀ augmente ou diminue, respectivement la toxicité (Mattéi *et al.*, 1995 ; Mazokopakis *et al.*, 2004). L'activation des furano- néoclérodanes semble donc le préalable indispensable à l'action toxique.

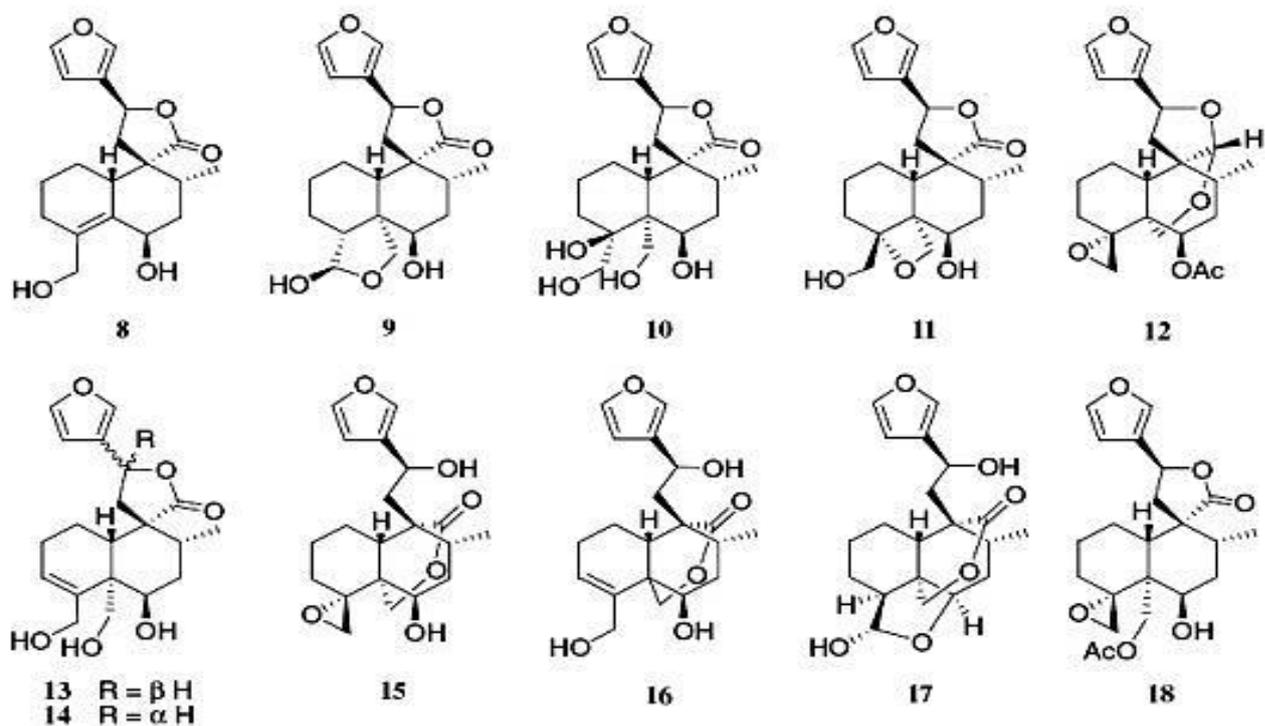


Figure. 13 : Neoclérodanes diterpénoides 8-18 de *T. polium*. Composé 8 (montanin B), 9 (teukotschyne), 10 (montanin E), 11 (montanin D) 12 (teubutiline A) 13 (19-deacetylteuscorodol), 14 (teusalvineC) ,15 (teucroxylepine), 16 (teulamifine B), 17 (teuchamaecrine C) ,18 (montanin F), (Pacífico *et al.*, 2012) .

Matériel et Méthodes

1. Matériels biologiques

1.1. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles et femelles, *Swiss albino* dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Algérie, Kouba, Alger. Ces souris ont été utilisées après une période d'adaptation de 7 jours avec un accès libre à l'eau et à la nourriture standard fournie par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

1.2. Matériel végétal

La récolte du *Teucrium polium* a été effectuée pendant le mois de Juin 2011 dans la commune d'Ouled Sidi Amor (Wilaya de Bordj-Bou-Argeridj). L'identification a été faite par Pr. Laouer Hocine, Laboratoire de valorisation des substances naturelles, Université de Sétif 1.

2. Méthodes

2.1. Extraction et analyse de l'extrait

Les parties aériennes de la plante ont été lavées avec de l'eau de robinet, séchées à l'ombre et broyées. La macération a été ensuite effectuée par le méthanol pendant 7 jours à température ambiante à l'abri de lumière. Le tout a été filtré sur verre fritté (N°03) puis le culot a été extrait une seconde fois par le méthanol pendant 5 jours. Après filtration, les deux solutions sont mélangées puis évaporées dans un rotavapor (BÜCHI). L'extrait obtenu a été par la suite complètement séché dans l'étuve à 37 °C (Arrar *et al.*, 2013). L'extrait obtenu,

d'une couleur vert-foncée pour *T. polium*, est considéré comme étant l'extrait méthanolique brut (*Teucrium polium* methanolic extract : TPME).

2.2. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques de l'extrait est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue avec un maximum d'absorption à 765 nm. Un volume de 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 μl d'extrait ou standard (préparé dans le méthanol ou dans l'eau distillée) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Figure 14) établie avec l'acide gallique (0-160 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

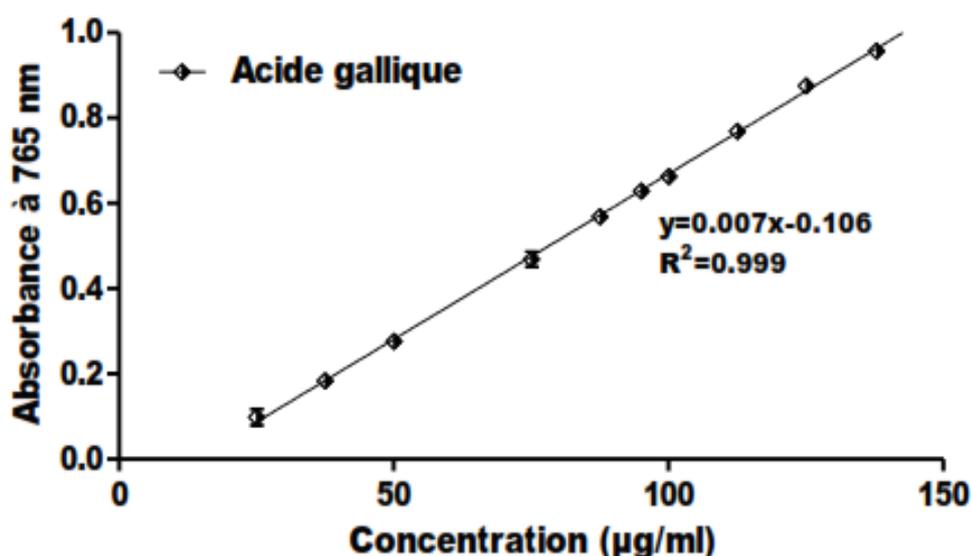


Figure. 14 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

2.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait. La méthode consiste à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une droite d'étalonnage (Figure 15) établie avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

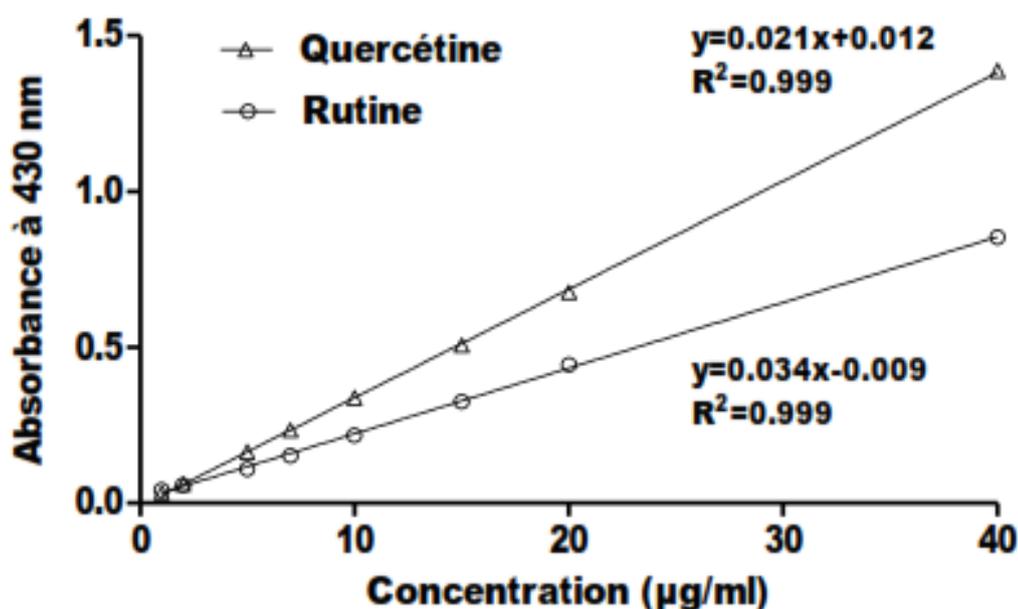


Figure. 15 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).

2.4. Activité antioxydante *in vitro*

L'activité anti-radicalaire de TPME est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Boumerfeg *et al.* (2009). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune. La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Ensuite, 50 μl des solutions d'extrait ou standards (Quercétine,

.....

Rutine, butylated hydroxytoluene BHT) sont ajoutés à 1250 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = (A_{517} \text{ contrôle} - A_{517} \text{ échantillon}) \times 100 / A_{517} \text{ contrôle}$$

2.5. Activité antioxydante *in vivo*

Les activités antioxydantes de TPME par la suite sont confirmées *in vivo* chez les souris par l'administration de l'extrait pendant 21 jours. La capacité antioxydante totale du sang a été évaluée en déterminant les HT₅₀, la capacité antioxydante plasmatique a été également déterminée en utilisant le test de piégeage du radical DPPH et FRAP.

2.5.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang

Des souris mâles adultes de 25 et 30 g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en 3 groupes de 9 à 10 animaux chacun. L'extrait et les témoins sont administrés par injection intrapéritonéale quotidiennement durant trois semaines. Le groupe 1 témoin (CNTL) a reçu un volume d'une solution d'eau physiologique, les souris du groupe 2 (VIT C) ont reçu une dose de 50 mg/kg de vitamine C et le groupe traité (TPME) a reçu une dose de 100 mg/kg de TPME.

Le prélèvement du sang est réalisé sur les souris anesthésiées par l'éther diéthylique. Au cours de chaque prélèvement, un aliquote de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant du tampon PBS 10 mM, NaCl 125 mM (300 mOs) pH 7.4, afin d'obtenir l'hématocrite de 2%. Ce sang est utilisé pour évaluer la capacité antioxydante totale du sang.

La quantité du sang restante est centrifugée à 1500 g pendant 5 min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour le test du DPPH et FRAP.

La capacité antioxydante totale du sang est mesurée suivant le protocole décrit par Takebayashi *et al.* (2010) avec quelques modifications selon Manna *et al.* (2002). Ce test consiste à soumettre l'échantillon du sang total à une agression radicalaire. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des érythrocytes afin de résister à cette agression, jusqu'à ce que la membrane cellulaire soit modifiée au point de libérer le contenu cellulaire.

Le sang obtenu précédemment (hématocrite de 2%) est soumis à une attaque radicalaire par l'addition du tert-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) à la suspension érythrocytaire. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie à 37°C par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT₅₀).

2.5.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

Dans ce test, la capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani *et al.* (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro*. Brièvement, un volume de 25 µl plasma est additionné à la solution méthanolique de DPPH (2.4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (2000 rpm/5min à 4°C), l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = (A_{517} \text{ contrôle} - A_{517} \text{ échantillon}) \times 100 / A_{517} \text{ contrôle}$$

2.5.3. Pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP

L'essai 'Ferric Reducing Antioxidant Power' (FRAP) est réalisé selon la méthode décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido *et al.* (2000). Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à pH acide. Une solution fraîche du réactif FRAP est préparée par mélange de 2,5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2,5 ml du FeCl_3 (20 mM) et 25 ml du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH équilibré à 3,6 par l'acide acétique). Un volume de 300 μl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37°C, est mélangé avec 30 μl d'eau bidistillée et 10 μl de plasma. L'augmentation de l'absorbance à 593 nm est suivie pendant 30 minutes à 37°C. Une gamme du FeSO_4 (étalon réducteur) entre 0 et 2000 μM est utilisée pour calculer les valeurs FRAP de TPME et des antioxydants standards (Figure 16). La valeur FRAP est exprimée en mM du $\text{FeSO}_4/10 \mu\text{l}$ de plasma.

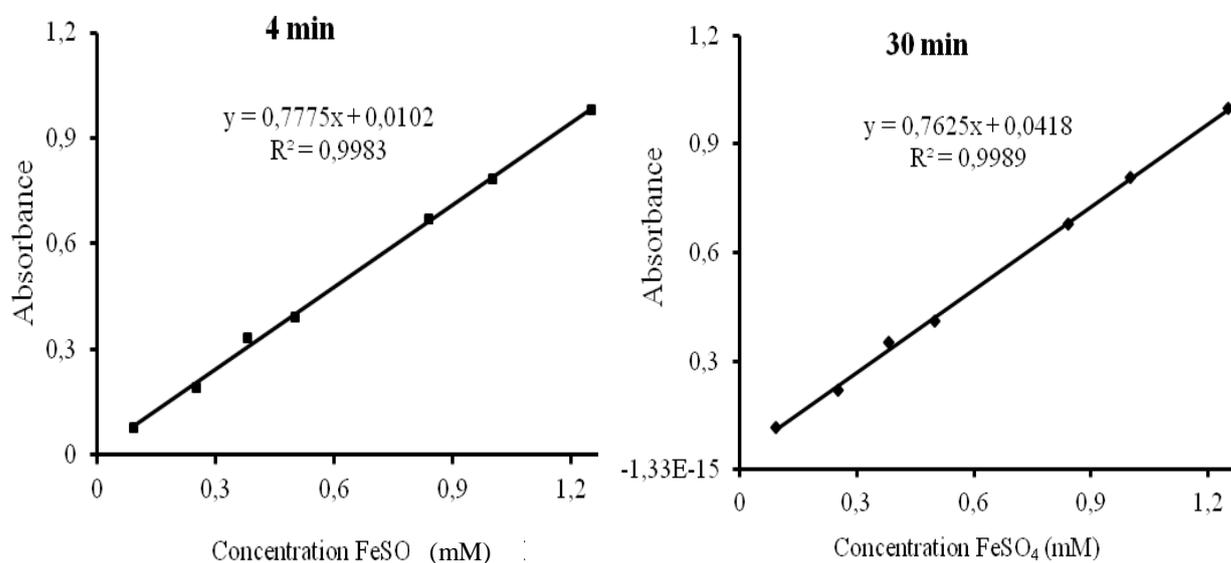


Figure 16 : Les courbes d'étalonnage de FeSO_4 .

2.6. Activité anti-hémolytique

La résistance des érythrocytes prétraités par le TPME à une attaque radicalaire est évaluée selon le protocole décrit par Takebayashi *et al.* (2010) avec quelques modifications en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)-HCl] par *t*-BHP (Dwight et Hendry, 1996). Le sang des souris est collecté dans un tube hépariné et dilué dans un tampon phosphate (300 mOs, pH 7.4) pour obtenir un hématocrite de 2%. L'attaque radicalaire est induite par l'addition du *t*-BHP (166 µM) à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (15 min) avec TPME à 10.59, 21.18, 42.37, 84.74 µg/ml, la vitamine C est utilisée comme standard de comparaison. Après trois heures d'incubation avec le *t*-BHP à 37°C, la cinétique de disparition des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 630 nm. La résistance des hématies à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (Half-Hemolysis Time ; HT₅₀).

2.7. Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire est évalué selon la méthode de Garrido *et al.* (2004) sur des souris mâles adultes (25-30 g). Une pesée de 4 mg/oreille des PMA (phorbol myristate acétate) dans 20 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO), est appliquée sur la surface de l'oreille gauche de chaque souris. L'oreille droite (contrôle) a uniquement reçu le véhicule (20 µl DMSO). Le TPME est administré 1h avant l'application du PMA. Les souris sont réparties en trois groupes : (1) groupe contrôle négatif quia reçu un volume d'une solution d'eau physiologique, (2) groupe contrôle positif qui à reçu une dose de (10 mg/kg) d'un anti-inflammatoire de référence, le Diclofénac et (3) groupe TPME où les souris ont reçu une dose de 100 mg/kg d'extrait.

Six heures après l'application du PMA, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et un disque de 6 mm de diamètre de chaque oreille est prélevé et pesé. L'œdème de l'oreille est calculé par la soustraction du poids de l'oreille gauche (véhicule) de l'oreille droite (traitée), et exprimé en poids de l'œdème.

Les disques de chaque oreille gauche et droite sont fixés dans le formol 10% pendant une semaine. Les étapes suivantes : inclusion, coupe et coloration sont effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif.

2.8. Effet hypouricémiant

L'hyperuricémie est la pathologie la plus citée impliquant la XOR ; c'est un état pathologique qui résulte de la surproduction (par XOR) ou l'excrétion (troubles des tubules rénaux) d'acide urique qui forme des cristaux microscopiques insolubles dans les vaisseaux capillaires des articulations. Ces cristaux provoquent une inflammation et une douleur aiguë ce qui se développe par la suite en arthrite goutteuse aiguë (Jetanalin et Lee, 2013 ; Newcombe, 2013).

Des souris mâles adultes de 25 à 30 g sont répartis en quatre lots de 8 à 9 animaux chacun. L'induction de l'hyperuricémie est faite par l'injection intrapéritonéale de 200 mg/kg de potassium oxonate (OP), qui est un inhibiteur sélectif qui bloque l'effet de l'uricase hépatique et provoque en conséquence un état d'hyperuricémie (Shi-Fu *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2011). Après une heure, le TPME est administré par voie intrapéritonéale avec une dose de 100 mg/kg. Les souris sont réparties en 4 groupes :

- Groupe 1 (Témoin) : injecté par le véhicule (l'eau physiologique).
- Groupe 2 (OP): groupe injecté par l'oxonate de potassium.

- Groupe 3 (OP + allopurinol): groupe injecté par l'oxonate de potassium ensuite traité par 10mg/kg d'allopurinol.
- Groupe 4 (OP + TPME): groupe injecté par l'oxonate de potassium puis traité par 100 mg/kg d'extrait brut méthanolique de *Teucrium polium*.

Le prélèvement du sang est réalisé après 1 heure de traitement sur des souris anesthésiées, dans des tubes héparinés, puis centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes et le plasma obtenu est conservé à - 20°C jusqu'à usage.

Les foies sont récupérés, rincés avec du NaCl 0.9% et homogénéisé dans un tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7.8) ensuite, centrifugé à 8000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage de l'acide urique (Shi-Fu *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2011).

Les dosages de l'acide urique, de l'urée et la créatinine plasmatiques sont réalisés au niveau du laboratoire central du CHU de Sétif en utilisant un automate Beckman et des kits fournis par Spinreact Diagnostics.

2.9. Evaluation toxicologique

Afin de suivre l'évolution corporelle des souris le long de l'expérimentation, leurs poids sont déterminés avant et après les semaines de traitement et 24 heures avant le sacrifice. Cette répartition per lots est réalisée selon l'homogénéité de leurs poids.

2.9.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques rencontrés après l'administration unique de la ou les substances

actives contenues dans un échantillon. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux, l'indication de la DL₅₀. L'étude sur les souris blanches de laboratoire a été effectuée sur un nombre homogène d'animaux, la durée de l'observation des animaux est précise: en général elle n'est pas inférieure à une semaine (Diallo, 2005).

La dose létale 50 (DL₅₀) est la dose d'une substance chimique administrée à des animaux de laboratoire qui provoque la mort de la moitié d'entre eux ; elle peut être déterminée par plusieurs méthodes qui sont : méthode de Dragstedt et Lang, méthode de Karber et Behrens (Staneva, 1988) et méthode de Miller et Tainter (Dupont, 1970).

Dans cette approche, l'analyse par la méthode de probits (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney) en utilisant le logiciel stat PLUS 5.8.0.0, 2009 a été utilisée pour déterminer la DL₅₀ de TPME (Abu sitta *et al.*, 2009). Cette technique consiste à administrer des doses croissantes de substance à des lots de souris de masses uniformes, la dose administrée est exprimée en mg/kg de masse corporelle des animaux et la différence entre les doses voisines doit être constante. Pour chaque lot, le pourcentage de mortalité dans l'heure qui suit ou au bout du temps imparti est enregistré.

Les souris males et femelles préalablement mises à jeun pendant 24 heures sont regroupées par lot de 10, pesant entre 25-30 g. Les doses utilisées sont : 100, 150, 200, 250, 300, 350 et 400 mg/kg de TPME. L'extrait a été repris dans NaCl 9 ‰ et administré aux souris par voie intra péritonéale (IP) à raison de 100 µl de solution par 30 g de masse corporelle pour les deux sexes. Le lot témoin ne recevait que du NaCl 9 ‰. Par la suite, les symptômes possibles sont observés les premières 15 minutes ensuite les 1^{ère} h, 2h, 24h, 72h jusqu'au 14^{ème} jour (Abu Sitta *et al.*, 2009).

2.9.2. Toxicité de 7 jours

Le traitement aigu chez les souris males et femelles est réalisé par voie IP pendant 7 jours. Les souris des deux sexes sont réparties en deux groupes de 8 (Khleifat *et al.*, 2002). Le premier groupe témoin n'a reçu que 100 µl de NaCl 9 ‰. Le deuxième groupe est traité avec la dose de 100 mg/Kg de TPME (Bouzidi *et al.*, 2011, avec de légères modifications).

2.9.3. Toxicité chronique

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées des substances actives examinées et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Les expérimentations ont pris de 2 à 6 semaines. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance pondérale, de la formule sanguine et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles liées aux organes extérieurs ainsi que sur la base des comptes rendus nécrosiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent (Diallo, 2005).

Les souris adultes de 33.34 ± 2.46 g et 26.46 ± 1.83 g des males et femelles, respectivement, sont réparties en trois lots de huit. Les deux doses journalières administrées par voie IP après des tests préliminaires de la DL₅₀ sont de 50 et 75 mg de TPME /kg de poids de souris par rapport aux témoins. L'extrait a été dissout dans NaCl 9‰ à raison de 100 µl de solution par 30 g de poids corporel, le lot témoin ne recevait que 100 µl de NaCl 9‰. L'administration de l'extrait est poursuivie jusqu'à la sixième semaine. Au terme des 6 semaines, toutes les souris ont été euthanasiées, et les organes, ovaires, reins, rate, foie, poumons, cœur et cerveau, ont été prélevés et observés *in situ* (Abu Sitta *et al.*, 2009).

2.9.4. Examens biochimiques

Les prélèvements sanguins sont effectués chez les souris à jeun et sous anesthésie par l'éther diéthylique. Ils sont également réalisés le jour d'euthanasie par décapitation des animaux. Au cours de chaque prélèvement, environ 600 µl de sang sont recueillis dans des tubes héparinés puis centrifugés à 4000 g pendant 5 mn à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'aux analyses biochimiques.

Les paramètres plasmatiques dosés sont suivants : Glucose (Glu), Urée, Créatinine (Créat), Sodium, Potassium, Cholestérol total (Chol T), Triglycérides totaux (TGT), Transaminase Glutamate Oxalo-acétate (TGO), Transaminase Glutamate Pyruvate (TGP) et Phosphatase alcaline (PAL). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un automate Beckman Coulter Synchron CX-9 Clinical System ALX au niveau du CHU de Sétif.

2.9.5. Histopathologie

Les foie et reins prélevés sont fixés dans le formol 10% pendant une semaine. Les échantillons sont déshydratés par passage dans trois bains successifs de 30 min d'éthanol (70-75%, 90-95% et 100%), puis éclaircies dans deux bains de 20 min de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures chacun) ensuite l'opération est automatisée à l'aide d'un automate TISSUE-TEK® II. L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques (SHANDON [O] Histocentre). Les blocs de paraffinés obtenus sont ensuite coupés par microtome (LEICA RM 2145). Les coupes de 5 µm d'épaisseur sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine (Bensalem-Bendjelloul, 1998). Toutes ces étapes ont été effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif.

2.10. Analyses statistiques

Les valeurs ont été, en général exprimées en moyenne \pm SEM et SD. Les résultats des différents tests sont analysés par le test *t* de Student pour les comparaisons simples, et ANOVA univariée suivie du test de Dunnett et Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des degrés de signification. La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel « Gaphpad Prism » version 5.0. Les différences sont considérées significatives à un $p \leq 0,05$.

Résultats et discussion

1. Caractérisation phytochimique

Le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, choix de solvants d'extraction ainsi que son volume (l'utilisation des solvants polaires a été préféré du fait que *T. polium* est largement consommé comme tisane, le caractère physique d'hydrophilie est souhaitable pour ces médicaments), (Goulas *et al.*, 2012 ; Khaled-Khodja *et al.*, 2014). L'extraction méthanolique de *T. polium* donné un rendement égale à $7.58 \pm 0.21\%$. Ce taux est faible à ceux qui ont été repportés (Tableau 11). Cette différence semble être liée aux caractères chimiotypiques ; de plus, aux propriétés génétiques des plantes, aux conditions et de la saison de récolte (Fertout-Mouri *et al.*, 2014).

Tableau 11 : Comparaison des rendements des différentes techniques d'extraction de *T. polium*.

Solvant d'extraction	Rendement (%)	Références
Méthanol	20.07 ± 1.03	Boumerfeg <i>et al.</i> (2012)
	14.9	Sharififar <i>et al.</i> (2008)
Ethanol	14	Hasani <i>et al.</i> (2007)
H ₂ O	11.5	Ljubuncic <i>et al.</i> (2006)

L'extrait méthanolique (TPME) peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins. Le solvant le plus souvent utilisé pour l'extraction de substances phénoliques des Lamiacées est le méthanol. En effet, Sharififar *et al.* (2009) et Khaled-Khodja *et al.* (2014) ont indiqué que le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction en composés phénoliques de *Teucrium polium* par comparaison aux autres solvants utilisés (acétone, chloroforme et éther de pétrole).

Dans le but de bien caractériser le TPME préparé, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes est effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets toxico-pharmacologiques de la plante leurs sont attribués.

Le dosage des polyphénols selon Folin-Ciocalteu a montré que le TPME renferme $160.72 \pm 0.78 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait. La détermination des taux de flavonoïdes selon la méthode au trichlorure d'aluminium révèle que cet extrait contient une quantité de $37.96 \pm 0.317 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

En se basant sur les résultats de l'analyse phytochimique de TPME, on peut déduire que cette plante est relativement riche en composés phénoliques. Cependant, le produit d'extraction peut contenir des substances non phénoliques telles que les sucres, les protéines et les pigments (Djeridane *et al.*, 2005).

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes ; (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (ii) la disponibilité du réactif de Folin-Ciocalteu et la méthode est bien standardisée, (iii) la longueur d'onde maximum (765 nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est coloré, (iv) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (Huang *et al.*, 2005). Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés ; Tyrosine et Tryptophane des protéines. De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les teneurs élevées en composés phénoliques par comparaison aux flavonoïdes sont logiques étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des

.....

polyphénols. Ceci peut être aussi expliqué par une augmentation du métabolisme phénolique de la plante ; en plus, l'existence d'une liaison avec les conditions de culture et climatiques dures telles que les températures élevées, la durée d'exposition solaire, la nature du sol, l'altitude, la saison de croissance et de culture (Djeridane *et al.*, 2005). Les parties aériennes de *T. polium* recueillies dans la période de Mai à Juillet aura la plus grande quantité de flavonoïdes totaux ; la période d'Août à Novembre est période de la fructification et n'est pas pratique pour la collecte de la matière végétale (Stefkov *et al.*, 2009). La période d'échantillonnage correspond à la phase de la floraison de *T. polium*, ces substances ont tendance à s'accumuler dans les organes aériens (feuilles, tiges et fleurs) plutôt que dans la partie souterraine (racines) au cours du printemps (Fertout-Mouri *et al.*, 2014).

2. Activité antioxydante *in vitro*

La présence de différents composés connus comme antioxydants présents dans les parties aériennes de la plante étudiée devrait être évaluée par différents tests *in vitro*, pour mieux expliquer leurs effets biologiques. Le test de réduction du radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation des activités antioxydantes. Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule stable non radicalaire. La capacité de réduire ce radical est déterminée par la diminution de l'absorbance à 517 nm induite par la substance étudiée (Baghiani *et al.*, 2013). Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que l'extrait méthanolique de *T. polium* possède une activité antiradicalaire dose dépendante (Figure 17). L'IC₅₀ du TPME était égale à 47.67 ± 2.31 µg/ml.

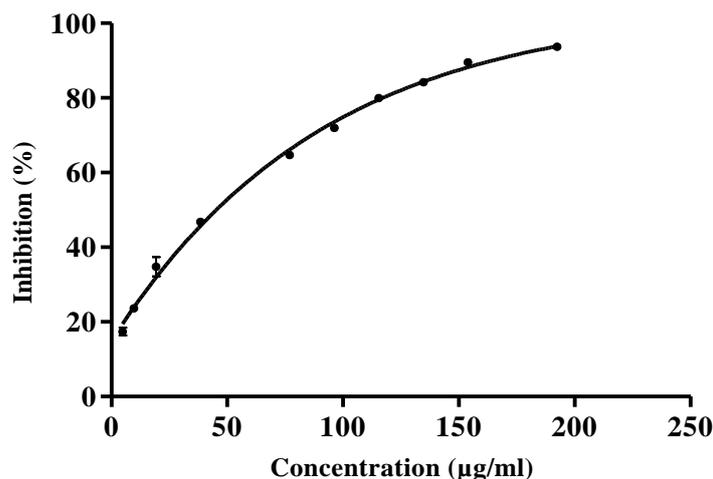


Figure. 16 : Activité antiradicalaire de TPME. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

À des fins comparatives, plusieurs antioxydants standards ont été utilisés : l'acide gallique, la quercétine, la rutine et le BHT. Ils ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC_{50} de 1.27 μ g/ml, 2.56 μ g/ml, 5.58 μ g/ml et 87 μ g/ml, respectivement.

La littérature rapporte que des corrélations significatives ont été enregistrées entre les capacités antioxydantes et la richesse de la matière végétale en polyphénols et flavonoïdes au niveau des parties aériennes des plantes surtout du genre *Teucrium* (tiges, feuilles et fleurs), notamment les flavonoïdes telle que la rutine, la lutéoline, l'apigénine, la diosmétine, l'hespéridine et l'harpagide (Aksoy-Sagirli *et al.*, 2015). Il est par ailleurs connu que les polyphénols ont des propriétés scavenger envers différents types de radicaux, ce qui leur confère une grande capacité antioxydante (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). En fait, des études antérieures réalisées par Sharififar *et al.* (2009) ont montré que l'extrait méthanolique de *T. polium* présente une très importante activité antiradicalaire *vis-à-vis* du BHT (IC_{50} de $20.1 \pm 1.7 \mu$ g/ml vs $18.3 \pm 1.9 \mu$ g/ml, respectivement). Le mécanisme d'action de l'antioxydant sur le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant dont certains de ces composés réagissent très rapidement avec le DPPH, ainsi que la réduction d'un nombre de molécules de DPPH est équivalent au nombre des groupes hydroxyles libres, en particulier 3-

OH. Boumerfeg *et al.* (2012) ont signalé que l'activité antiradicalaire la plus grande correspond à celle de l'extrait chloroformique qui renferme la teneur la plus élevée en flavonoïdes en particulier aglycones qui sont des donneurs efficaces d'hydrogène. Egalement, Aouadhi *et al.* (2013) ont attribué l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *T. polium* de Tunisie *vis-à-vis* du DPPH ($IC_{50} = 21 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$) à la forte teneur en composés phénoliques de la plante. En fait, il existe une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante des extraits de plantes.

3. Activité anti-hémolytique

L'activité antihémolytique de TPME est mesurée selon le protocole décrit par Takebayashi *et al.* (2010). Il s'agit de soumettre des hématies à une agression de type oxydatif dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Dans ces conditions, les hématies mettent en jeu tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane cellulaire soit modifiée au point de laisser échapper le contenu cellulaire. L'analyse réalisée dans des microplaques de 96 puits permet le traitement d'un nombre important d'échantillons. La mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm permet de suivre la disparition progressive des cellules. Ce test permet d'évaluer le pouvoir anti-radicalaire des molécules naturelles à usage pharmaceutique *in vitro* et *in vivo*. Théoriquement, la résistance antiradicalaire érythrocytaire doit conduire à une courbe avec un temps de demi-lyse plus élevé chez les supplémentés comparativement à des témoins. Une valeur d' HT_{50} élevée veut donc dire que l'extrait a efficacement renforcé le système anti-radicalaire érythrocytaire.

Bien que l'hémolyse a une longue histoire d'utilisation dans la mesure des dommages de radicaux libres et l'inhibition par les antioxydants, seulement quelques études ont été réalisées sur des érythrocytes du sang total (Djeridane *et al.*, 2010). Dans cette approche, l'effet anti-radicalaire de TPME sur les érythrocytes des souris est évalué à partir des

cinétiques d'hémolyse obtenues (Figure 18 et Tableau 12), il ressort que le traitement par TPME a augmenté les valeurs d' HT_{50} par rapport au témoin ($HT_{50} = 56.01 \pm 5.93$ min). Un effet dose dépendant de l'extrait sur l'accroissement des défenses antioxydantes globales a été remarqué.

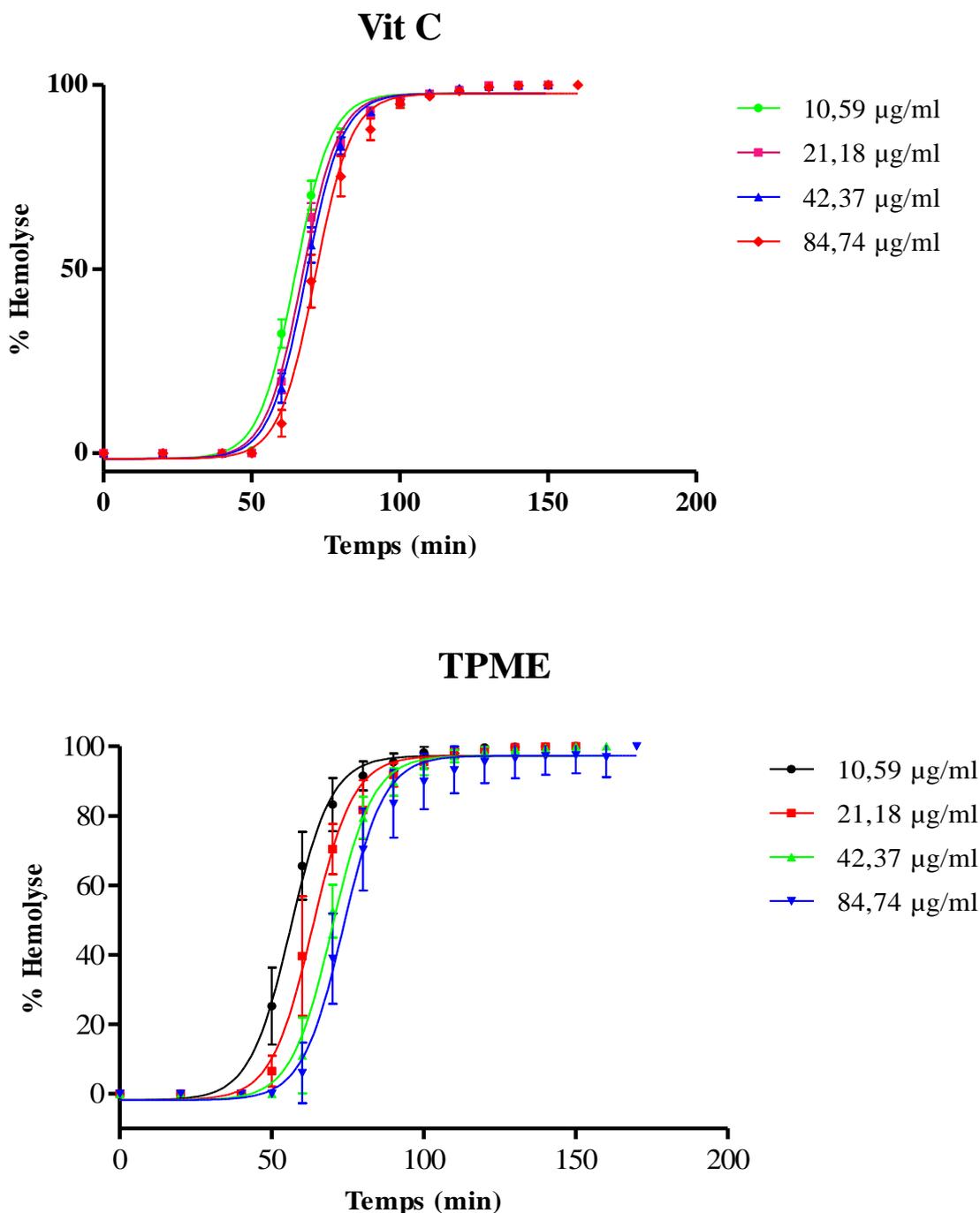


Figure. 17 : Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (Témoin) et en présence de Vit C et de TPME respectivement. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 5).

Tableau 12 : Temps de demi-hémolyse (HT₅₀) pour les différentes concentrations étudiées de TPME et Vit C. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 5).

[C] µg/ml	TPME	Vit C
10.59 µg/ml	56.648 ± 2.38 ^{ns}	64.99 ± 4.46 ^{ns}
21.18 µg/ml	63.542 ± 4.12 ^{ns}	67.50 ± 3.91 ^{**}
42.37 µg/ml	69.62 ± 1.67 ^{***}	68.57 ± 4.43 ^{**}
84.74 µg/ml	73.32 ± 3.21 ^{***}	71.99 ± 7.79 ^{***}

Les comparaisons sont effectuées par rapport au témoin. **: $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, ns: non significatif.

Pour voir s'il existe une corrélation linéaire entre la concentration de l'extrait et le temps de demi-hémolyse (HT₅₀), les valeurs de Δt sont été relevées; $\Delta t = HT_{50}$ (extrait) - HT₅₀ (témoin), la relation entre Δt et les concentrations d'extraits est montrées dans la figure 19. Une bonne linéarité est observée pour cet extrait ($R^2 = 0.836$). La durée d'inhibition supplémentaire produite par les concentrations croissantes de TPME est : 0.64, 7.53, 13.61 et 17.31 min, respectivement (Figure 19). Le TPME a provoqué une inhibition supplémentaire meilleure que celle de l'antioxydant standard, la vitamine C.

Mahmoudi et Nosratpour (2013) ont rapporté que les parties aériennes de *T. polium* sontriches, en plus des flavonoïdes, en huiles essentielles qui ont montré une bonne activité antioxydante *in vitro*. Par conséquent, il serait raisonnable de supposer que les propriétés antioxydantes d'un extrait hydro-alcoolique de *T. polium* peuvent être attribuées à la présence de ces composants flavonoidiques.

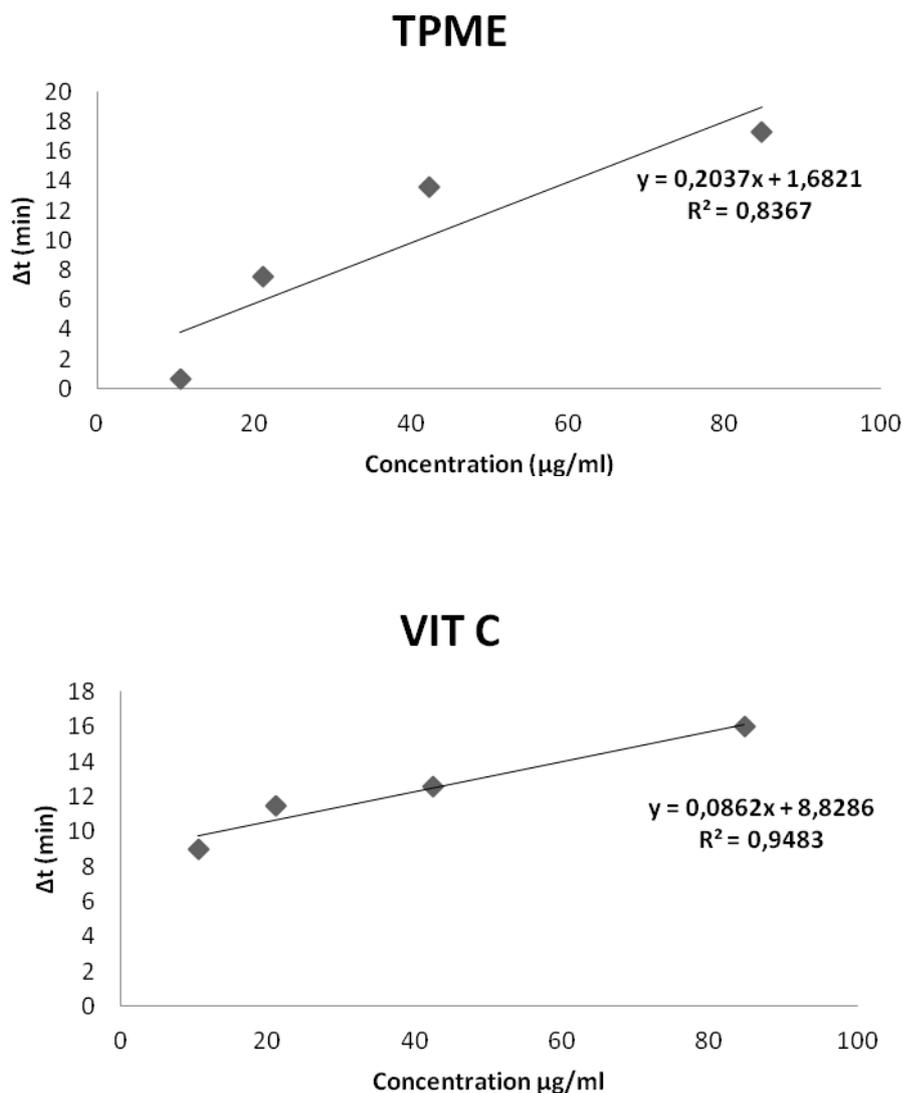


Figure. 18 : Relation entre la valeur Δt et la concentration de TPME et Vit C. La suspension érythrocytaire est incubée avec *t*-BHP en présence d'extrait (10.59, 21.18, 42.37 et 84.74 µg/ml) à 37°C, (HT₅₀) témoin = 56,01 ± 5,93.

4. Activité antioxydante *in vivo*

4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang

Les cinétiques obtenues de disparition des hématies suivie par la diminution de l'absorbance à 630 nm sont montrées dans la figure 19. Il paraît que le traitement par le TPME pendant 21 jours entraîne un décalage des sigmoïdes d'hémolyse vers la droite et donc un retardement de l'hémolyse.

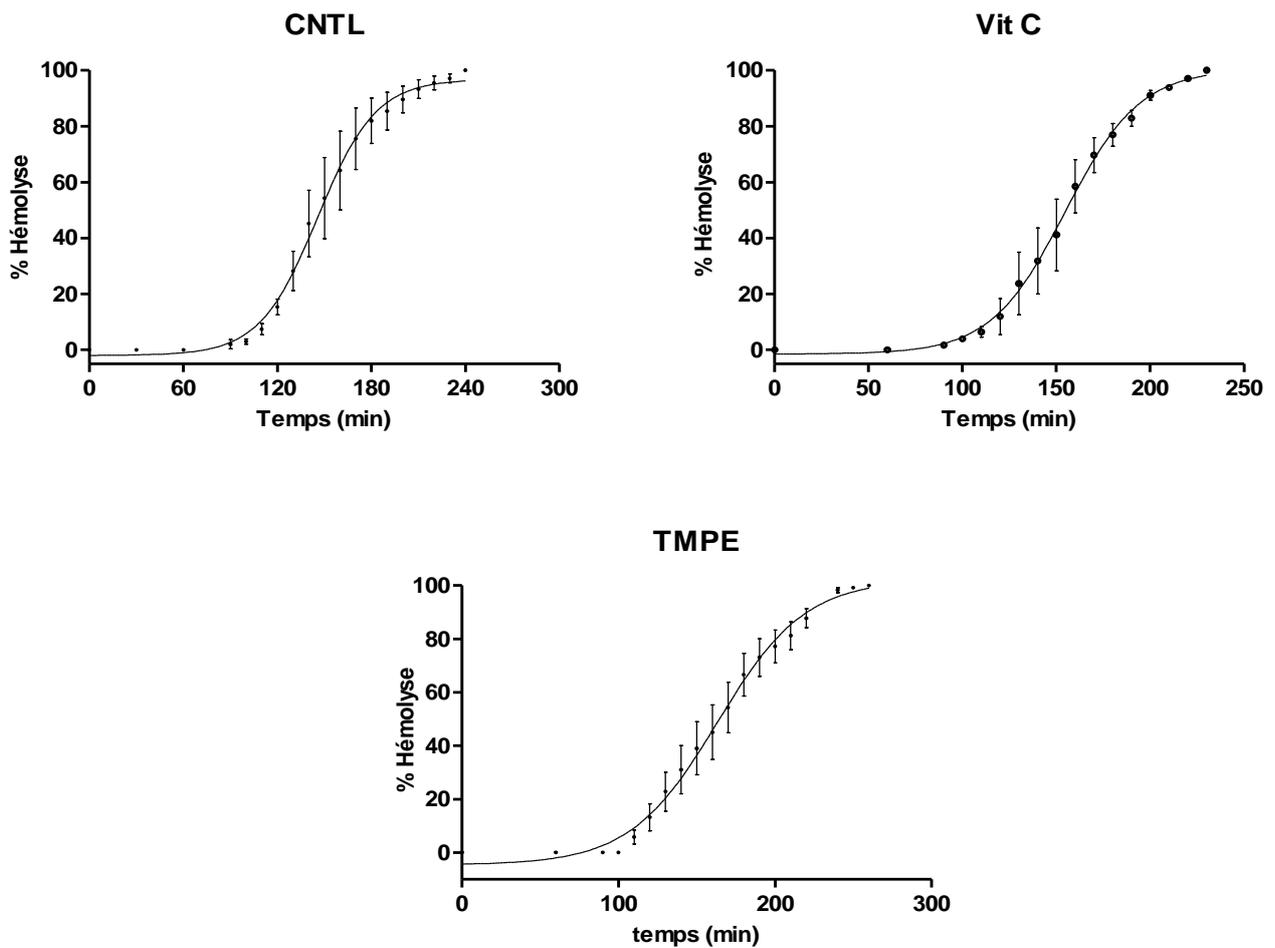


Figure. 19 : Cinétique de l'hémolyse provoquée par le *t*-BHP des groupes traités par ; NaCl 0.9% (CNTL), Vit C (50 mg/kg) et TPME (100 mg/kg). Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 9-10).

Les valeurs d' HT_{50} calculées révèlent un prolongement du temps de demi hémolyse chez le groupe traité par rapport au groupe contrôle (Figure 21). Pour les souris du groupe traité par 100 mg/kg, le TPME a causé un prolongement du temps de l'hémolyse ($HT_{50} = 179.6 \pm 10.39$ min) est statistiquement significative ($p \leq 0.05$) en comparant au groupe témoin ($HT_{50} = 146.5 \pm 1.77$ min). La Vit C a provoqué un retardement non significatif de l'hémolyse ($HT_{50} = 158.2 \pm 3.849$ min).

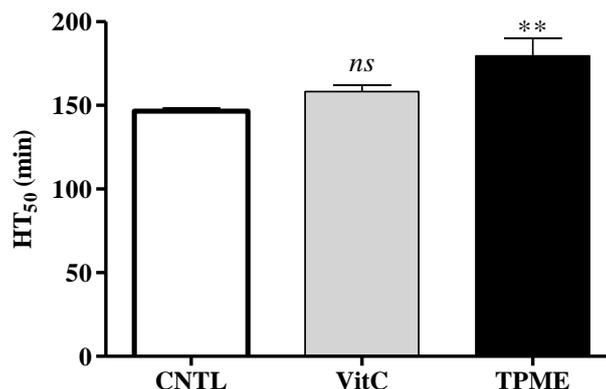


Figure. 20 : Temps de demi-hémolyse (HT₅₀) pour les différents groupes traités par; NaCl 0.9% (CNTL), Vit C (50 mg/kg) et TPME (100 mg/kg). Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 9-10). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe CNTL. *: $p \leq 0.05$, ns: non significatif.

Les effets protecteurs de TPME peut être dus à : (1) la qualité de leur contenu en composés phénoliques, parce qu'il n'y a pas de corrélation significative entre l'effet de anti-hémolytique de l'extrait et sa teneur en ses composés (Blasa *et al.*, 2007 ; De Marino *et al.*, 2012), et/ou (2) la différence dans le degré de pénétrations des molécules actives dans les érythrocytes. Il a été démontré que la liaison des flavonoïdes aux membranes des globules rouges inhibe de manière significative la peroxydation des lipides, et en même temps améliore leur intégrité contre la lyse (Tabart *et al.*, 2009 ; Kitagawa *et al.*, 2004). Il a été rapporté que l'extrait méthanolique de *T. polium* protège les globules rouges contre la superoxydation lipidique induite par 10 mM de peroxyde d'hydrogène. Egalement, les extraits aqueux de *T. polium* inhibent la peroxydation des lipides dans les homogénats de foie des rats en comparant au Trolox (Boumerfeg *et al.*, 2012).

4.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

Pour évaluer l'efficacité d'un traitement antioxydant, l'effet scavenger du radical DPPH est mesuré. Cette méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes et des aliments. L'administration de 100 mg/kg de TPME a entraîné une augmentation de la capacité antioxydante plasmatique ($28.64 \pm 5.84\%$), par rapport au

groupe contrôle témoin ($21.42 \pm 0.043\%$), mais reste non significative. L'administration de 50 mg/kg de Vit C augmente significativement la capacité plasmatique jusqu'à $47.27 \pm 0.017 \%$ ($p \leq 0.01$). La comparaison de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* indique que le TPME a gardé les mêmes propriétés. En comparant la capacité antioxydante plasmatique en utilisant le radical DPPH avec le test de la capacité antioxydante totale du sang, on constate que la dose de 100 mg/kg de l'extrait TPME cause une augmentation de la capacité antioxydante plasmatique (≈ 179 min) et la capacité antioxydante totale du sang ($\approx 29 \%$).

Krishnaiah *et al.* (2011) ont publié que l'extrait aqueux de *T. polium* présente une importante activité antioxydante *in vitro* et peut inhiber efficacement les processus oxydatifs. Egalement, l'extrait éthanolique présente la même activité antioxydante que l' α -tocophérol. L'extrait de *T. polium* administré aux rats (50 et 100 mg/kg), a augmenté significativement le pouvoir antioxydant total (TAP) et diminué les substances réactives à l'acide thiobarbutérique (TBARS) par rapport au control (Hasani *et al.*, 2007).

4.3. Pouvoir réducteur plasmatique évalué par la technique de FRAP

Un autre aspect a été visé pour mieux évaluer l'effet antioxydant *in vivo* du TPME utilisant la technique FRAP initialement décrite par Benzie et Strain (1996). Cette technique permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'antioxydants. Comme on peut l'observer (Tableau 13), le pouvoir réducteur (PR) continue à augmenter après 4 minutes de réaction et même double à 30 minutes pour le TPME.

Tableau 13 : Pouvoir réducteur (PR) par le FRAP (mmol/ μ l) des groupes traités avec NaCl 0.9 % (CNTL), Vit C (50 mg/Kg) et le TPME (100 mg/Kg).

	4 min	30 min
CNTL	3.83 ± 0.50	9.98 ± 0.16
TPME	4.05 ± 1.17^{ns}	11.07 ± 1.19^{ns}
Vit C	$5.35 \pm 0.34^*$	$12.81 \pm 0.76^*$

Les comparaisons effectuées contre le groupe CNTL. *: $p \leq 0.05$, ns : non significatif. (n = 9-10).

5. Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *T. polium* a été évalué en se basant sur la mesure de l'œdème de l'oreille induit par le PMA chez les souris comme modèle d'inflammation aiguë. L'application locale du PMA a induit une réponse inflammatoire de longue durée, résultant probablement de l'activation de la protéine kinase C (Kang *et al.*, 2008). Les souris du groupe témoin ayant reçu uniquement la solution d'acétone contenant le PMA ont développé au bout de six heures un œdème au niveau de l'oreille gauche caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de 0.304 ± 0.051 mm. Chez les souris du groupe injecté par le Diclofénac, une réduction significative de l'inflammation a été constaté où l'augmentation de l'épaisseur six heures après l'induction de l'inflammation est de 0.128 ± 0.033 mm. L'injection du TPME a atténué significativement l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin (0.238 ± 0.005 mm). D'autre part et en se basant sur le poids de l'œdème, le TPME à 100 mg/kg a réduit l'œdème de l'oreille de 7.26 ± 0.15 mg pour le témoin PMA à 5.92 ± 0.11 mg. Le Diclofénac a réduit le poids à 4.44 ± 0.13 mg (Figure 21).

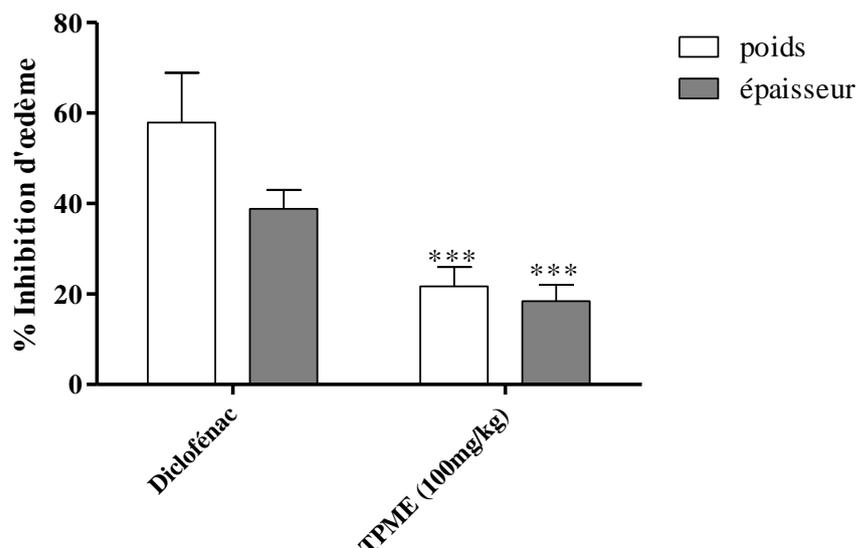


Figure. 21 : Pourcentage d'inhibition de poids et d'épaisseur d'œdème des groupes traités avec le Diclofénac (10 mg/kg) et le TPME (100 mg/kg), Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n= 8). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe Diclofénac. *** $p \leq 0.001$.

Les résultats obtenus ont une corrélation avec la teneur en polyphénols et en flavonoïdes du TPME. Les plantes à haute teneur phénolique ont été communément utilisées pour le traitement de nombreuses maladies (Kostić *et al.*, 2015). En effet, ces composés phénoliques exercent diverses activités biologiques, notamment antinociceptive (Abdollahi *et al.*, 2003), analgésique (Pourmotabbed *et al.*, 2010) et anti-inflammatoire (Oroian et Escriche, 2015).

L'analyse histopathologique a montré que toutes les oreilles droites (témoins négatifs) ne présentent pas de signes d'inflammation (Figures 22, 23 et 24). Cependant, l'examen des oreilles gauches a révélé un recrutement important des leucocytes polynucléaires dans le derme accompagné par la perturbation du tissu conjonctif et la formation d'un œdème. Le traitement par le TPME a entraîné une diminution modérée de l'infiltrat inflammatoire mais avec une persistance de l'œdème (Figure 24), par contre l'injection de Diclofénac, a conduit à une diminution importante des leucocytes.

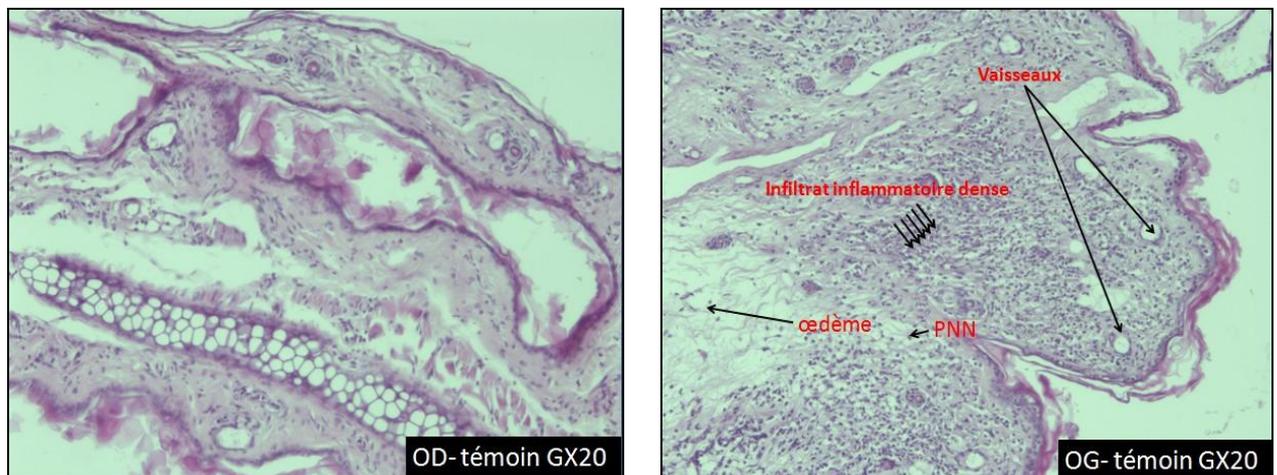


Figure. 22 : Coupes histologiques des oreilles des souris mâles témoin traité avec l'eau physiologique. Coloration hématoxyline/ éosine. Grossissement 20X. **OD :** Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), **OG :** oreille gauche recevant du PMA. PNN : polynucléaire neutrophile.

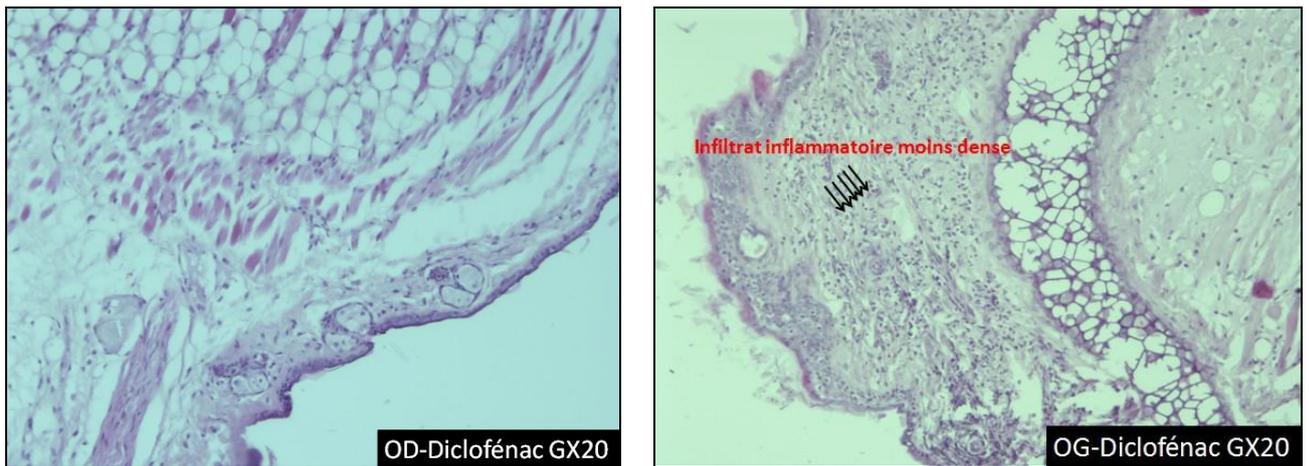


Figure. 23 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitée avec le Diclofénac. Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. **OD:** Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), **OG :** oreille gauche qui a reçu du PMA.

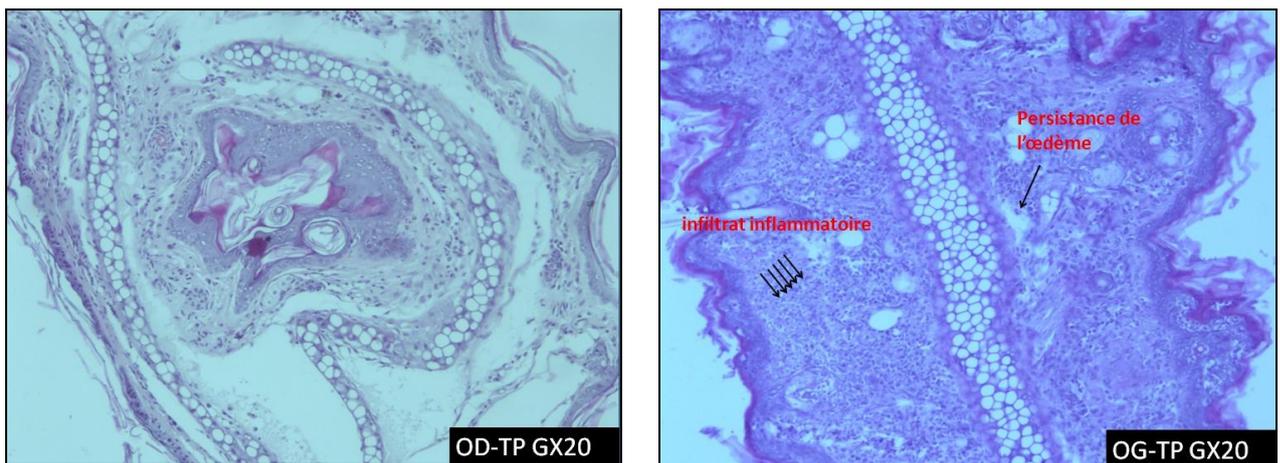


Figure. 24 : Coupes histologiques des oreilles de souris mâles traitées avec une dose de 100 mg/kg d'extrait méthanolique de *T. polium* (TPME). Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. **OD :** Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), **OG :** oreille gauche qui reçoit du PMA.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'effet anti-inflammatoire de *T. polium* a été étudié, *in vivo*, en utilisant le PMA comme inducteur de l'inflammation chez la souris comme modèle expérimental. Bien que Pourmotabed *et al.* (2010) suggèrent que certains flavonoïdes de *T. chamaedrys* (espèce voisine de *T. polium*) bloquent à la fois les deux enzymes : la cyclo-oxygénase à une concentration élevée et une faible concentration la lipo-

oxygénase dans la cascade du métabolisme de l'acide arachidonique chez des rats développant des œdèmes de la patte induit par le carragénine, il semble que son effet anti-inflammatoire pourrait être ainsi commenté par sa richesse en triterpénoïdes intervenant au cours de la phase de libération des prostaglandines (Pourmotabbed *et al.* 2010).

6. Effet hypouricémiant et évaluation de la fonction rénale

Les agents antihyperuricémiants sont couramment utilisés pour le traitement de la goutte et l'arthrite chronique comme les agents uricosuriques (urico-éliminateurs), les inhibiteurs de la XOR et de l'urate oxydase. Cependant, l'utilisation de ces agents antihyperuricémiants est limitée à cause de leurs effets secondaires et interactions médicamenteuses, potentiellement graves (Silva *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2014). De ce fait, la recherche de meilleurs agents antihyperuricémiants est fortement demandée. La présente étude présente un effort pour évaluer l'effet hypouricémiant du TPME et de chercher de nouvelles molécules à base de plante médicinale qui pourrait faire des progrès dans la lutte contre la goutte.

L'hyperuricémie est induite par l'injection intrapéritonéale de l'oxonate de potassium qui est un inhibiteur compétitif d'uricase hépatique qui bloque partiellement la conversion de l'acide urique en allantoïne et donc augmente le taux de l'acide urique dans le sang des souris en donnant un modèle animal hyperuricémiant (Osada *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 2011). L'acide urique, l'urée et la créatinine sont dosés à la fois dans le plasma et le surnageant du foie.

Les résultats montrent que la valeur de l'acide urique plasmatique du groupe témoin est de 1.48 ± 0.07 mg/L, alors que pour le groupe qui a reçu l'oxonate de potassium (OP), le taux est considérablement augmenté : 6.33 ± 0.46 mg/L deux heures après l'injection intrapéritonéale d'oxonate de potassium, ce qui indique le succès de l'induction de

l'hyperuricémie. À partir des résultats obtenus (Figure 26), il apparaît que le traitement par TPME a diminué significativement ($p \leq 0.01$) d'acide urique plasmatique (3.3 ± 0.18 mg/L) en comparaison avec le témoin. Pour le groupe OP, le taux d'acide urique plasmatique a augmenté de 4 fois et presque 2 fois pour le surnageant du foie (31.36 ± 5.4 mg/L), l'administration de 10 mg/kg d'allopurinol a diminué le taux d'acide urique vers le normal (1.89 ± 0.32 mg/L, 16.36 ± 1.03 mg/L, respectivement pour le plasma et le surnageant).

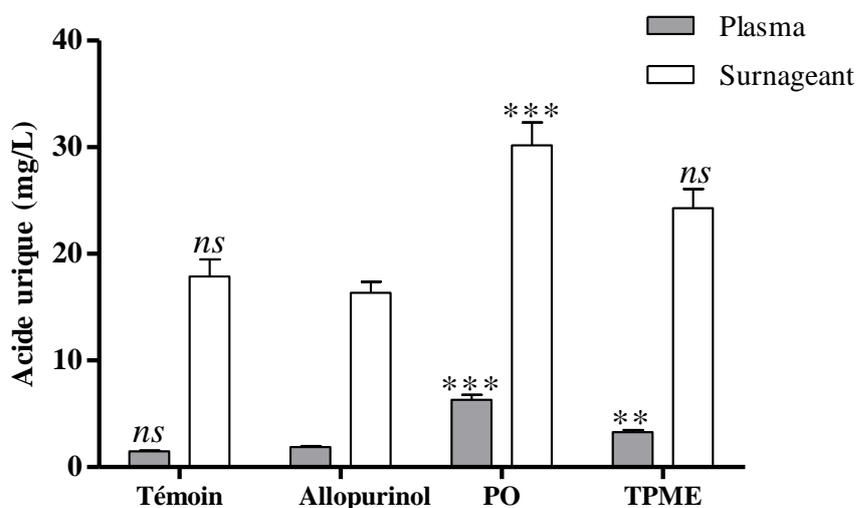


Figure 26 : Concentration d'acide urique plasmatique et hépatique des groupes traités avec NaCl 0.9 % (Témoin), OP (200 mg/kg), OP+Allopurinol (10 mg/kg), OP+TPME (100 mg/kg). La comparaison par rapport au groupe allopurinol, **: $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, ns: non significatif.

L'hyperuricémie est la pathologie la plus citée impliquant la XOR (réduit l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique). Pour mieux argumenter les résultats trouvés d'hypouricémie, on doit faire appel à l'inhibition de l'activité enzymatique de la XO. L'activité inhibitrice de la XO par le TPME a été évaluée *in vivo* en utilisant des modèles expérimentaux hyperuricémiques tout en mesurant le taux d'acide urique dans le plasma et le surnageant du foie. En effet, L'effet inhibiteur de l'extrait méthanolique de la plante sur l'activité de la XO a été déjà évalué *in vitro* par Boumerfeg *et al.* (2012) en suivant la diminution de la production de l'acide urique à 295 nm (IC_{50} TPME = 10.59 ± 0.58 μ M,

IC₅₀ Allopurinol = 57.114 ± 1.093 uM). Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, risque de perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps, et *vice-versa*, la présente étude a permis de prouver pour une première fois que son effet inhibiteur, voire indirectement, est gardé *in vivo*.

La XO est présente dans presque tous les tissus des mammifères (plasma des souris, rats et autres espèces), le plus haut niveau dans le foie, l'intestin et le lait. Comme le foie fut le principal organe du métabolisme, la XO y est habituellement présente à hauts niveaux. L'augmentation de l'activité de la XO plasmatique est accompagnée d'une diminution de celle hépatique qui peut être expliquée par la libération de la XO dans le sang à la suite de l'augmentation de la perméabilité de sa membrane cellulaire au cours du métabolisme hépatique accéléré (Huang *et al.*, 2011).

Des chercheurs ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la XO et par conséquent, faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et l'activité de la XO humaines (Zhu *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2011). En effet, la diminution très significative de l'acide urique plasmatique chez les souris hyperuricémiantes traitées par le TPME peut être expliquée soit par l'inhibition de la XO soit par l'inhibition de l'une des voies de synthèse de l'acide urique (Yu *et al.*, 2006). Les présents résultats sont en accord avec ceux publiés par Saghafi *et al.* (2013) qui ont montré que les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes, sont doués d'activité antioxydante non seulement parce qu'ils agissent comme piègeurs de radicaux libres, mais aussi de leur aptitude à inhiber l'activité de la XO (inhibition de 11.44% à 91.45%). Haidari *et al.* (2009) ont également interprété les niveaux d'acide urique réduits chez des rats hyperuricémiques par l'inhibition de l'activité enzymatique de la XO.

Li et ses collaborateurs (2011) ont montré que l'induction de l'hyperuricémie par l'oxonate de potassium provoque un dysfonctionnement rénal et par conséquent il augmente le taux d'acide urique et de la créatinine ce qui concorde avec les résultats obtenus. En pratique clinique, environ 90 % des patients souffrant de goutte sont attribués à des sur-excrétions d'acide urique. Les systèmes de transport d'urate des souris sont similaires à ceux des humains. En général, un dysfonctionnement rénale est caractérisé par des élévations de la créatinine plasmatique chez les souris traitées d'oxonate de potassium (Hua Hu *et al.*, 2010). Le TPME et l'allopurinol n'ont pas diminué le taux de la créatinine plasmatique (Figure 27). Cependant, le taux d'urée a diminué par rapport aux souris témoins normales. En les comparants au groupe "OP" (0.48 g/L), le TPME a diminué le taux d'urée mais cette diminution reste non significative. Le niveau de la créatinine et de l'urée était normal chez les souris hyperuricémiantes traitées par l'allopurinol à 10 mg / kg (Figure 27).

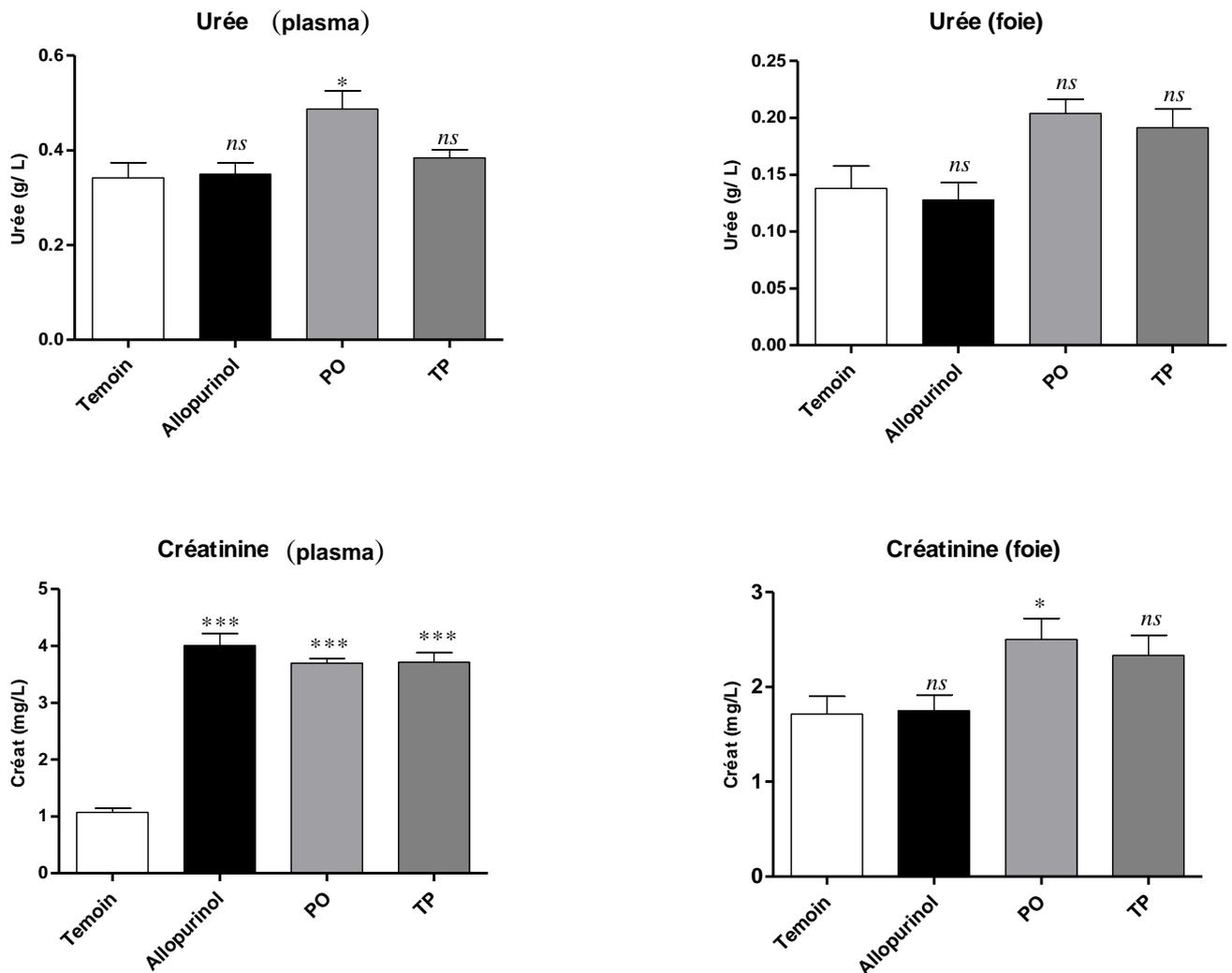


Figure 27 : Evaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine. La comparaison contre le groupe témoin. ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, ns: n'est pas significatif.

Dans les dernières décennies, la relation entre l'hyperuricémie et la progression de la maladie rénale a été largement observée dans des études cliniques et expérimentales. L'hyperuricémie joue un rôle important dans les lésions rénales. Cependant, les mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés (Huang *et al.*, 2014). L'échec rénal est la cessation de la fonction rénale qui peut être aiguë ou chronique. Dans les atteintes rénales aiguës, il ya perte

rapide de la fonction rénale dans les premières heures ou quelques jours, bien que la condition est potentiellement réversible et une fonction rénale normale peut être reprise. Les lésions rénales peuvent être accompagnées par une augmentation de la créatinine et de l'urée qui sont considéré comme excellents indicateurs pour l'évaluation de la fonction rénale (Trabsa *et al.*, 2015).

La créatinine est une molécule azotée produite par l'organisme par l'intermédiaire du catabolisme de la créatine qui est un composé protéique contenu dans le tissu musculaire. La créatinine est une molécule physiologiquement inerte. Cela signifie qu'elle n'est ni métabolisée, ni utilisée d'une quelconque manière par l'organisme. Elle est strictement éliminée par les reins. Son dosage est employé dans l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire. L'urée présente la forme principale d'élimination de l'azote, synthétisée lors du catabolisme des protéines par le foie, c'est l'un des premiers marqueurs qui a été utilisé pour mesurer le débit de filtration glomérulaire. Une teneur élevée indique généralement une atteinte glomérulaire, mais la concentration peut être aussi modifiée par une alimentation inadéquate ou par une hépatotoxicité (Jetanalin et Lee, 2013; Newcombe, 2013).

7. Evaluation toxicologique

7.1. Toxicité aiguë et estimation de la DL₅₀

Les souris mâles et femelles ont été observées individuellement pendant les 30 premières minutes et régulièrement pendant les premières 24h après l'administration par IP le TPME, les signes, symptômes et pourcentage de mortalité sont énumérés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Symptômes de toxicité aiguë observés avec le TPME.

Doses (mg/kg)	Signes et symptômes	Temps	% de mortalité	
			Male	Femelle
0 (NaCl9%)	Normal	-	0	0
100	Souris stressées	1 ^{eres} min	0	0
150	Poils piqués, souris stressées	1 ^{eres} min	0	0
200	Poils piqués, souris stressées	1 ^{eres} min	10	0
250	Poils piqués, souris stressées	30 min	10	0
300	Poils piqués, immobilisation des souris	6 jours	10	0
350	Poils piqués, respiration laborieuse	2 jours	20	0
400	Poils piqués, respiration laborieuse, tremblement, paralysie, irritabilité et mortalité	2 et 4 jours	50	20

Le TPME a été administré en dose unique par voie intra péritonéale aux souris (10 par lot/100 µl IP). Toutes les souris traitées ont été examinées pour déceler tous signes de toxicité pendant 14 jours. Les souris qui ont survécu étaient apparemment en bonne santé.

La carte clinique des rats femelles traités par le TPME dans les conditions de toxicité aiguë, s'est caractérisée par une accélération du rythme cardiaque, une détresse respiratoire, paralysie des pattes, des convulsions dues probablement à l'atteinte du système nerveux central par blocage de la production de l'acétylcholine dans les synapses du système nerveux central (Gouille *et al.*, 2004). Les animaux meurent généralement par arrêt respiratoire associé à des convulsions, alors que la majorité des animaux survivants recouvrent une apparence normale jusqu'aux 14^{ème} jours.

Les résultats de la DL₅₀ chez les souris traitées par voie intrapéritonéale de TPME présentés dans la courbe dose/réponse (Figure 28) sont 442,81 et 686,77 mg / kg de poids corporel chez les souris mâles et femelles, respectivement déterminées par la méthode de probits (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney), (Tableau 15).

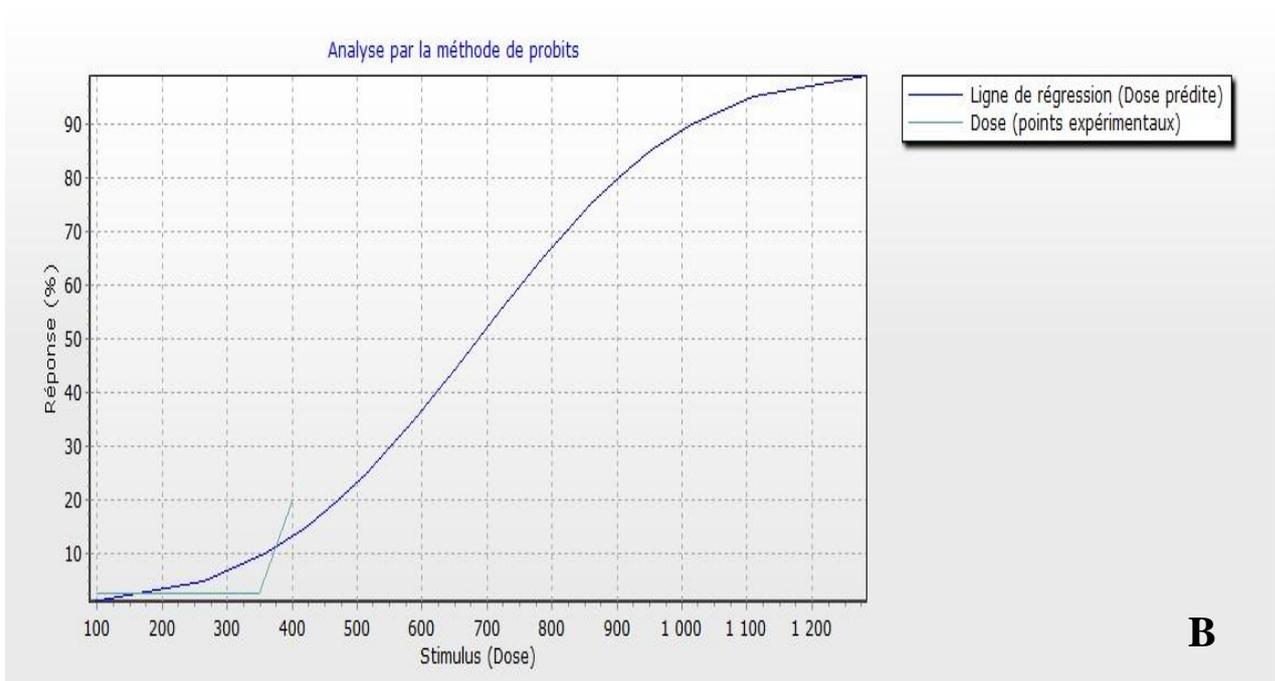
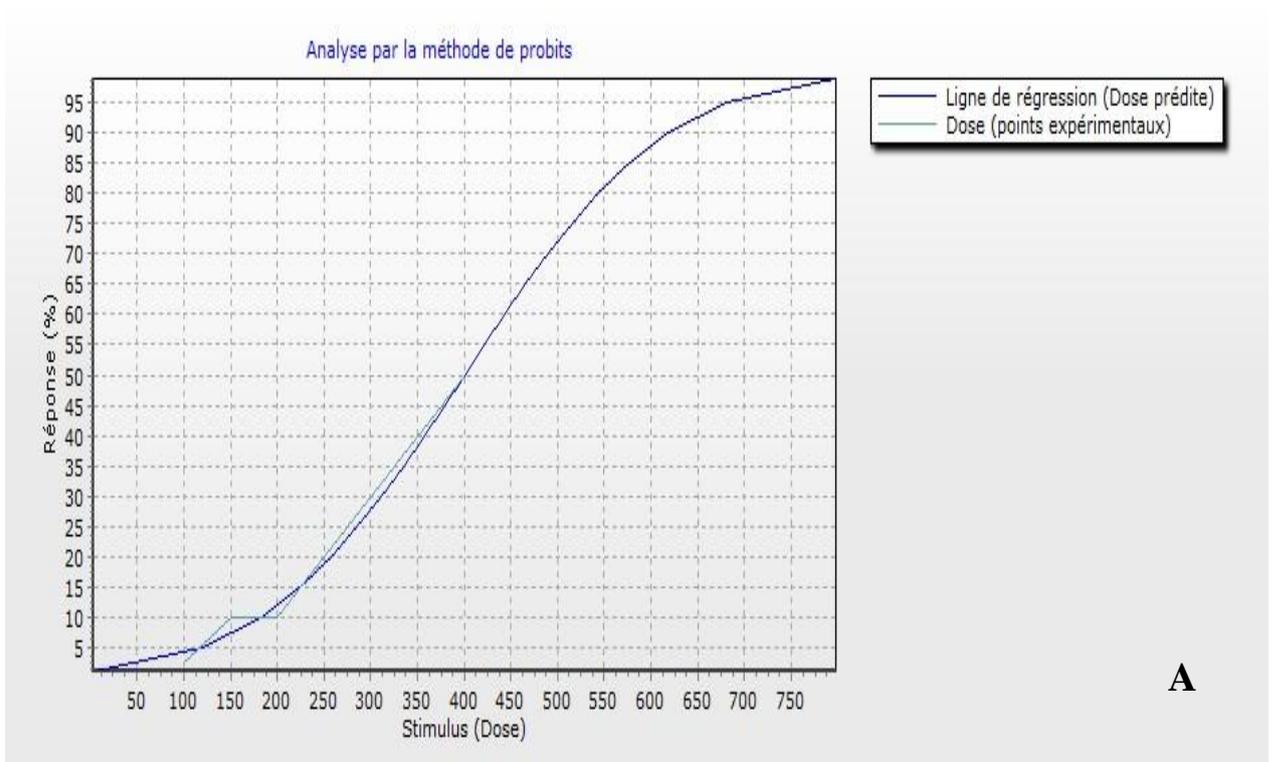


Figure 28 : Courbe dose réponse chez les souris mâles (A) et femelles (B) traités par voie intrapéritonéale par le TPME.

Tableau 15 : Détermination des différentes doses létales (DL) de TPME chez les souris par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (distribution normale).

DL	Male	Femelle
DL ₁₀	181.54	357.61
DL ₁₆	229.66	429.96
DL ₅₀	442.81	686.77
DL ₈₄	571.28	943.57
DL ₉₀	619.41	1015.92
DL ₁₀₀	656.69	1071.98

Au terme de cette expérience, il ressort que *T. polium* est une plante modérément toxique selon l'échelle de classification de Hodge et Sterner (Djyh *et al.*, 2010). Le caractère modéré de sa toxicité conférerait à ce phytomédicament la possibilité d'un usage thérapeutique qui devrait être sans danger à des doses inférieures à 442.81 mg/kg du poids corporel. Les résultats trouvés sont comparés aux travaux précédents résumés dans le tableau 16. Les autres souris qui ont survécu, restaient vivantes durant les 14 jours d'observation et ne montraient pas de changements dans le comportement, l'alimentation et la consommation d'eau (Twaij et Al-Dujaili, 2014).

Tableau 16 : Approche comparative des valeurs de DL₅₀ des différents extraits de *T. polium*.

Espèces/Sexe	Types d'extrait	DL ₅₀	Références
Rats male <i>Albino wistar</i>	Ethanolique	Après 24 h, 262.0 mg/kg	Khleifat <i>et al.</i> , 2002
Rats males et femelles <i>Sprague-Dawley</i>	Equeux	Après 14 jours, > 8g/kg	Rasekh <i>et al.</i> , 2005
Rats males <i>Albino wistar</i>	Ethanolique (80%)	Après 48 h, > 2000 mg kg	Hasani <i>et al.</i> , 2007
Souris males <i>BALB/c</i>	Lyophilisat aqueux	Après 24 h, 3.15 g/kg	Abu Sitta <i>et al.</i> , 2009
Souris males <i>Albino NMRI</i> (Male N-Mary rats)	Hydro-éthanolique	Après 72 h, > 6.4 g/kg	Zendehdel <i>et al.</i> , 2011
Souris males <i>albino wistar</i>	Aqueux	Après 24 h, 380 mg/kg	Twaij et Al-Dujaili ; 2014

7.2. Chronologie de l'évolution pondérale

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience de toxicité aiguë n'a démontré aucun changement significatif durant les sept jours du traitement par rapport aux témoins (Tableau 17).

Tableau 17 : Effet du traitement aigu sur le poids (g) des groupes ; Témoin (NaCl) et traité avec le TPME (100 mg/kg).

Sexe Jours	Male		Femelle	
	Témoin	100 mg/kg	Témoin	100 mg/kg
0	31.09 ± 2.19	32.87 ± 3.21	28.40 ± 1.65	30.26 ± 1.78
7	35.81 ± 5.19	37.76 ± 2.29	28.31 ± 1.50	29.32 ± 2.09

Les valeurs sont la moyenne ± SEM, n = 10.

L'évolution pondérale des animaux traités dans les conditions de toxicité chronique a démontré qu'il n'y a pas de diminution significative durant le traitement (Figure 29).

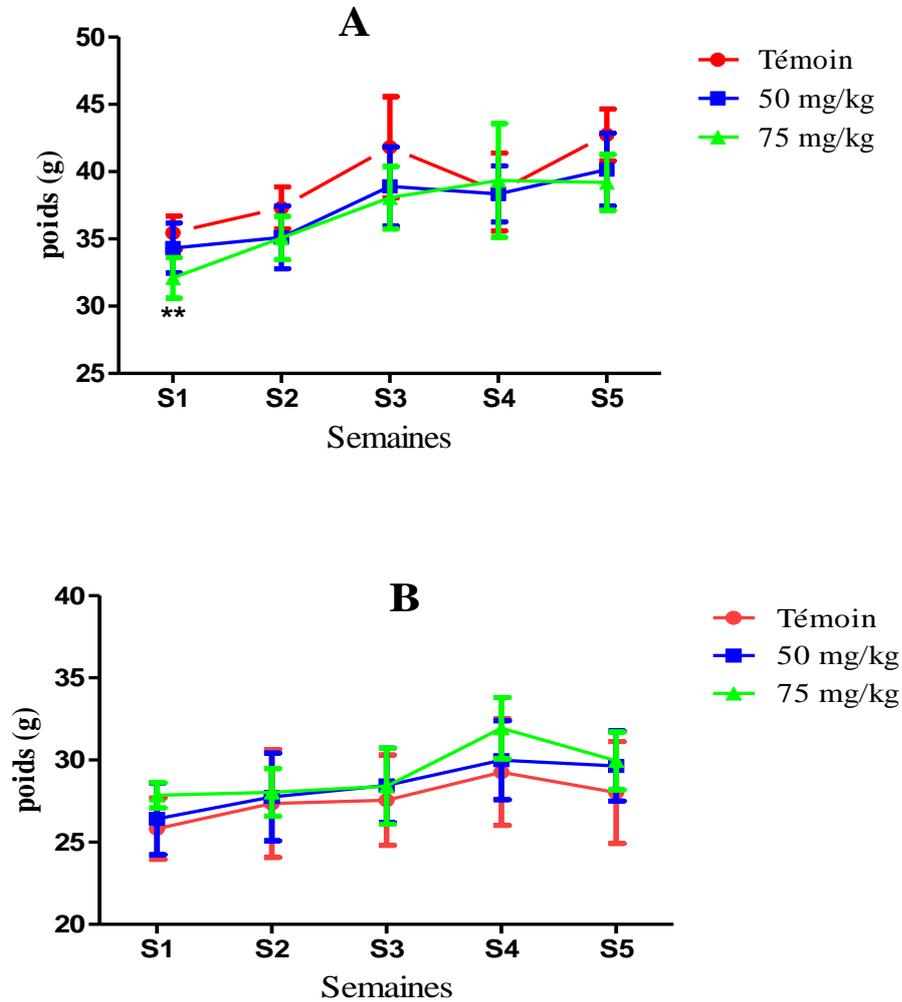


Figure 29 : Changement du poids corporel des souris males (A) et femelles (B) dans les conditions de toxicité chronique par le TPME. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM.

Les résultats ne sont pas concordants à ceux publiés par Rasekh *et al.* (2005) qui ont montré une diminution significative du poids total chez les rats femelles avec la dose 100 mg/kg d'extrait aqueux de *T. polium* pour les 21^{ème} et 44^{ème} jours de l'étude. Skouti *et al.* (2012) travaillant sur l'effet des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *T. polium* de Syrie chez des rats males blancs ont également rapporté une réduction du poids des rats

traités avec les doses les doses 50, 100 et 200 mg/kg. Ces différences peuvent être dues soit à la composition des deux extraits (méthanolique ou aqueux) soit à l'animal utilisé (souris et rats).

7.3. Masses relatives des organes

L'examen macroscopique des différents organes prélevés *in situ*, a montré que la taille, la forme et le poids sont normaux à l'exception de quelques taches bleuâtres et hémorragiques des poumons de quelques souris ont été enregistrés. Les valeurs des masses relatives des organes (ovaries/testicules, reins, rate, foie, poumons, cœur et cerveau) ne montrent aucunes modifications significatives chez les deux sexes de souris traitées dans les conditions de toxicité aiguë (7 jours) et chronique (30 jours) par rapport aux témoins. Le poids de l'organe peut être l'indicateur le plus sensible après exposition à un composé expérimental, des différences significatives dans le poids des organes entre les animaux traités et non traités (témoin) peuvent se produire en l'absence de toute modification morphologiques (Uduak *et al.*, 2013). Les résultats de la masse relative de la toxicité aiguë et chronique sont illustrés dans les figures 30, 31, 32 et 33.

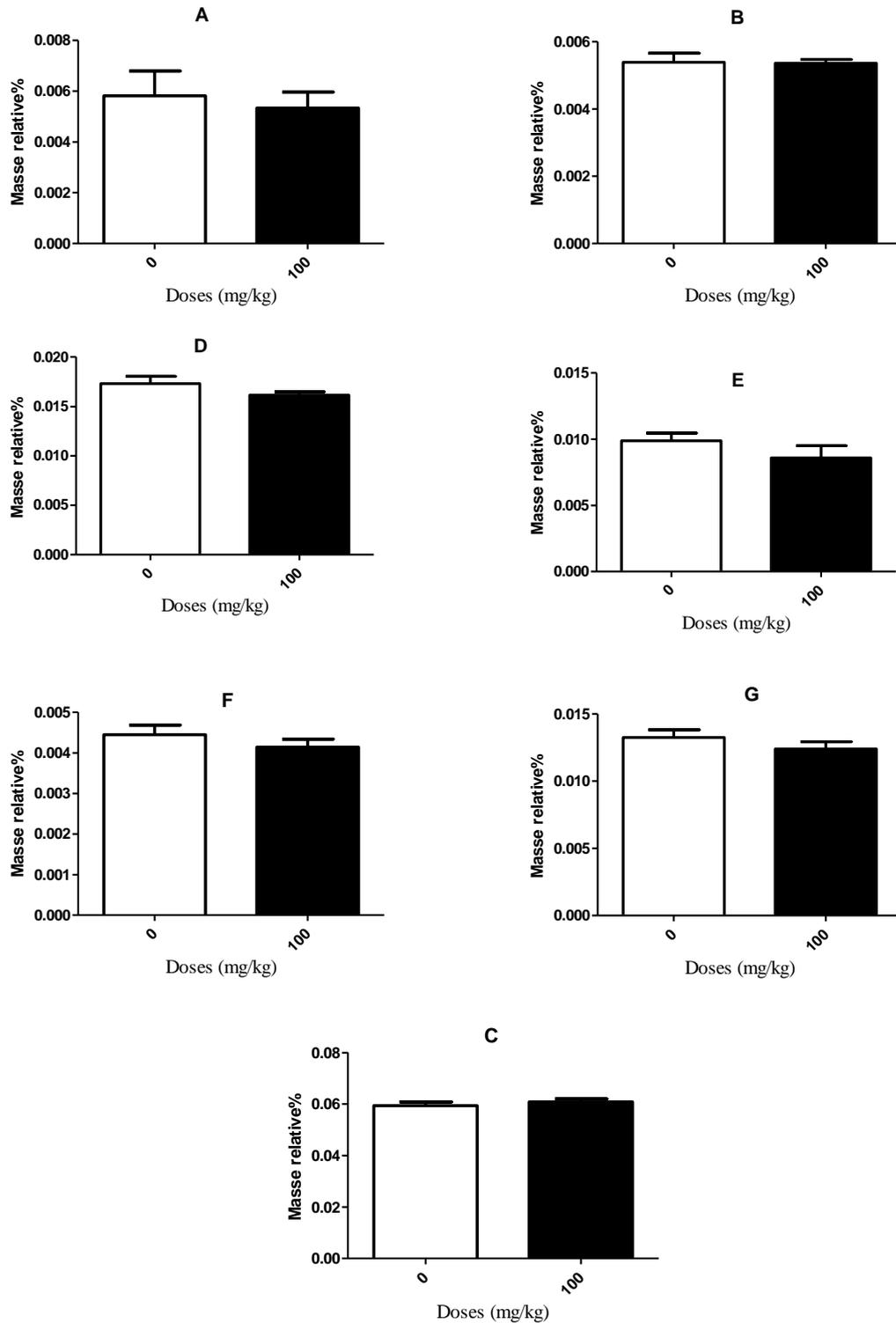


Figure 30 : Valeurs de la masse relative des organes des souris males pour les différentes doses au cours du traitement aigu avec le TPME. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 7-8). Organes : **A**, testicules ; **B**, reins ; **C**, rate ; **D**, foie ; **E**, poumons ; **F**, cœur ; **G**, cerveau. Les groupes : témoin (0) et traité (100 mg/kg).

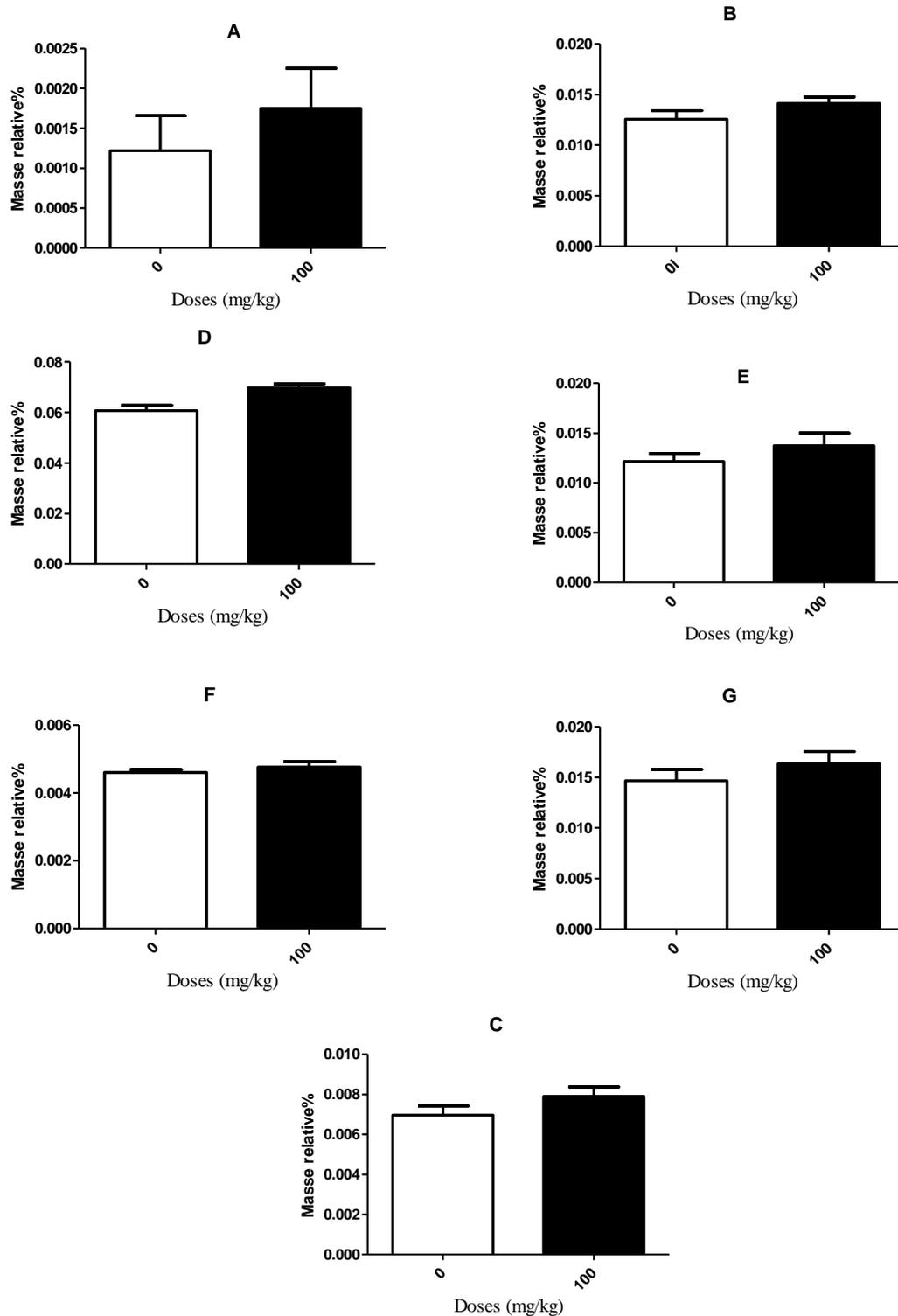


Figure 31 : Valeurs de la masse relative des organes des souris femelles pour les différentes doses au cours du traitement aigu avec le TPME. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 7-8). Organes : **A**, ovaires ; **B**, reins ; **C**, rate ; **D**, foie ; **E**, poumons ; **F**, cœur ; **G**, cerveau. Les groupes : témoin (0) et traité (100 mg/kg).

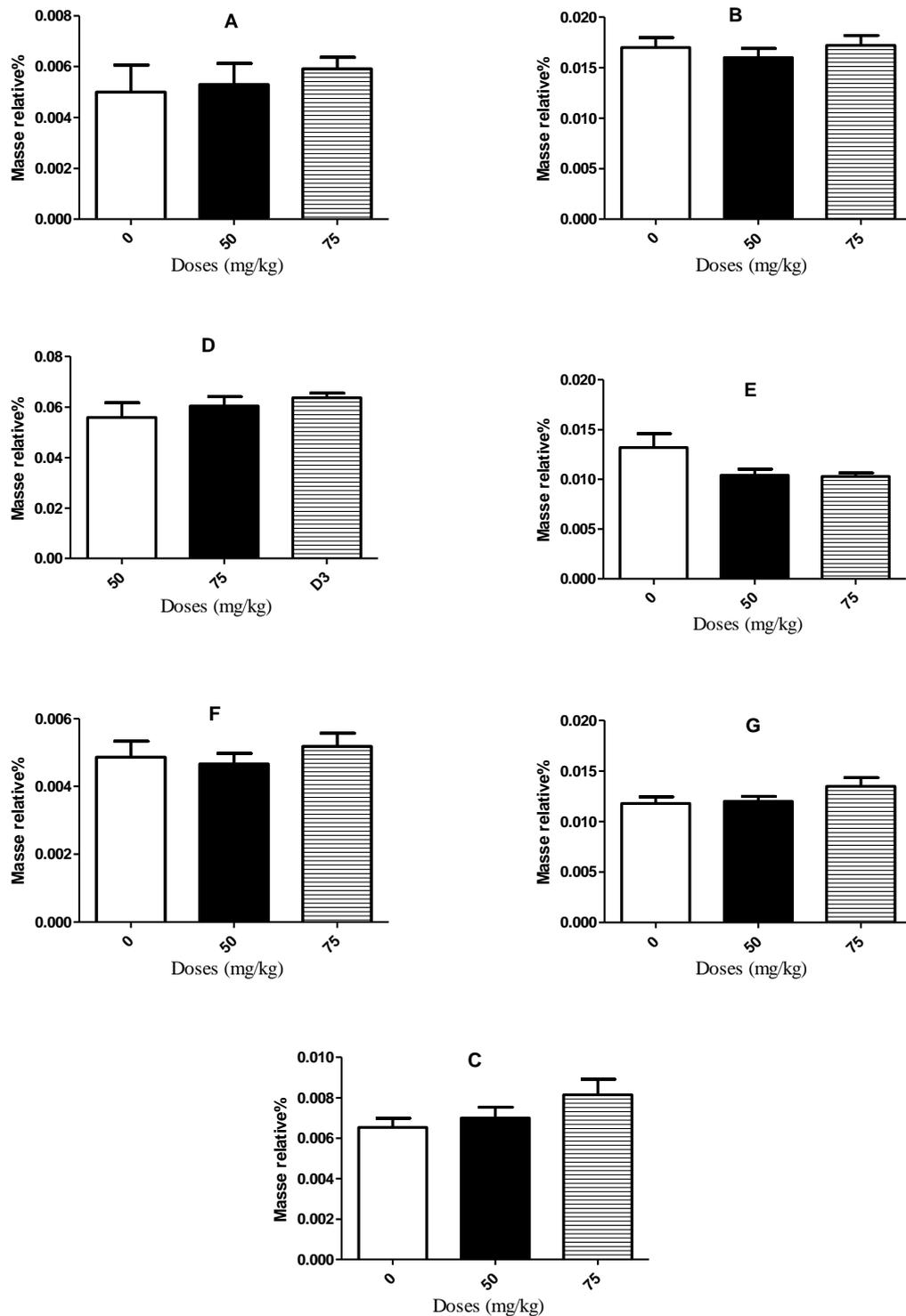


Figure 32 : Valeurs de la masse relative des organes des souris males pour les différentes doses au cours du traitement chronique avec le TPME. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 7-8). Organes : **A**, ovaires ; **B**, reins ; **C**, rate ; **D**, foie ; **E**, poumons ; **F**, cœur ; **G**, cerveau. Témoin (0) et traités (50 et 75 mg/kg).

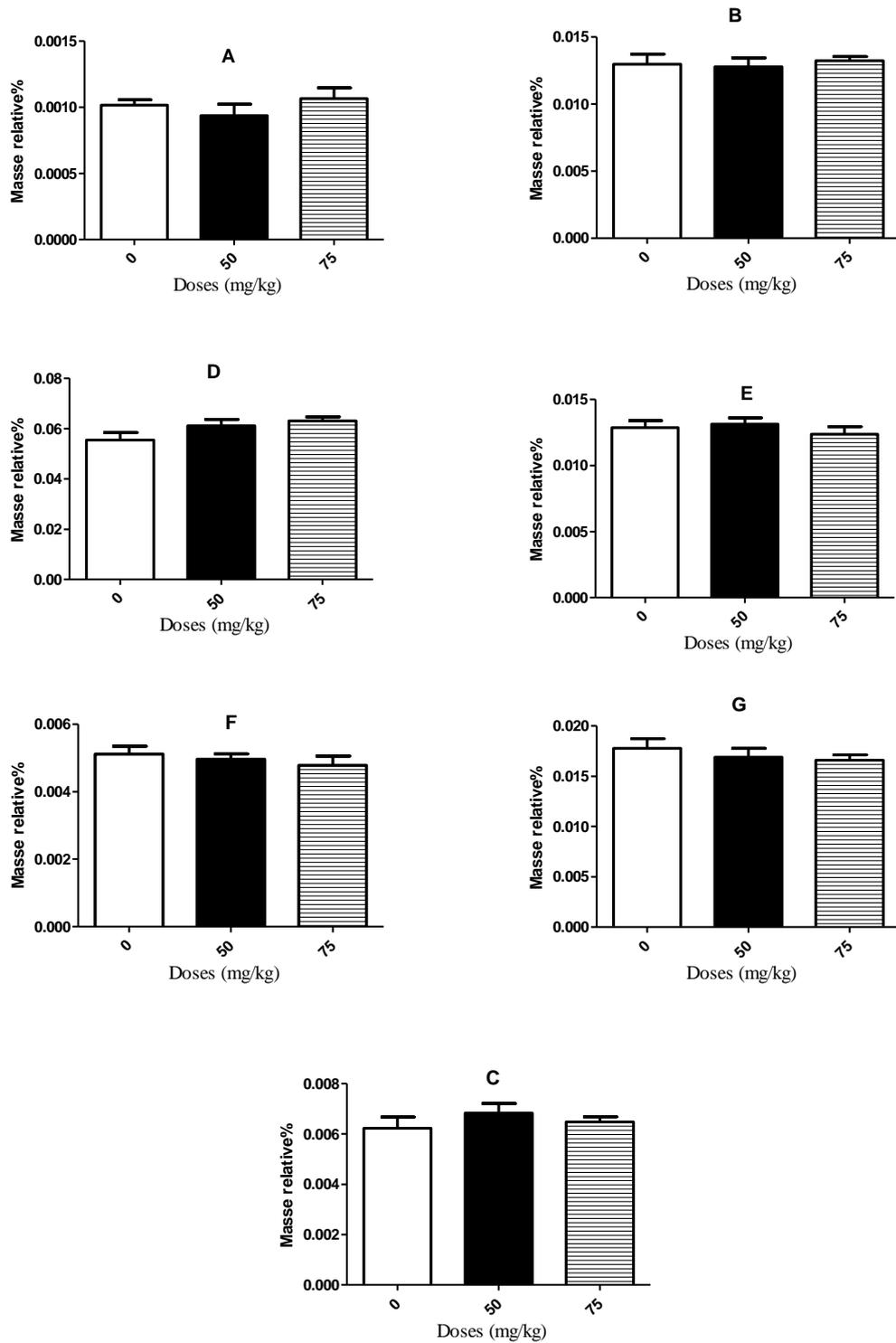


Figure 33 : Masse relative des organes des souris femelles pour les différentes doses au cours du traitement chronique avec le TPME. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 7-8). Organes : **A**, ovaires ; **B**, reins ; **C**, rate ; **D**, foie ; **E**, poumons ; **F**, cœur ; **G**, cerveau. Témoin (0) et traités (50 et 75 mg/kg).

7.4. Effets du TPME sur les paramètres biochimiques

Les études sériques effectuées sur les souris mâles et femelles traitées par TPME ne montrent aucun changement significatif des paramètres doses pendant 7 jours de traitement. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Analyses biochimiques de traitement aigu des souris mâles et femelles par NaCl 9‰ (témoin) et le TPME avec la dose 100 mg/kg (IP, n = 8).

Paramètres Biochimiques	Male		Femelle	
	Témoin	100 mg/kg	Témoin	100 mg/kg
Urea (gr/ L)	0.58 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.53 ± 0.03	0.54 ± 0.03
Chol (gr/ L)	1.373 ± 0.11	1.40 ± 0.11	0.89 ± 0.04	0.81 ± 0.03
TG (gr/ L)	0.87 ± 0.05	0.81 ± 0.04	1.05 ± 0.08	1.54 ± 0.01
ALP (UI/L)	101.3 ± 4.47	100.3 ± 8.41	273.6 ± 20.40	245.8 ± 16.86
TGO (UI/L)	410.8 ± 24.50	382.5 ± 21.83	159.0 ± 15.57	214.3 ± 13.20
TGP (UI/L)	81.57 ± 2.05	79.57 ± 6.85	41.50 ± 3.12	37.14 ± 2.68
Creat (mg/ L)	4.25 ± 0.16	4.22 ± 0.15	6.86 ± 0.26	6.88 ± 0.39
Glu (gr/ L)	1.95 ± 0.12	1.99 ± 0.12	1.62 ± 0.07	1.79 ± 0.06
Na (meq/l)	179.0 ± 7.02	175.0 ± 3.51	159.0 ± 1.51	154.8 ± 2.23
K (meq/l)	7.725 ± 0.96	7.429 ± 0.79	5.78 ± 0.34	5.79 ± 0.19

Les données sont exprimées par moyenne ± S.E.M.

Toutefois, les valeurs d'urée avec la dose 75 mg/kg, TGO et TGP avec la dose 50 mg/kg des souris femelles et TGO des souris mâles traitées avec la dose 50 mg/kg dans les conditions de toxicité chronique par le TPME, sont significativement augmentées par rapport aux non traitées. Ainsi qu'une diminution significative du taux de cholestérol avec les deux doses testées comparés aux témoins a été enregistrée (Tableau 19).

Tableau 19 : Analyses biochimiques de traitement aigu des souris males et femelles par NaCl 9% (témoin) et le TPME avec les doses 50 et 75 mg/kg (IP, n = 8).

Paramètres Biochimiques	Male			Femelle		
	Témoin	50 mg/kg	75 mg/kg	Témoin	50 mg/kg	75 mg/kg
Urea (gr/ L)	ND	ND	ND	0.56 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.77 ± 0.07*
Chol (gr/ L)	1.47 ± 0.09	1.13 ± 0.06**	1.08 ± 0.04**	1.24 ± 0.01	0.97 ± 0.04*	0.98 ± 0.04*
TG (gr/ L)	1.60 ± 0.07	1.53 ± 0.06	1.62 ± 0.14	1.10 ± 0.05	0.87 ± 0.05	1.24 ± 0.15
ALP (UI/L)	114.5 ± 18.08	89.83 ± 14.10	71.20 ± 10.87	251.0 ± 10.16	230.1 ± 8.20	252.3 ± 17.05
TGO (UI/L)	193.7 ± 15.93	257.2±14.11*	196.2 ± 14.88	191.0 ± 8.90	243.2±8.003**	188.6 ± 10.96
TGP (UI/L)	33.33 ± 1.54	38.20 ± 3.26	32.80 ± 7.08	46.43 ± 2.60	59.13 ± 1.06**	50.67 ± 4.38
Creat (mg/ L)	10.46 ± 1.15	7.95 ± 0.68	10.06 ± 2.29	9.83 ± 0.67	11.92 ± 0.56	12.37 ± 1.94
Glu (gr/ L)	0.99 ± 0.05	0.76 ± 0.07	0.94 ± 0.09	1.11 ± 0.17	1.31 ± 0.17	1.34 ± 0.25
Na (meq/l)	171.70 ± 2.03	166.90 ± 2.48	164.10 ± 4.07	172.6 ± 3.37	172.9 ± 0.79	169.3 ± 5.84
K (meq/l)	5.47 ± 0.22	5.743 ± 0.27	6.23 ± 0.25	5.06 ± 0.23	5.50 ± 0.25	6.23 ± 0.96

Les données sont exprimées par moyenne ± S.E.M. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01. ND: non déterminé.

L'élévation significative du taux de l'urée chez les souris femelles traitées avec la dose de 75 mg/kg de TPME peut être expliquée par une augmentation de dégradation des composés protéiques, mais aussi par une atteinte de la fonction rénale et un dysfonctionnement de la filtration glomérulaire dans la rétention des substances, y compris l'urée, ce qui pourrait être responsable des hauts niveaux d'urée. D'autres parts, les taux élevés d'urée dans le plasma pourraient être dues à la destruction des hématies (Wasnaa Hatif, 2010). Les présentes données concordent avec les résultats de Rasekh *et al.* (2005) et Iriadam *et al.* (2006) qui ont montré une augmentation significative du taux d'urée et créatinine chez les lapins rendus diabétiques après traitement par l'extrait aqueux de *T. polium* (82 mg/kg).

Le taux du cholestérol a été sensiblement réduit après traitement chronique par le TPME avec les deux doses chez les deux sexes de souris utilisés (22 %). Ceci est en accord avec les observations d'Abu Sitta *et al.* (2009). Rasekh et ces collaborateurs (2001) qui ont

.....

également montré que l'extrait aqueux de *T. polium* cause une réduction de 29-46% du taux du cholestérol total chez les rats hyper-lipidémiques avec les doses 100 et 150 mg/kg administré par voie *intra-péritonéale* pendant 10 jours, et ont attribué cette diminution à la présence de quelques flavonoïdes doués de propriétés anti hyper-lipidémiques. Selon Mousavi *et al.* (2012), l'effet hypolipémiant d'extrait d'actate d'éthyle de *T. polium* chez des rats males alimentés par 50 % de succhrose dans l'eau potable pendant 10 semaines ensuite traités oralement avec les doses 50, 100 et 200 mg/kg pour deux autres semaines, est possiblement relié à la présence de flavonoïdes.

Skouti *et al.*, (2012), ont enregistré une diminution significative du taux du cholestérol chez les rats traités par voie IP pendant 21 jours avec les doses 50 et 100 mg/kg. Cependant, Shahraki *et al.* (2007) ont révélé que des rats diabétiques nourris par les parties aériennes de *T. polium* (50 mg/kg/mois), ont présenté des concentrations élevées du cholestérol et des triglycérides. Ces controverses peuvent être expliqués par la différence les méthodes d'extraction adoptées (Vahidi *et al.*, 2010) et/ou aux critères géographiques du milieu de croissance de la plante. D'autres études s'avèrent nécessaires pour déterminer les mécanismes d'action et d'évaluer le potentiel de *T. polium* pour la gestion des conditions d'hyperlipidémie.

Les enzymes hépatiques sont sensiblement augmentées chez les deux sexes traités avec la dose 50 mg de TPME /kg des poids corporel durant les 30 jours de traitement. En effet, au cours d'une lésion hépatocellulaire des activités sériques de la TGO, TGP et PAL sont augmentées (Abdollahi *et al.*, 2013). Ces perturbations peuvent indiquer des dommages aux tissus du foie probablement modifiée par la perméabilité de la membrane cellulaire ; par conséquent, elles conduisent à la fuite des enzymes des tissus vers la circulation sanguine. L'alanine et l'aspartate aminotransférases sont considérés comme des bio-indicateurs

.....
sensibles de lésions hépatocellulaires et dans la limite peuvent fournir une évaluation quantitative de l'ampleur des dommages au foie (Uduak *et al.*, 2013).

Les présents résultats concordent avec les travaux de Mattéi *et al.* (1995) qui ont trouvé que l'ictère apparaît 5 à 10 jours après traitement par la plante accompagnée par une élévation progressive du taux des TGO, TGP et PAL. Toutefois, Rasekh et ces collaborateurs (2005) ont montré que la TGP ne s'élève qu'avec la dose 300 mg/kg et après un traitement chronique de 44 jours. Cependant, Mazokopakis *et al.* (2005) rapportent qu'un dysfonctionnement du foie apparaît après un mois de traitement par une infusion de *T. polium*. Ainsi, Sawidou *et autres* (2006) ont rapporté deux cas d'hépatite chez deux femmes souffrant d'hyperlipidémie et qui se traitaient par *T. polium* pendant 2 à 3 mois. Les deux patientes présentent des taux élevés d'aminotransférases (TGO et TGP).

Des rats recevant l'extrait hydroéthanolique de la plante pendant 14 jours avec la dose de 500 mg/kg ne présentent aucunes perturbations des composantes du bilan hépatique TGO, TGP, PAL, bilirubine totale et protéines totales par rapport aux témoins (Parna *et Mirzaei*, 2014). Il en ressort que le traitement des souris par le TPME s'avère dangereux après une administration prolongée supérieure ou égale à un mois, ceci est soutenu par les différents résultats de la littérature précédemment décrits.

7.5. Histopathologie

L'observation des coupes histologiques du rein et du foie des souris traitées par rapport aux témoins a permis de constater quelques particularités ont été observées.

7.5.1. Histologie rénale

De manière générale, les coupes histologiques du rein n'ont pas montré de modifications de la structure par rapport au groupe témoin. En effet, l'examen du rein a révélé une congestion vasculaire autour des vaisseaux des deux sexes étudiés dans les conditions de toxicité aiguë (Figure 34) et chronique; qui est plus au moins importante et un infiltrat inflammatoire est observé dans les coupes histologiques des souris males traités avec la dose de 75 mg/kg par rapport au témoin (Figure 35).

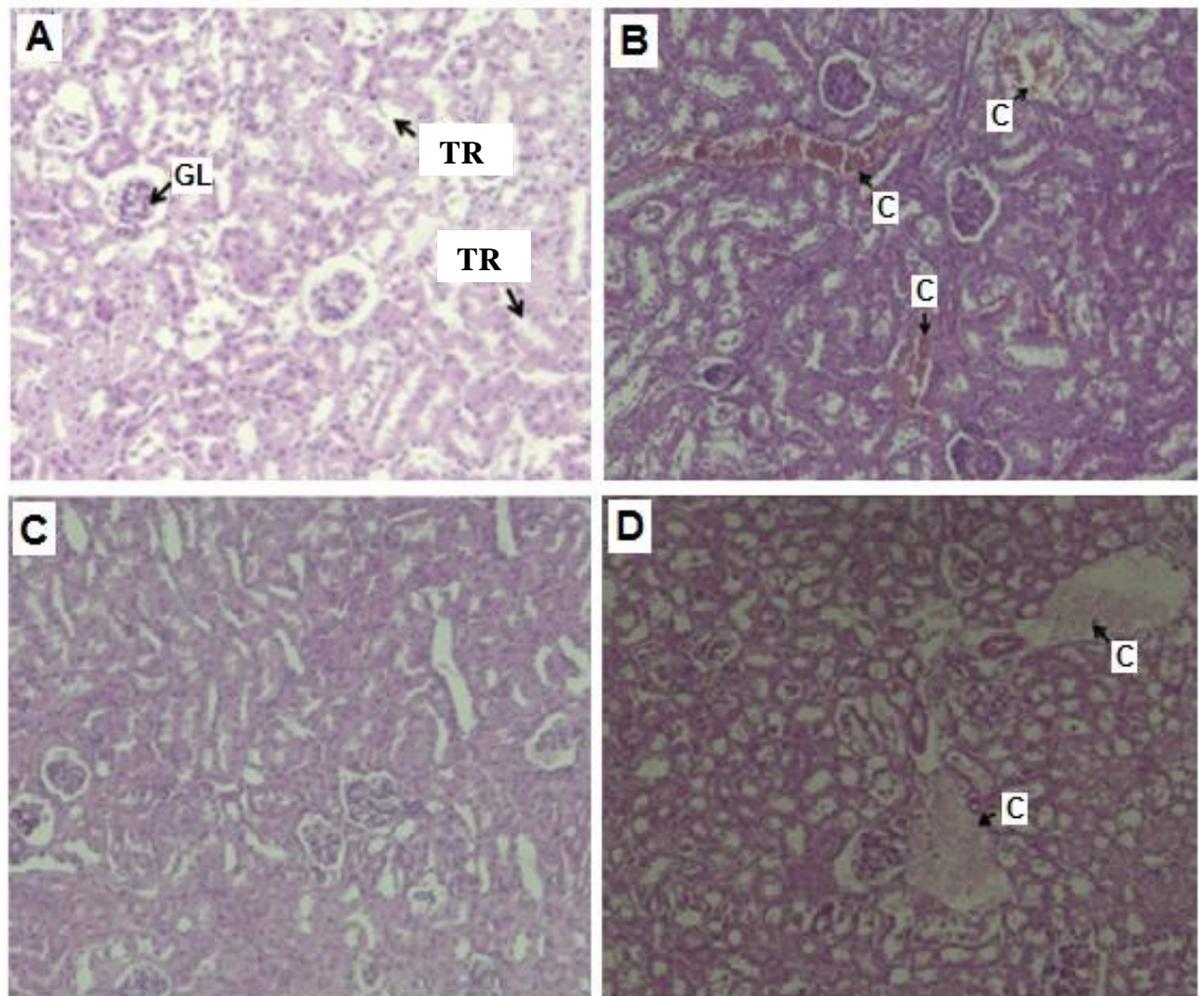


Figure 34 : Coupes histologiques du tissu rénal des souris males (A: témoin, B: traitée) et femelle (C: témoin, D: traitée). Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 10X. GL: glomérule ; TR: tubes rénaux ; C: congestion. Les coupes histologiques ont été effectuées après traitement aigu des animaux avec la dose de 100 mg/kg de TPME/IP. (Éosine-hématoxyline/Grossissement X 10).

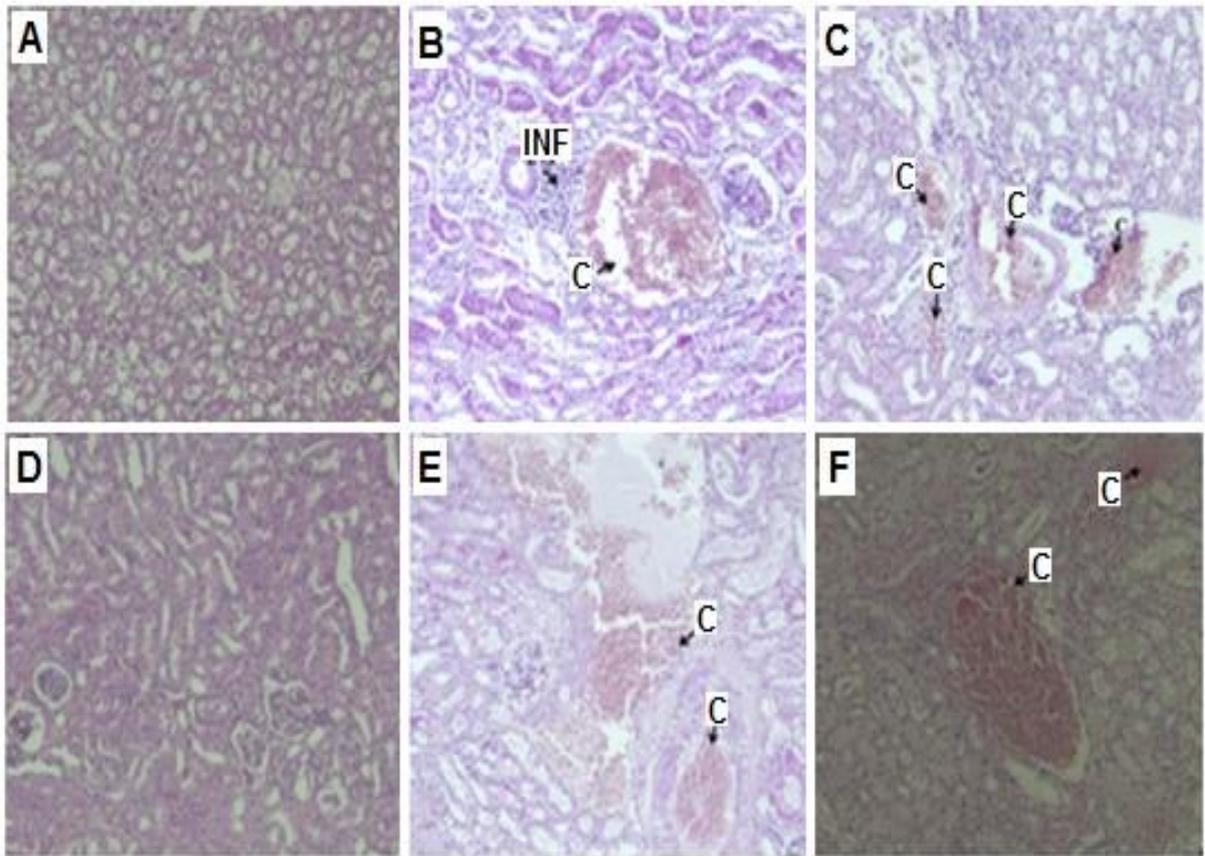


Figure 35 : Coupes histologiques du tissu rénal après traitement chronique des souris avec les doses de 50 et 75 mg/kg de TPME des souris males (**A**: témoin, **B** et **C** traitées avec 50 et 75 mg / kg, respectivement) et femelle (**D**: témoin, **E** et **F** traitées avec 50 et 75 mg / kg, respectivement). Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 10X. C: congestion ; INF : infiltrat inflammatoire.

Pratiquement, le rein a été faiblement altéré après traitement des souris par le TPME. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Khleifat *et al.* (2002) qui montrent que l'administration prolongée d'extrait éthanolique de *T. polium* pendant six semaines augmente significativement l'urée associé à un endommagement du rein et une augmentation de la vacuolisation cytoplasmique des cellules rénales notamment avec la dose 50 mg/kg. Toutefois, Iriadam *et al.* (2006) ont confirmé la mort par une apoptose dans quelques sections rénales des lapins rendus diabétiques et traités avec une dose de 82 mg/kg d'extrait aqueux de *T. polium*. Rafieian-Kopaei et Baradaran (2013) ont montré que l'injection de l'extrait aqueux de *T. polium* par IP avec les doses 50, 100, 150 et 200 mg/kg chez des rats pendant 28 jours

de manière continue et discontinue, résulte dans des effets toxiques sur les tubules rénaux ; dégénération, destruction et vacuolisation .

Sur le plan biochimique, la biotransformation de médicaments, de xénobiotiques et d'autres substances (extraits de plante par exemple) est assuré par de multiples systèmes enzymatiques rénaux y compris CYP₄₅₀ et mono-oxygénases ; favorise la formation de métabolites toxiques et d'espèces oxygénées réactives. La présence de ces sous-produits du métabolisme fait pencher la balance en faveur du stress oxydatif, qui dépasse les antioxydants naturels et augmente le pourcentage des lésions rénales soit par alkylation ou oxydation d'acide nucléique, dommages de protéines, superoxydation lipidique et rupture des brins d'ADN (Perazella, 2009).

7.5.2. Histologie hépatique

L'examen histologique des souris traitées dans les conditions de toxicité aiguë a marqué des particularités importantes avec les doses testées. Une congestion portale et un infiltrat inflammatoire ont été observés sur les coupes des souris traitées (Figure 36).

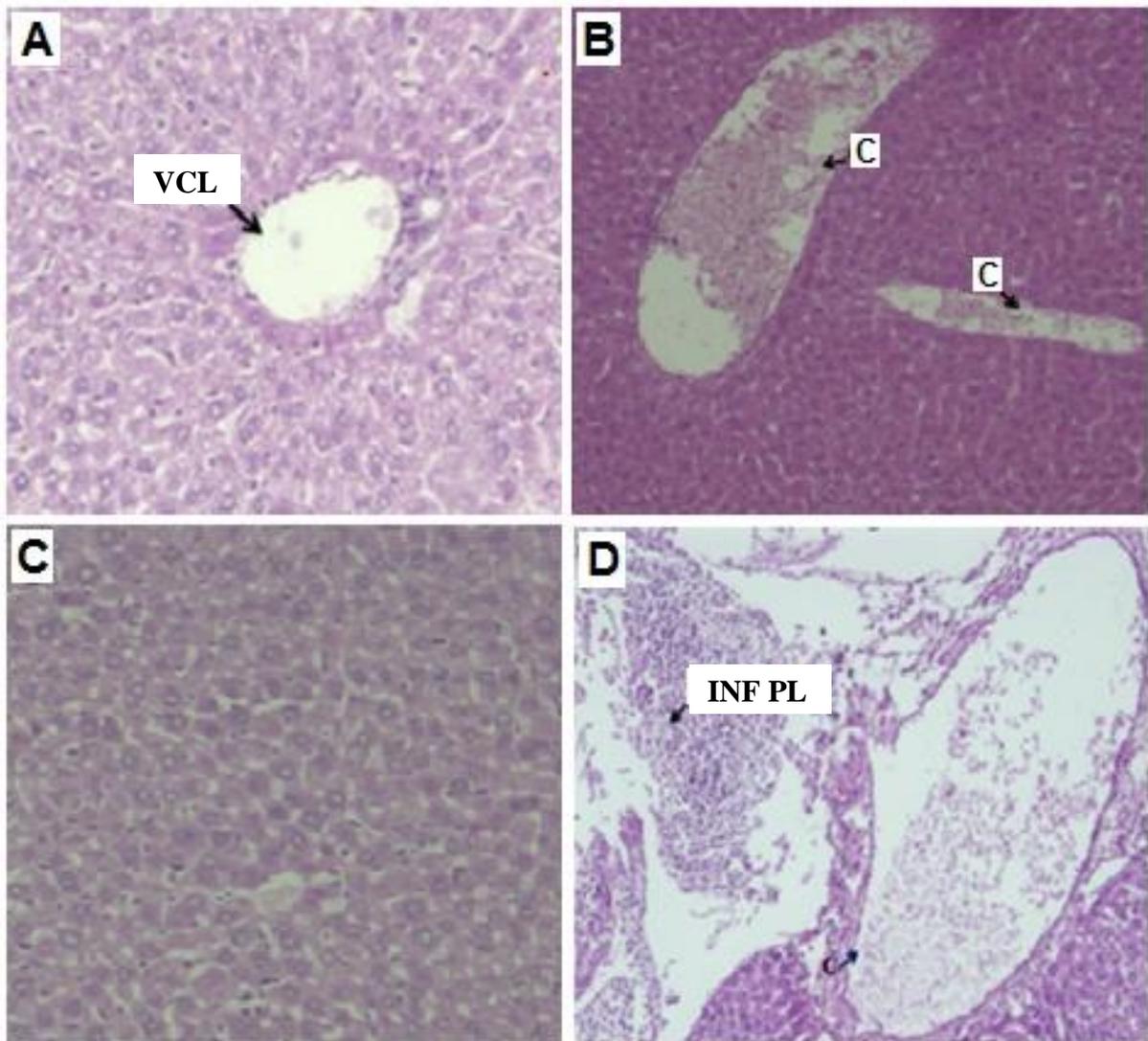


Figure 36 : Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins mâles et femelles (A et C) et traitées (B et D) respectivement avec la dose de 100 mg/kg de TPME. Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement 600X. **VCL**: veine centro-lobulaire; **C**: congestion; **INF PL** : infiltrat inflammatoire polynucléé.

L'administration intrapéritonéale chronique de l'extrait de la Germandrée chez les souris mâles a révélé une nécrose avec la dose 50 mg/kg et un important infiltrat inflammatoire autour des vaisseaux et dans les sinusoides, ainsi qu'une vasodilatation et congestion vasculaire avec la dose 75 mg/kg.

Toutefois, l'observation histologique du foie des souris femelles traitées avec la dose 50 mg/kg montrent une péliose (ou les vaisseaux sanguins sont distendus). Une importante

ballonisation cellulaire (les hépatocytes sont augmentés de taille et leur cytoplasme est clarifié, considérés comme en voie de destruction) sur les coupes des souris traitées avec la dose 75 mg/kg a été observée (Figure 37).

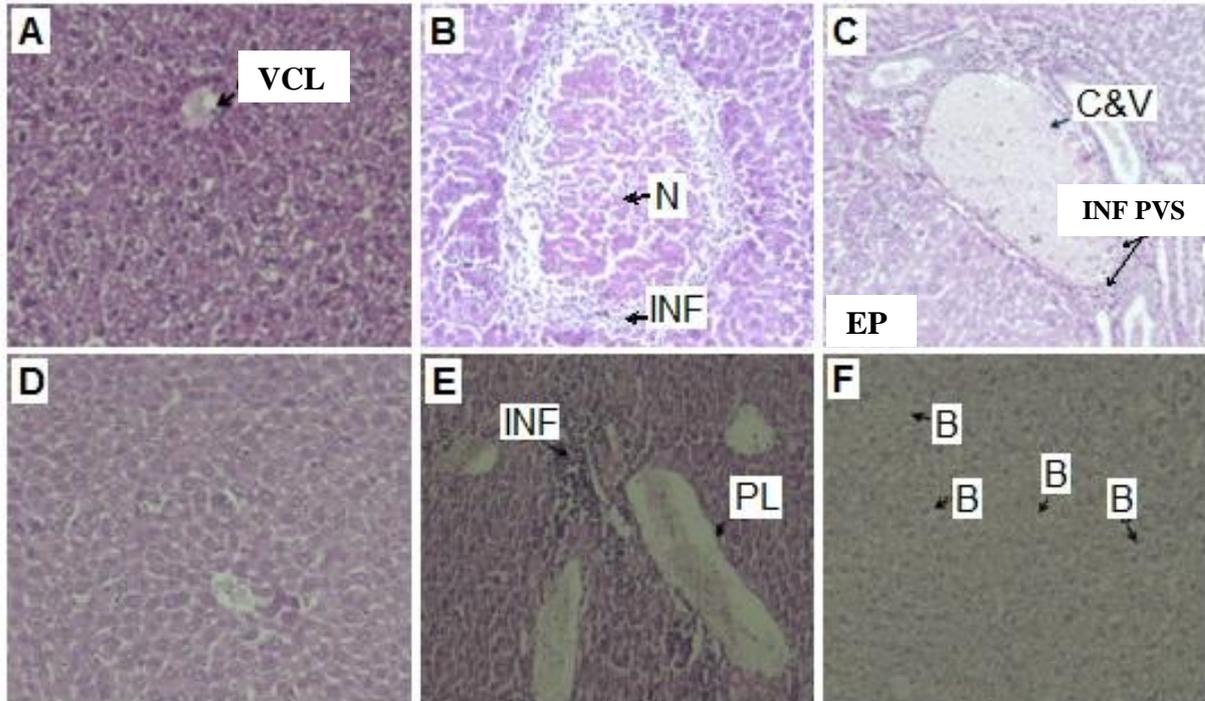


Figure 37 : Coupes histologiques des tissus hépatiques des souris témoins males et femelles (A et D) et traitées par le TPME dans les conditions de toxicité chronique (B et E) et (C et F) avec les doses de 50 et 75 mg/kg respectivement. Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement X 10). VCL: veine centrolobulaire ; N: nécrose; INF: infiltrat inflammatoire; EP: espace porte; C&V: vasodilatation et congestion; INF PVS: infiltrat inflammatoire péri vasculaire; PL: péliose; B: ballonisation.

La littérature rapporte des cas d'hépatotoxicité sévère après consommation de *T. polium* (Starakis *et al*, 2006). De plus, des dommages du foie ont été découverts après une consommation intermittente et continue de l'herbe. Le premier cas signalé était une grave insuffisance hépatique aiguë chez une femme grecque âgée de 37 ans après consommation de thé de *T. polium* utilisé comme remède contre l'hypercholestérolémie légère pendant 10 jours (Mattéi *et al*, 1995). L'histologie hépatique a révélé une image de l'hépatite aiguë ou chronique : des cas d'hépatite aiguë sévère, liées à une autre plante du genre, *Teucrium chamaedrys* ont été signalés. La plupart des cas humains présentant l'hépatite montrent des

.....
élevations des taux plasmatiques d'enzymes hépatiques telles que TGO, TGP, ALP, LDH, GGT (Abu Sitta *et al.*, 2009).

Les présents résultats concordent avec Savvidou *et al.* (2007) qui ont observé après examen histologique du foie d'une femme grecque âgée de 47 ans admise à l'hôpital en raison des valeurs élevées de transaminases suite à une consommation de tisane de *T. polium* (antécédents de diabète sucré léger et d'hypercholestérolémie) pour trois mois avant l'admission ; un infiltrat inflammatoire composé principalement de lymphocytes et plasmocytes, une nécrose et une présence de quelques sections inflammatoires et une ballonnisation de la plupart des hépatocytes. Les lésions hépatiques de ces cas étaient similaires à notre modèle animal. En effet, la nécrose hépatocellulaire, l'infiltration de lymphocytes et l'inflammation des sections observées après traitement chronique des animaux par le TPME est la conséquence d'une atteinte du foie. Sur le plan biochimique, ces altérations sont confirmées par l'élévation significative des activités de TGP plasmatique, indicateur spécifique de la fonction hépatique (Parna et Mirzaei, 2014). La nécrose des hépatocytes, comme expliquent Zal *et al.* (2001), suggère que les lésions des cellules sont produites par les processus apoptotiques à la suite des dommages hépatotoxiques directs et rapides en passant par le gonflement cellulaire. Ces résultats soutiennent les travaux précédents de Rasekh *et al.* (2005) et Abu Sitta *et al.* (2009) qui ont montré qu'un échec grave du foie chez l'homme après administration prolongée de *T. polium*.

T. polium contient des saponines, des glycosides, des flavonoïdes et de nombreux diterpénoïdes furano-néoclérodanes, tels que aéropoline et capitatine (les deux ainsi présents dans *T. capitatum*) et teuloline A et B. Tous ces diterpénoïdes montrent de grandes similitudes à la *Teucrine A* et *Teuchamaedryne A* dérivés de *T. chamaedrys* (Zhou *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2011). Bien que le mécanisme d'hépatotoxicité de *T. polium* n'est pas bien élucidé dans

des modèles animaux. Il est probable que les furano-diterpénoïdes similaires présents dans les parties aériennes soient des précurseurs hépatotoxiques (Eschke et Eickhoff, 2015).

La nécrose hépatocytaire est assurée par un mécanisme direct, une toxicité directe et une série de réactions immunitaires secondaires (Abdualmjid et Consolato, 2013). La toxicité directe est connue pour être la cause fondamentale des dommages du foie, mais les mécanismes immunologiques ou même un mélange de cytotoxicité et d'immunogénicité peuvent être impliqués (Ingwale *et al.*, 2009). Une liaison covalente de l'hydrolase d'époxyde peut avoir lieu à la surface des hépatocytes humains et en présence de la *teucrine A*, pourrait déclencher des réactions immunitaires et induire la formation d'auto-anticorps menant les cellules à lyse cellulaire (Zhou *et al.*, 2004). Le cycle furane de ces diterpénoïdes est oxydé par le CYP3A4 en époxyde réactif qui réagit avec des protéines telles que CYP3A et époxyde hydrolase. La Teucrine A se lie de façon covalente à des protéines d'hépatocytes de rat, les furano-diterpénoïdes diminuent les niveaux de GSH et de protéines thiols associées au cytosquelette cellulaire et en revanche, augmentent les niveaux cytosoliques de Ca^{+2} . Tous ces événements conduisent à la formation de vésicules dans la membrane plasmique, la fragmentation de l'ADN et la mort des cellules hépatiques par l'induction de l'apoptose (Figure 38), (Eschke et Eickhoff, 2015).

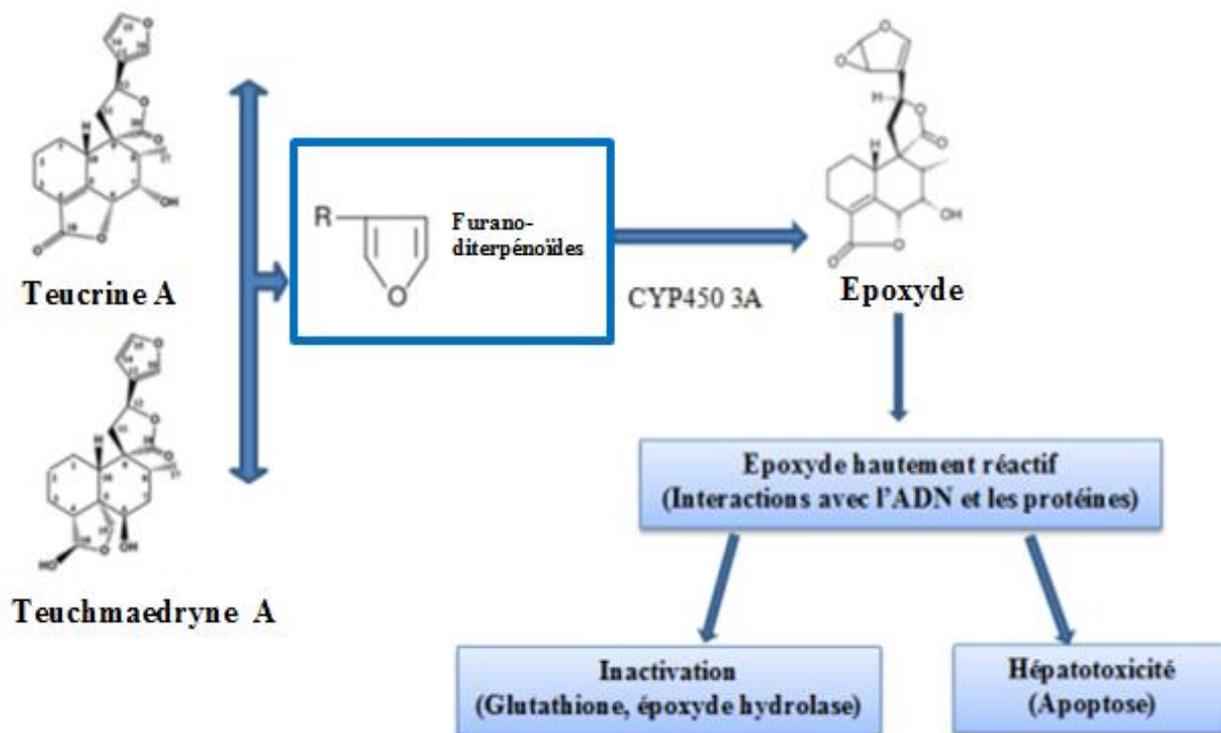


Figure 38 : Bioactivation proposé de la Teucrine issue de *Teucrium chamaedrys* (Stickel *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2011).

Enfin, la sensibilisation du patient reste au centre de l'identification précoce de la toxicité à base de plantes. Comme pour les médicaments classiques, les doses recommandées ne doivent pas être dépassées, et les patients doivent être conseillés d'utiliser les marques réputées soumises à des normes de bonne pratique médicale, de préférence sous la supervision d'un praticien de la médecine traditionnelle. Ils devraient également être informés des éventuels effets néfastes. Idéalement, il faut tenter de se procurer les produits concernés et les analyser pour leur composition chimique. Plus la recherche est également nécessaire d'identifier les molécules soupçonnées être toxiques dans les médicaments à base de plantes. Seulement alors peuvent être développées des thérapies logiques (Chitturi et Farrell, 2008).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont utilisées dans le monde pour traiter diverses pathologies, y compris l'inflammation, les maladies cardio-vasculaires, le cancer... Les plantes médicinales contiennent des composés qui présentent des propriétés thérapeutiques très importantes. Leur utilisation en phytothérapie fut un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Pour permettre l'utilisation vaste des plantes médicinales dans la médecine moderne, la recherche et le développement de nouveau traitement important sont sollicités. Cependant, l'information scientifique sur les activités biologiques des plantes médicinales dont *Teucrium polium*, plante utilisée comme remède particulièrement au territoire méditerranéen pour lutter contre certaines perturbations métaboliques (glucidiques, protidiques et lipidiques) reste encore insuffisante. De ce fait, l'intérêt accordé à cette plante est de démontrer son effet bénéfique et thérapeutique afin de proposer des alternatives aux xénobiotiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. Parallèlement, la sécurité de son utilisation est d'une grande importance et la recherche d'interactions toxiques possibles est nécessaire.

Plusieurs actions bénéfiques de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* ont été trouvées dont l'activité antioxydante (*in vitro* et *in vivo*), anti-hyperuricémiante, anti-hémolytique et anti-inflammatoire.

Enfin, l'étude de toxicité a montré que cette plante est modérément toxique mais peut à long terme être hépatotoxique et/ou néphrotoxique et causer des perturbations des marqueurs biochimiques. Il y a peu de littérature qui parle des effets néphrotoxiques causés par la Germandrée, mais, les résultats de la présente étude démontrent un effet phytotoxique causé par l'administration prolongée de TPME. En effet, cette plante peut être une source

commune de dommages aux reins. L'histologie du foie peut indiquer une image d'hépatite aiguë ou chronique, l'infiltrat inflammatoire mononucléé (lymphocytes, macrophages) parfois associé à quelques polynucléaires neutrophiles, la nécrose hépatocytaire, la ballonnisation hépatocytaire marqueur précoce de mort cellulaire. Les atteintes du foie et du rein peuvent se produire après un emploi continu ou intermittent de la plante ; le risque causé serait en corrélation étroite avec la notion de dose. Une substance toxique en contact avec l'organisme représente un risque potentiel. Si les relations entre exposition/dose/effets toxiques sont parfaitement connues et quantifiées, il est alors possible, en connaissant l'exposition, d'en déduire ou prédire les effets au niveau de l'individu. En outre, le public doit être bien informé sur les conséquences néfastes de *T. polium* particulièrement s'il n'est pas officiellement informé aux sujets de leurs réactions défavorables possibles. L'utilisation traditionnelle devrait être très limitée et gérée par des phytocliniciens. Il est donc nécessaire de mieux informer les usagers d'autant que l'automédication est fréquente, d'améliorer l'évaluation des effets thérapeutiques et toxiques réels des produits de phytothérapie et de renforcer les contrôles pour éviter les risques d'erreurs aux différentes étapes depuis le recueil des plantes jusqu'à la distribution du produit final pharmaceutique.

Des études complémentaires approfondies sont à envisager pour mieux comprendre les molécules impliquées dans chacune des activités observées et les mécanismes par lesquels ces composés agissent. Ces investigations peuvent être résumées dans les points suivants :

- Caractérisation phytochimique, identification des composés actifs par des méthodes d'extraction différentielles ou par des techniques de chromatographie performantes permettant d'isoler les principes actifs de la plante afin de les présenter sous une forme galénique acceptable.
- Etudes approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

- Etude approfondie de la cytotoxicité *in vitro* et de la toxicité chronique *in vivo* et essai de fractionnement pour éliminer les substances toxiques et isoler les fractions à effets bénéfiques.
- D'autres études *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuses visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques.

Enfin, une sensibilisation est nécessaire sur l'usage de la médecine traditionnelle et la connaissance des mécanismes pathogènes de lésions rénales et/ou hépatiques, des facteurs de risque connexes et des mesures préventives associées à la vigilance et l'intervention précoce.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdollahi, Karimpour H, Monsef-Esfehani H. (2003). Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacol. Res.* **48**:31-35.
- Abdollahi M.R, Somi ME, Faraji E. (2013). Role of international criteria in the diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J. Gastroenterol.* **19**(23): 3629-3633.
- Abdualmadjid R.J, Sergi C. (2013). Hepatotoxic botanicals: an evidence based systematic review. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **16**: 376-404.
- Abu Sitta KH, Shomah MS, Salhab AS. (2009). Hepatotoxicity of *Teucrium polium* L tea: supporting evidence in mice models. *Austr. J. Med. Herb.* **21**: 106-108.
- Al-Ashban RM, Barrett DA, Shah AH. (2006). Effects of chronic treatment with ethanolic extract of *Teucrium polium* in mice. *J. Herbs Spices and Med. Plants* **11**: 27-36.
- Al Bahtiti N.H. (2012). *Teucrium polium* extracts Jordanian ja'adeh. *Asian J. Agric. Sci.* **4**(6): 379-382.
- Amacher D.E. (1998). Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regulat. Toxicol. Pharm.* **27**:119-130.
- Aouadhi C, Ghazghazi H, Hasnaoui B, Maaroufi A. (2013). Secondary metabolite, antioxidant and antibacterial activities of *Teucrium polium* L methanolic extract. *Intl. J. Agron. Plant. Prod.* **4**(8):1790-1797.
- Ardestani A, Yazdanparast R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in-vitro protein glycooxidation. *Food Chem. Toxicol.* **45**:2402-2411.
- Arrar L, Benzidane N, Krache I, Charef N, Khennouf S, Baghiani A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Phcog. Commn.* **3**: 70-74.
- Arun R, Sravya R.B, Roja C. (2012). A review on standardisation of herbal formulation. *Inter. J. of Phytotherapy* **2**(2): 74-88.
- Ashley N.T, Weil Zachary M, Nelson Randy J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Rev. Ecol. Evol. Syst.* **43**:385-406.
- Aksoy-Sagirli P, Ozsoy N, Ecevit-Genc G, Melikoglu G. (2015). In vitro antioxidant activity, cyclooxygenase-2, thioredoxin reductase inhibition and DNA protection properties of *Teucrium sandrasicum* L. *Ind. Crop Prod.* **74**:545-550.
- Atici S, Cinel I, Cinel L, Doruk N, Eskandari G, Oral U. (2005). Liver and kidney toxicity in chronic use of opioids: An experimental long term treatment model. *J. Biosci.* **30**:245-252.

- Autore G, Capasso F, De Fusco R, Fasulo M.P, Lembo M, Mascolo N, Menghini A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.). *Pharmacol. Res. Commun.* **1**:16.
- Baghiani A, Boussoualim N, Boumarfeg S, Trabsa H, Aouachria S, Arrar L. (2013). In vivo free radical scavenging, antihemolytic activity and antibacterial effects of *Anchusa azurea* extracts. *Int. J. Med. Med. Sci.* **46**:2051-5731.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel Forschung.* **46**: 1086-1089.
- Bahramikia S, Yazdanparast R. (2012). Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother. Res.* **26**: 1581-1593.
- Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nematbakhsh M, Asgari A. (2013). Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* in Wistar rats. *Pak. J. Med. Sci.* **29**(1) Suppl: 329-333.
- Barnes J, Anderson L.A, J Phillipson D. (2007). Herbal medicines. 3rd Ed, Pharmaceutical Press. USA. pp.7-39.
- Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. (2013). Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from western Algeria. *J. Med. Plants Res.* **7**(14):897-902.
- Bendjelloul-Bensalem M. (1998). Techniques histologiques théorie et pratique. Office des publications universitaires. Alger. pp. 6-41.
- Benouadah Z, Mahdeb N, Bouzidi A. (2012). Acute toxicity of total alkaloids of seeds of *Datura stramonium* in female mice. *Eur. J. Sci. Res.* **73**(3): 310-321.
- Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* **15**, 239(1): 70-6.
- Berger MM. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Metabol.* **20**: 48-53.
- Bin Hashim R, Azizan Nurul A, Zamli Z, Zulkipli Farah H, Mazlan N, Althunibat O.Y. (2014). Toxicity effects of water extracts of *Holothuria atra* Jaeger in mice. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* **4**(8): 614-617.
- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chem.* **104**(4): 1635-1640.

- Boizot N, Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de L'INRA*. 79-82.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Khennouf S, Arrar L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytother. Res.* **23**:283-288.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Djarmouni M, Ameni D, Adjadj A, Belkhiri F, Charef N, Khennouf S. (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chin. Med.* **3**:30-41.
- Bouzidi A, Mahdeb N, Kara N. (2011). Toxicity studies of alkaloids of seeds of *Datura stramonium* and synthesis alkaloids in male rats. *J. Med. Plant. Res.* **5** (15): 3421-3431.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales .3 eme édition. Paris. pp. 648-650
- Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2nd Ed. Paris. pp. 339-341
- Campos J. C, Kátia M.S. Gomes, Julio C.B. Ferreira. (2013). Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem. Toxicol.* **62**:107-119.
- Carocho M, Ferreira I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* **51**:15-25.
- Chen L, Hu Judy Y, Wang Steven Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.* **67**(5): 1013-1024.
- Chen P, Hung SI, Chen SY, Chen YT. (2011). Allopurinol. *In: Pharmacogenomic Testing in Current Clinical Practice, Molecular and Translational Medicine*, Springer Science, Business Media. pp. 213-223.
- Chen X-W, Serag E.S, Sneed K.B, Zhou S-F. (2011). Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chem. Biol. Interact.* **192**:161-176.
- Chitturi S, Farrell C.G. (2008). Hepatotoxic slimming aids and other herbal hepatotoxins. *J Gastroenterol. Hepatol.* **23**:366-373.
- Christodoulakis N.S, Kogia D, Mavroeidi D, Fasseas C. (2010). Anatomical and histochemical investigation of the leaf of *Teucrium polium*, a pharmaceutical sub-shrub of the Geek phryganic formations. *J. Biol. Res. Thessalon.* **14**:199-209.
- Crean D, Godson C. (2015). Specialised lipid mediators and their targets. *Semin. Immunol.* **27**:169-76.

-
- Dai F, Miao Q, Zhou B, Yang L, Liu ZL. (2006). Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sci.* **78**:2488-2493.
- Dehghani F, Khozani T.T, Panjehshahin M.R, Karbalaedoost S. (2005). Effect of *Teucrium polium* on histology and histochemistry in rat stomach. *Ind. J. Gastroenterol.* **24**:126-127.
- Das NU. (2011). Inflammation. *In: Molecular Basis of Health and Disease*. Springer. New Work. pp. 15-100.
- De Marino S, Festa C, Zollo F, Incollingo F, Raimo G, Evangelista Dollah MA, Parhizkar S, Abdul Latiff L, Hafanizam Bin Hassan M. (2012). Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food. Chem.* **133**:21-28.
- Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Wild (*Myrtaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali. pp. 31-35.
- Djeridane A, Yousfi M, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Food Chem.* **97**:654-660.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel J.M, Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol.* **48**:2599-2606.
- Djyh Gb, Adeoti MF, Djaman AJ, Guede Guina F, Sess ED. (2010). Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait total aqueux d'écorces de *Mansonia altissima* (bois bete) chez les souris. *J. Sci. Pharm. Boil.* **11**(2):13-20.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Review* **82**(1):4795.
- Dupont CH. (1970). Détermination de la DL₅₀ chez la souris (méthode de Litchfield et Wilcoxon). *Jof. Pharmacol.* **1**:407-414.
- Dwight JF, BHendry M. (1996). The effects of *tert-butyl* hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective actions of antioxidants. *Anal. Chim. Acta.* **249**:167-181.
- Elmasri Wael A, Hegazy Mohamed-Elamir F, Aziz M, Koksai E, Amor W, Mechref Y, Hamood Abdul N, Cordes David B, Paré Paul W. (2014). Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochem.* **103**:107-113.
- Esmaeili M.A, Yazdanparast R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J. Ethnopharmacol.* **95**:27-30.

- El-Mokasabi F.M. (2014). The state of the art of traditional herbal medicine in the eastern mediterranean coastal region of Libya. *Middle-East J. Sci. Res.* **21**(4):577-579.
- Eschke R, Eickhoff A. (2015). Herbal hepatotoxicity in traditional and modern medicine: actual key issues and new encouraging steps. *Front. Pharmacol.* **6**:72.
- Esmaeili M.A, Yazdanparast R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J. Ethnopharmacol.* **95**:27-30.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual Chim.* 108-115.
- Fertout-Mouri N, Latreche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F, Bassou D. (2014). The effect of altitude and development stage on the synthetic activity of some polyphenols in *Teucrium polium* L. in Tessala mountains (Western Algeria). *Adv. Environ. Biol.* **8**(22): 193-201.
- Fiorentino A, D'Abrosca B, Pacifico S, Scognamiglio M, D'Angelo G, Gallicchio M, Chambery A, Monaco P. (2011). Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against HepG2 human cells of neo-clROSDane diterpenes from *Teucrium polium* L. *Phytochem.* **72**:2037-2044.
- Fontaine E. (2007). Radicaux libres. In: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer-Verlag France. pp. 251-257.
- Formica J.F, Regelson W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**:1061-1080.
- Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, QuintROS G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. (2004). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract. *Pharmacol. Res.* **50**(2):143-149.
- Gharaibeh M, Hamzeh H, Salhab A.S. (1989). Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *J. Ethnopharmacol.* **2**:93-99.
- Goulas V, Gomez-Caravaca AM, Exarchou V, GROSthanassis I P, Segura-CarretROS A, Gutiérrez A.F. (2012). Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *Food Sci. Technol.* **46**:104-109.
- Gouille I.P, Gilbert P, Christian L. (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes: belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Ann. Toxicol. Anal.* **16**(1):55-65.
- Glasauer A, Chandel N.S. (2014). Part of the special issue: metabolism alterations of metabolic pathways as therapeutic targets targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **92**:90-101.
- Gueguen Y, Rouas C, Leblond F.A. (2012). Kidney injury biomarkers. *Nephrol. Ther.* **8**:146-155.

-
- Guétat A, Al-Ghamdi F.A. (2014). Analysis of essential oil of the germander (*Teucrium polium* L.) Aerial parts from the northern region of Saudi Arabia. *Ijabpt* 128-135.
- Haidari F, Keshavarz S.A, Rashidi M.R, Shahi M.M. (2009). Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **45**:285-291.
- Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Dehghan G, Abdollahi M. (2007). *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta. Pharm.* **57**:123-127.
- Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Moradi L, Mehri A, Larijani B, Abdollahi M. (2010). The efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of hyperlipidemia;a systematic review. *Curr. Pharm. Design.* **16**:2935-2947.
- Hellal M. (2007). Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : synthèses et activités anti-cytokine. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg. pp : 15-35.
- Hille R. (2010). EPR studies of xanthine oxidoreductase and other molybdenum-containing hydroxylases. *In: Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR.* Springer Science and Business Media. pp. 91-120.
- Hodge H.C, Sterner J.H. (1943). Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Q.* **10**: 93-98.
- Hu Q.H, Jiao R.Q, Wang X, Lv Y.Z, Kong L.D. (2010). Simiao pill ameliorates urate under excretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice. *J. Ethnopharmacol.* **128**:685-692.
- Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X. (2011). Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 1943-1947.
- Ifeoma O, Oluwakanyinsola S. (2013). Screening of herbal medicines for potential toxicities. *New Insights into Toxicity and Drug Testing* 64-88.
- Ingwale D, Kshirsagar A, Ashok P, Vyawahare N. (2009). Role of antioxidant in the management of hepatic complications. *Pharmacology online* **1**:238-253.
- Iriadam M, Davut M, Haice G, Baba F.S. (2006). Effects of two Turkish medicinal plants *Artemisia herba-alba* and *Teucrium polium* on blood glucose levels and other biochemical parameters in rabbits. *J. Cell. Molecul. Biol.* **5**:19-24.
- Jetanalin P, Lee SJ. (2013). Gout. Chapitre 3. Dans: Challenging Cases in Rheumatology and Diseases of the Immune System, Springer Science+Business Media, pp. 35-53.
- Jose S, Adikay S. (2015). Evaluation of nephroprotective activity of *Ichnocarpus frutescens* *J. Nat. Prod.* **8**: 93-99.

- Kashani A.H, Hoseini E.S, Nikzad H, Aarabi M.H. (2012). Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. *Life Sci.* **9** (1):509-520.
- Kadifkava Panovska T, Kulevanova S, Stefova M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* **55**:207-214.
- Kandouza M, Alachkarb A, Zhangc L, Dekhila H, Chehnab F, Yasmeena A, Al Moustafaa A. (2010). *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. *J Ethnopharmacol.* **129**:410-415.
- Kang JY, Khan MNA, Park NH, Cho JY, Lee MC, Fujii H, Hong YK. (2007). Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *J Ethnopharmacol.* **116**:187-190.
- Kaplowitz N. (2004). Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis.* **38** (Suppl 2): 44-48.
- Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh A.M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **735**:150-168.
- Khader M, Eckl P.M, Bresgen N. (2007). Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. *J. Ethnopharmacol.* **112**:199-202.
- Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L, Madani K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Ind. Crops Prod.* **61**:41-48.
- Kaileh M, Berghe W.V, Boone E, Essawi T, Haegeman G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J. Ethnopharmacol.* **113**:510-516.
- Khleifat K, Shakhanbeh J, Tarawneh K. (2002). The chronic effects of *Teucrium polium* on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat. *Turk. J. Biol.* **26**:65-71.
- Khoshnood-Mansoorkhani M.J, Moein MR, Oveisi N. (2010). Anticonvulsant activity of *Teucrium polium* against seizure induced by PTZ and MES in mice. *IJPR.* **9**(4): 395-401.
- Kim S.Y, Aree M. (2012). Drug induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomol. Ther.* **20**(3):268-272.
- Kitagawa H, Sakamoto H, Tano Y. (2004). Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chem. Pharm. Bull.* **52**:999-1001.
- Kong LD, Cai Y, Huang WW, Cheng CHK, Tan RX. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *J. Ethnopharmacol.* **73**:199-207.

- Kostić Danijela A, Dimitrijević , Danica S, Stojanović Gordana S, Palić Ivan R, Đorđević Aleksandra S, Ickovski , Jovana D. (2015). Xanthine Oxidase: isolation, assays of activity, and Inhibition. *J. Chem.* 10.1155/294858.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* **89**:217-233.
- Kumar S, Kuldeep S, Kalia AN. (2013). Anti-inflammatory activity of herbal plants: a review. *IJAPBC.* **2**(2):272-282.
- Larrey D. (1997). Hepatotoxicity of herbal remedies. *J. Hepatol.* **26**(Suppl. 1):47-51.
- Larrey D, Faure S. (2011). Herbal medicine hepatotoxicity: A new step with development of specific biomarkers. *J. Hepatol.* **54**:599-601.
- Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. (2006). Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *Adv. Access Public.* **3**(3):329-338.
- LeCluyse E.L, Witek R.P, Andersen M.E, Powers M.J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit. Rev. Toxicol.* **42**(6):501-548.
- Lewandowska U, Gorlach S, Owczarek K, Hrabec E, Szewczyk K. (2014). Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **68**:528-540.
- Li H.B, Cheng K.W, Wong C.C, Fan K.W, Chen F, Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* **102**:771-776.
- Li JM, Zhang X, Wang X, Xie YC, Kong LD. (2011). Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **666**:196-204.
- Liu X, Chen R, Shang Y, Jiao B, Huang C. (2008). Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chem. Biol. Interact.* **176**:137-142.
- Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A. (1998). Atlas de poche de pharmacologie. 2nd Ed. Médecine-Sciences: Flammarion. Paris. pp. 32-42.
- Maccarrone M. (2008). Lipoxygenases, Apoptosis, and the Role of Antioxidants. *In: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, Springer Science +Business Media B.V. pp. 321-332.

- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:29-38.
- Malhi H, Guicciardi ME, Gores G.J. (2010). Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol. Rev.* **90**:1165-1194.
- Manna C, D'angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V. (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J. Agric. Food Chem.* **50**:6521-6526.
- Mahmoudi R, Nosratpour S. (2013). *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *IFRJ.* **20**(4):1697-1701.
- Malaviya R, Ansell J, Hall L, Fahmy M, Argentieri RL, Olini JGC, Pereira DW, Sur R, Cavender D. (2006). Targeting cytosolic phospholipase A2 by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice. *Eur. J. Med. Chem.* **539**:195-204.
- Mattéi A, Rucay P, Samuel D, Feray C, Reynes M, Bismuth H. (1995). Liver transplantation for severe acute liver failure after herbal medicine (*Teucrium polium*) administration. *J. Hepatol.* **22**:597.
- Mazokopakis E, Lazaridou S, Tzardi M, Mixaki J, Diamantis, I, Ganotakis E. (2004). Acute cholestatic hepatitis caused by *Teucrium polium* L. *Phytomed.* **11**:83-84.
- Menichini F, Conforti F, Daniela R, Carmen F, Franco P, Senatore F. (2009). Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium essential* oils from Greece. *Food Chem.* **115**:679-686.
- Mo S.F, Zhou F, Lv Y.Z, Hu Q.H, Zhang D.M., Kong L.D. (2007). Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure–activity relationships. *Biol. Pharm. Bull.* **30**:1551-1556.
- Mousavi S. E, Shahriari A, Ahangarpour A, Vatanpour H, Jolodar A. (2012). Effects of *Teucrium polium* Ethyl acetate extract on serum, liver and muscle triglyceride content of sucrose-induced insulin resistance in rat. *IJPR.* **11**(1):347-355.
- Naghbi F, Mosaddegh M, Mohammadi M.S, Ghorbani A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian J. Pharmaceut. Res.* **2**:63-79.
- Nematollahi-Mahani S.N, Rezazadeh-Kermani M, Mehrabani M, Nakhaee N. (2007). Cytotoxic Effects of *Teucrium polium* on Some Established Cell Lines. *Pharmaceut.Biol.* **45**(41):295-298.
- Newcombe DS. (2013). Clinical Aspects of Gout and Associated Disease States. Chapitre 5. Dans: *Gout: Basic Science and Clinical Practice..* Springer-Verlag. London. pp. 91-159.
- Newcombe DS. (2013). Uric Acid Metabolism in Humans. In: *Gout.* Springer-Verlag. London. pp. 69-89.

- Niazmand S, Erfanian Ahmadpoor M, Moosavian M, Derakhshan M. (2008). The positive inotropic and chronotropic effects of *Teucrium Polium L.* extract on guinea pig isolated heart. *Pharmacology online*. **2**: 588-594.
- Oduola T, Adeniyi F, Ogunyemi E, Bello I.S, Idowu T, Subair H. (2007). Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *J. Med. Plants Res.* **1**(1): 001-004.
- Oroian M, Escriche I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* **74**:10-36.
- Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, Takahashi K, Kondo S, Hasegawa M, Komoriya K. (1993). Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* **241**:183-188.
- Ouedraogo Y, Nacoui Ma, Guissou I.P.I, J Guede Guina F. (2001). Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'écorce, de tige et de racine de *Mitragyna inermis* (Willd).O.Ktz (Rubiaceae) .*Pharm. Méd. Trad. Alr.* **1**:13-29.
- Pacifico S, D'Abrosca B , Scognamiglio M , D'Angelo G , Gallicchio M , Galasso S , Monaco P , Antonio F. (2012). NMR-based metabolic profiling and *in vitro* antioxidant and hepatotoxic assessment of partially purified fractions from Golden germander (*Teucrium polium L.*) methanolic extract. *Food Chem.* **135**: 1957-1967.
- Parna Z, Mirzaei A. (2014). Hepatoprotective activity of hydro-alcoholic extracts of Iranian *Teucrium polium*. *World J. Pharm. Res.* **3**(4):1331-1339.
- Parsaee H, Shafiee-Nick R. (2006). Anti-Spasmodic and anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iran Biomed. J.* **10**(3):145-149.
- Perazella M.A. (2009). Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**:1275-1283.
- Pereira-Leite C, Nunes C, Reis S. (2013). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: *in vitro* assessment and relevance for their biological actions. *Prog. Lipid Res.* **52**:571-584.
- Peyrin-Biroulet L, Barraud H, Petit- Laurent F, Ancel D, Watelel J, Chone L, Hudziak H, Bigard M-A, Bronowicki J-P. (2004). Hépatotoxicité de la phytothérapie: données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **28**:540-50.
- Pourmotabbed A, Farshchi A, Ghiasi G, Khatabi M.P. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Teucrium chamaedrys* leaves aqueous extract in male rats. *Iran. J. Basic. Med. Sci.* **13**(3):119-125.

- Pranav V, Vinay J, Love Singh C, Rajkumar S, Harsha M, Megha J. (2013). An update on herb induced chronic kidney diseases. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci.* **2**(3):428-431.
- Proestos C, Sereli D, Komaitis M. (2004). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **95**:44-52.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power. *J. Agric. Food Chem.* **48**:3369-3402.
- Quiney C, Finnegan S, Groeger G, Cotter TG. (2011). Protein oxidation. *In: Post-Translational Modifications in Health and Disease Protein Reviews.* pp. 57-78.
- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. (2013). *Teucrium polium* and kidney. *J. Renal Inj. Prev.* **2**(1):3-4.
- Ramnathan S.P, Slavoff S.A, Grundel E, White K.D, Mazzola E, Koblenz D, Rader J. (2005). Isolation and characterisation of selected Germander diterpenoids from authenticated *Teucrium chamaedrys* and *T. canadense* by HPLC, HPLC-MS and NMR. *Phytochem. Anal.* **17**:243-250.
- Rasekh H.R, Khoshnood-Mansourkhani M.J, Kamalinejad M. (2001). Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia* **72**:937-939.
- Rasekh H.R, Yazdanpanah H, Hosseinzadeh L, Bazmohammadi N, Kamalinejad M. (2005). Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. *IJPR.* **4**: 245-249.
- Reem J.A, Consolato S. (2013). Hepatotoxic botanicals an evidence-based systematic review. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **16**(3):376-404.
- Roleira F.M.F, Tavares-da-Silva E.J, Garrid J, Borges F. (2015). Antioxidants and stroke success and pitfalls. *Translational Stroke Research*, Springer USA. pp. 117-143.
- Saad B, Azaizeh H, Abu-Hijleh G, Said O. (2006). Safety of traditional Arab herbal. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **3**:433-439.
- Sabet Z, Roghani M, Najafi M, Maghsoudi Z. (2013). Antidiabetic effect of *Teucrium polium* aqueous extract in multiple low dose streptozotocin-induced model of type 1 diabetes in rat. *Basic Clin. Pathophysiol.* **1**(2):34-38.
- Saeidnia S, Abdollahi M. (2013). Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **273**:442-455.
- Saghafin E, Mianabadi M, Hadadchi G. (2013). Inhibition effects of *Teucrium polium* extract on gout. *Zahedan. J. Res. Med. Sci.* **15**(11):24-28.
- Sanjoy K.M, Yogeshwer S. (2003). Herbal Medicine: Current Status and the future. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **4**:282-287.

- Sandalio LM, Rodriguez-serrano M, Romero-puertas M, Ddel Rio L. (2013). Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ros) signaling molecules. *In: Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, subcellular biochemistry*. Springer Science Business Media. pp. 233-249.
- Shakhanbeh J, Atrouce O. (2000). *Teucrium polium* Inhibits Nerve Conduction and Carrageenan Induced Inflammation in the Rat Skin. *Turk. J. Med. Sci.* **3**:15-21.
- Starakis I, Siagris D, Leonidou L, Mazokopakis E, Tsamandas A, Karatza C. (2006). Hepatitis caused by the herbal remedy of *Teucrium polium* L. *Eur. J. Gastroenterol. Hep.* **18**:681-683.
- Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **6**(1):168-181.
- Savvidou S, Goulisa J, Giavazisa I, Patsiaourab K, Hytioglouc P, Arvanitakis C. (2007). Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**:507-511.
- Schortgen F. (2005). Drugs and renal toxicity. *Reanimation* **14**: 436-441.
- Selvan K.M, Yoganandam P.G, Gopal V. (2013). Standardiza of traditional medecine need and urgengy. *Inter. J. Phytother.* **3**:5-10.
- Shahraki MR, Arab MR, Mirimokaddam E. (2007). The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, Serum Lipids and Glucose in Diabetic Male Rats. *Iran. Biomed. J.* **11**(1):65-68.
- Shaikh R.U, Pund M., Gacche R.N. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *J Tradit Complement Med* 1-7.
- Sharp P.E, La Regina M.C. (1998). The laboratory rat. CRC pess LLC. USA. pp.20-152.
- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem* **112**:885-888.
- Sher H, Alyemeni N.M. (2011). Evaluation of anti-diabetic activity and toxic potential of *Lycium shawii* in animal models. *J. Med. Plant. Res.* **5** (15): 3387-3395.
- Shi-Fu M, Feng Z, Yao-Zhong LV, Qing-Hua H, Dong-Mei Z, Ling-Dong K. (2007). Hypouricemic Action of Selected Flavonoids in Mice: Structure–Activity Relationships. *Biol. Pharm. Bull.* **30**(8):1551-1556.
- Singh A, Bhat Tej K, Sharma Om P. (2011). Clinical biochemistry of hepatotoxicity. *J. Clinic. Toxicol.* **4**:2-19.

- Skouti E, Kattah A, Alachkar A, Ben Hedda J, Vincieri. (2012). Biochemical, antinociceptive and hepatotoxic effects of the chronic administration of *Teucrium polium* essential oil in rats. *Int. J. Pharm. Sci.* **4**(3):193-197.
- Soetan K.O, Aiyelaagbe O. (2009). The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants - A review. *J. Med. Plants Res.* **3**(5):324-328.
- Staneva S. (1988). Guide Manuel de pharmacologie et toxicologie. Bulgaria Editeur: Medicinal et phys-cultura. Sofia.p. 15.
- Stefkov G, Karapandzova M, Stefova M, Kulevanova S. (2009). Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Maced. pharm.bull.* **55** :(1, 2):33-40.
- Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. (2005). Herbal hepatotoxicity. *J. Hepatol.* **43**:901-910.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommessa J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **113**:1226-1233.
- Takebayashi J, Chen J, Tai A. (2010). A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. *Methods in Molecular Biology*, **594**:287-296.
- Teschke R, Frenzel C, Glass X, Schulze J, Eickhoff A. (2012). Herbal hepatotoxicity: a critical review. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**(3):630–636.
- Tissandie E. (2012). Eude des effets des radionucléides (uranium et césium 137) sur le métabolisme de la vitamine D chez le rat. Thèse de doctorat. pp 30-31.
- Trabsa H, Baghiani A, Boussoulim N, Krache I, Khennouf S, Charef N, Arrar L. (2015). Kinetics of inhibition of xanthine oxidase by *Lycium arabicum* and its protective effect against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *Trop. J. Pharm. Res.* **14**(2):249-256.
- Twaij H.A, Al-Dujaili E.A.S. (2014). Evaluation of the anti-diabetic and anti-ulcer properties of some Jordanian and Iraqi medicinal plants; a screening study. *JMED Research.* 2-10.
- Uduak U, Timbuak A, Musa S.A, Hamman W.O, Asala S, Hambolu J, Anuka J.A. (2013). Acute hepatotoxicity and nephrotoxicity study of orally administered aqueous and ethanolic extracts of *Carica papaya* Seeds in Adult Wistar Rats. *Asian J. Med. Sci.* **5**(3):65-70.
- Vahidi I.R, Dashti-Rahmatabadi M.H, Bagheri S.M. (2010). The effect of *Teucrium polium* boiled extract in diabetic rats. *Iran J. Diabetes Obes.* **2**(2):27-32.
- Van Swelm R. (2013). Urinary protein profiling of drug-induced liver injury: search for biomarkers and mechanisms. Thèse de doctorat. Radboud University Nijmegen, pp 13-31.
- Viala A, Botta A. (2007). Toxicologie. 2nd Ed. Lavoisier. Paris, p: 03.

- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Toma S-Barbera FA, Datta NN, Singanusong R, Chen SS. (2004). Flavonoïde in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr* **59**: 113-122.
- Yu Z, Fong WP, Cheng CHK. (2006). The Dual Actions of Morin (3,5,7, 2,4 Pentahydroxyflavone) as a hypouricemic Agent: uricosuric effect and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**(1):169-175.
- Wasnaa H.M. (2010). Histological and functional study of white male mice testes and kidney treated with *Teucrium polium* aqueous extract. *Eng. Tech. J.* **28**(20):6149- 6153.
- Wiseman H, Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**:17-29.
- Zal MS. F, Vasei MD, Mojgan R, Vessal M. (2001). Hepatotoxicity associated with hypoglycemic effects of *Teucrium polium* in diabetic rats. *Arch. Irr. Med.* **4** (4): 188-192.
- Zhou S, Koha HL, Gao Y, Gong Z, Deon L. E.J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences* **74**: 935-968.
- Zerroug M, Zouaghi M, Boumerfeg S, Baghiani A, Nicklin J , Arrar L. (2011). Antibacterial activity of extracts of *Ajuga iva* and *Teucrium polium*. *Adv. Environ. Biol.* **5**(2):491-495.
- Zendehdel M, Taati M, Jadidoleslami M, Bashiri A. (2011). Evaluation of pharmacological mechanisms of antinociceptive effect of *Teucrium polium* on visceral pain in mice. *Iran. J. Vet. Res.* **12**:292-297.
- Zhu JX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X. (2004). Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J. Ethnopharmacol.* **93**:133-140.
- Zweier J, Hassan L, Talukder M.A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **70**(2):181-190.