

N° d'ordre :

**Université de Saida– Dr. Moulay Tahar
Faculté des Sciences**

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat de 3^{ème} Cycle

Spécialité : Biochimie & Toxicologie Expérimentale

Filière : Biologie

Par :

DELLAOUI Hafsa

Thème :

**Contribution à l'étude des effets de la plante médicinale
Myrtus communis contre la toxicité du Cadmium chez le
rat Wistar. Etudes biochimique et histologique.**



Thèse soutenue le **12 /07 / 2021** devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	Slimani Miloud	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	Berroukche Abdelkrim	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	Bendahmane-Salmi Malika	Prof	Université de Sidi-Bel-Abbès – Dr. Djillali Liabes	Examineur
04	Belmamoum Ahmed-Reda	MCA	Université de Sidi-Bel-Abbès – Dr. Djillali Liabes	Examineur
05	Ammam Abdelkader	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur
06	Hachem Kadda	Prof	Université de Saida- Dr. Moulay Tahar	Examineur

Avant propos

Notre étude a été menée grâce à la contribution de quatre laboratoires. Laboratoire des Ressources Hydriques et Environnement (**LRHE**), département de biologie, Faculté des sciences, université Dr Taher Moulay, Saida sous la direction de Monsieur le Professeur Terras Mohamed. Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacologie et Valorisation Biologique des Plantes (**LBPVBP**), Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Dr Tahar-Moulay, Saida sous la direction de Monsieur le professeur Kahloula Khaled. Laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie, l'université Dr Taher Moulay-Saida. Et laboratoire d'anatomie pathologie, Etablissement Publique Hospitalier (**EPH**) Damarji Youce , Tiaret sous la direction du Dr Bouzouira Bakhta.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux responsables de ces laboratoires pour m'avoir aidé et apporté les moyens humains et matériels me permettant de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Les dosages biochimiques étaient réalisés au laboratoire d'analyses au niveau de l'Etablissement Publique Hospitalier (**EPH**) Madeghri Ahmed, Saida.

Les dosages hormonale et hématologique étaient réalisés au laboratoire d'analyses médicales sous la direction du Dr Haddi Z.

Les dosages du Cadmium tissulaire et l'analyse par CPG étaient réalisés au laboratoire AFAK, Oran.

La détermination de la composition des extraits des feuilles de la plante médicinale *Myrtus communis* par HPLC était réalisée au laboratoire de chimie pharmaceutique, faculté de pharmacie, Université Libre de Bruxelles, en Belgique par le Dr Mme Boufadi Yasmina Mokhtaria.

Remerciement

Après avoir rendu grâce au bon Dieu le tout puissant qui nous a donnés la force de résister et la volonté de travailler et la puissance pour accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de thèse Mr **Berroukche Abdelkrim**, Professeur au département de biologie, faculté de science de la nature et de la vie, Université de Saida, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Permettez-moi de vous remercier, pour la confiance que vous m'avez faite en m'acceptant dans votre équipe. Je garde de vous l'image d'un homme de sciences rigoureux, appliqué et attaché au travail bien fait. Ces qualités couplées à votre simplicité et votre générosité fait de vous un maître respectueux. Tout au long de cette étude, j'ai été permanemment animé par le souci de produire un travail à la hauteur de vos attentes. Malgré vos multiples occupations vous avez été disponible pour moi et mes collègues aussi tout au long de ce travail. Cher maître, vous resterez pour nous une référence et un bel exemple à suivre.

J'exprime ma vive reconnaissance à Mr **Slimani Miloud** Professeur au département de Biologie, faculté de science de la nature et de la vie, Université de Saida, pour m'avoir apporté un appui constant au cours de ce travail. Je le remercie pour ses qualités humaines et de me faire l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à **Bendahmane-Salmi Malika.**, Professeur à l'Université de Sidi-Bel-Abbès – Dr. Djillali Liabes, et à Mr **Belmamoum Ahmed-Reda**, Maitre de conférence à l'Université de Sidi-Bel-Abbès – Dr. Djillali Liabes qui m'ont fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteurs externes. Je leur suis particulièrement reconnaissante de m'accompagner dans cette dernière étape du travail.

De même, je remercie très sincèrement Mr **Ammam Abdelkader** maitre de conférences au département de biologie faculté de science de la nature et de la vie, Université de Saida pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr **Hachem Kadda** Professeur au département de Biologie, faculté de science de la nature et de la vie, Université de Saida, d'avoir pris le temps de lire et de juger mon travail.

Je remercie également Mr **Terras Mohamed.**, Professeur au département de biologie, faculté de science de la nature et de la vie, Université de Saida, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail et qui a toujours fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à tout moment.

Mes remerciements vont vers Mme *Vonteo Lydie.*, chargé de recherche au laboratoire histologie (LABEL HISTOLOGIE), Reims en France, pour tous ses conseils, ses encouragements et son enthousiasme. Ça sera un véritable plaisir de travailler ensemble.

Au terme de plusieurs mois de travaux, je remercie du fond du cœur Mme *Hassani Maya*, Mr *Halla Nourddine* enseignants au département de Biologie et Mr *Nemmiche Said* enseignant au département de Biologie Faculté des Sciences, Université de Tlemcen pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à ce travail. Mes remerciements vont également, à Mr *Lasri Boumediene*, enseignant au département de Biologie, pour son aide.

Je tiens à remercier, enfin, Mes chères collègues *Taibi Narimen*, *Zouidi Mohamed*, *Lansari Wassila*, *Brahmi Mustapha*, *Arabie Wafaa*, *Tires Amina*, *Didaoui Khadidja* des différents laboratoires, qui m'ont aidé au cours des expérimentations.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de ma famille qui a toujours été là pour moi, merci *mes parents* de m'aider pour tout, depuis que je suis née, jusqu'à aujourd'hui ; merci ma sœur *Hafida*, mes frères et particulièrement mon frère *Abdelhakim* pour son soutien et sa présence, il a vraiment su m'accompagner dans cette épreuve, comme il l'a fait à chaque étape de ma vie, je vous embrasse bien fort.

Merci

Valorisation des travaux de recherche

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1. **Analysis of the Chemical Compositions of the Alcoholic Extract and the Essential Oil of the Leaves of the Plant *Myrtus communis* from Blida – Algeria.**

Hafsa Dellaoui and Abdelkrim Berroukche
Acta Scientific Nutritional Health Volume 3 Issue 6 June 2019.

2. **Effects of *Myrtus communis* leaf extracts on CdCl₂-induced metabolic disturbance in male wistar rats.**

Hafsa Dellaoui, Abdelkrim Berroukche, Bakhta Bouzouira, Narimen Taibi, Mohamed Zouidi, Belkacem Belatbi.
South Asian J Exp Biol; 9 (5): 185-192; 2019

PUBLICATION NATIONAL

Etude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de fruit du *Myrtus communis* L.

Hafsa Dellaoui, Abdelkrim Berroukche, Nourddine Halla, Lahcene Boudaoud & Mohamed Terras.
PhytoChem & BioSub Journal Vol. 12(2) 2018.

COMMUNICATIONS

1ST Internaional Seminar New Visions In The Sustainable Amortization Of The Biodiversity of uncertain Areas. Naàma le 07-08 April 2021. « Étude de l'effet protecteur du l'extrait hydro-alcoolique des feuilles myrtus communis sur l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité induit par le cadmium chez les rats ».

2^{ème} Journée d'étude : « les plante au service de l'homme » le 26 avril 2018 « l'étude de l'effet préventif de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Myrtus Communis* L sur l'intoxication du cadmium. Etude histologique. »

Quatrième journée scientifique des géosciences de l'environnement JSGE4 le 26 avril 2018 « composition chimique et activité antibactérienne de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *myrtus communis* L de la région de Blida ».

1^{ère} séminaire national en biologie, biodiversité et gestion des bioressources en zones arides et semi arides (1^{er} SNBN-2017). « Extraction et identification des métabolites secondaires actifs de la plante médicinale (*myrtus communis*). »

1^{ère} séminaire national « phytothérapie et santé », Blida les 16, 17 et 18 mai 2017. « Impacte des méthodes d'extraction sur la composition chimique de la plante *myrtus communis* et la tenure en molécule en molécules bioactives »

VII^{ème} journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie organisées, les 26 et 27 avril 2017. «Characterization of bioactive compounds in south-western Algeria propolis samples. »

3^{ème} journée scientifique des géosciences de l'environnement JSCF₃, Saida le 10 Mars 2016. « Évaluation des fonctions rénales chez des sujets diabétiques dans la ville de Saida ».

Résumé

Le cadmium (Cd), métal lourd, s'accumulant dans les tissus cibles comme le foie, reins, prostate et testicules et induisant des désordres métaboliques, hématologique et histologique. L'atténuation de la toxicité du Cd nécessite le recours à l'usage des plantes aromatiques. L'objectif de cette étude est d'évaluer les éventuels effets préventifs de la plante *Myrtus communis* (*M.c*) contre la toxicité induite par Cd chez le rat. L'activité anti-oxydante contre les radicaux libres et l'identification des composés bioactifs par HPLC ont été réalisés sur l'extrait brut des feuilles *M. communis*. Une étude *in vivo* a été réalisée sur six groupes de rats males (10 / groupe) durant une période de 60 jours. GR1 (témoins), GR2 (CdCl₂ à 18 mg/kg), GR3 [CdCl₂-EHM (1g/kg)], GR4 [CdCl₂-EA (1g/kg)], GR5 (EHM) et GR6 (EA). L'accumulation tissulaire des résidus de Cd a été évaluée par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Le poids des animaux et les paramètres biochimiques (glycémie, l'urémie, créatinémie, transaminases et la formule sanguine) ont été déterminés. Les marqueurs tumoraux, antigène spécifique de la prostate (PSA) et testostérone, ont été dosés par la méthode immuno-enzymatique ELISA. Les rendements d'extraction étaient 31.4 % (EA) et 44.4 % (EHM). L'activité anti-oxydante (IC₅₀) était 0.014 mg/ml (EHM) et 0.45 mg/ml (EA). L'analyse de l'extrait des feuilles par HPLC a permis l'identification de 30 composants avec une prédominance de flavonoïdes (29.5 % génistéine, 16.56 % méthyl-quercétine et 13.26 % kaempférol). Les animaux du GR2 (Cd) ont montré un poids 173.22 ± 1.96 g par rapport aux GR3 (170.80 ± 4,55 g) et GR6 (188.77 ± 4.02 g). La glycémie, urée, créatinine et transaminases étaient élevées dans GR2 par rapport aux témoins et autres groupes traités avec l'extrait des feuilles de *M.c*. Les dosages sériques de PSA et de testostérone ont révélé des concentrations respectives 0.45 et 1.49 ± 0.27 ng/ml chez GR2 (Cd) par rapport aux GR3 et GR4 traités respectivement avec Cd-EHM (0.07 et 0.85 ± 0.1 ng/ml) et Cd-EA (< 0.07 et 0.18 ± 0.07 ng/ml). Le taux d'hémoglobine était 10.3±0.15 g/dl (GR2) par rapport GR3 (12,38±0,30 g/dl). L'analyse par SAA a révélé une accumulation du Cd dans les tissus rénal, hépatique, prostatique et testiculaire (GR2) alors qu'elle était moindre (GR3 et GR4). L'étude anatomopathologique (GR2) a révélé une stéatose hépatique, une disparition des glomérules, une réduction du nombre de tubes séminifères et des spermatozoïdes et des lésions du tissu prostatique. Le traitement des rats, préalablement exposés au Cd, avec les extraits des feuilles de *M.c*. a amélioré l'organisation cellulaire et tissulaire. Les résultats de cette étude suggèrent que, grâce à ces propriétés pharmacologiques, les feuilles de *Myrtus communis* pourraient être utilisées dans la prévention contre les désordres métaboliques et lésions tissulaires induites par les polluants organique et métallique.

Mots clés : Cadmium-Prostate-Testicule-*Myrtus communis*-PSA-Testostérone.

Abstract

Cadmium (Cd), a heavy metal, accumulates in target tissues such as the liver, kidneys, prostate and testes and induces metabolic, hematological and histological disorders. Mitigating the Cd toxicity requires the use of aromatic plants. The objective of this study is to evaluate the possible preventive effects of the plant *Myrtus communis* (*M.c.*) against the Cd toxicity induced in rats. The antioxidant activity against free radicals and the HPLC identification of bioactive compounds were carried out on *M.c.* crude extract. *In vivo* study was performed on six groups of male rats (10 / group) over a period of 60 days. GR1 (controls), GR2 (CdCl₂ at 18 mg / kg), GR3 [CdCl₂-EHM (1 g / kg)], GR4 [CdCl₂-EA (1 g / kg)], GR5 (EHM) and GR6 (EA). Tissue accumulation of Cd residues was assessed by atomic absorption spectrometry (AAS). The weight of the animals and the biochemical parameters (glycemia, uremia, creatinemia, transaminases and blood formula) were determined. The tumor markers, prostate specific antigen (PSA) and testosterone were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. The extraction yields were 31.4 % (EHM) and 44.4% (EA). The antioxidant activity (IC₅₀) was 0.014 mg / ml (EHM) and 0.45 mg / ml (EA). HPLC Analysis of the leaves extract enabled the identification of 30 components with a predominance of flavonoids (29.5% genistein, 16.56% methylquercetin and 13.26% kaempferol). The GR2 (Cd) showed a weight of 173.22 ± 1.96 g compared to the GR3 (170.80 ± 4.55 g) and GR6 (188.77 ± 4.02 g). Blood sugar, urea, creatinine and transaminases were increased in GR2 compared to controls and groups treated with the extract of *M.c.* Serum PSA and testosterone assay revealed respective levels 0.45 and 1.49 ± 0.27 ng / ml in GR2 (Cd) compared to GR3 and GR4 treated with Cd-EHM respectively (0.07 and 0.85 ± 0.1 ng / ml) and Cd -EA (<0.07 and 0.18 ± 0.07 ng / ml). The hemoglobin level was 10.3 ± 0.15 g / dl (GR2) compared to GR3 (12.38 ± 0.30 g / dl). The AAS analysis revealed Cd accumulated in the renal, hepatic, prostatic and testicular tissues (GR2) while it was less (GR3 and GR4). The anatomopathological study (GR2) revealed hepatic steatosis, disappearance of the glomeruli, a reduction in the number of seminiferous tubes and spermatozoa and prostatic lesions. The treatment of animals, previously exposed to Cd, with *M.c.* leaf extracts improved cell and tissue organization. The results of this study suggest that, because of *M.c.* pharmacological properties, the leaves of *Myrtus communis* could be used in the prevention against metabolic disorders and tissue damages induced by organic and metallic pollutants.

Keywords: Cadmium-Prostate-Testicle-Myrtus communis-PSA-Testosterone

الملخص:

الكادميوم (Cd) ، وهو معدن ثقيل ، يتراكم في الأنسجة المستهدفة مثل الكبد والكلى والبروستاتا والخصيتين ويحث على الاضطرابات الأيضية والدموية والنسجية. التخفيف من سمية Cd يتطلب استخدام النباتات العطرية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الآثار الوقائية المحتملة للنبات *Myrtus communis* (M.c.) ضد السمية الناجمة عن Cd المدمجة في الفئران. تم تنفيذ نشاط مضادات الأكسدة ضد الجذور الحرة وتحديد المركبات النشطة بيولوجيا من قبل HPLC على المستخلص من الأوراق الاس. وقد أجريت دراسة في الجسم الحي على ست مجموعات من الفئران الذكور (10 / مجموعة) على مدى فترة 60 يوما) GR1 (الشاهد) ، GR2 (CdCl₂) ، GR3 (CdCl₂-EHM) ، GR4 (CdCl₂-EA) ، GR5 (EHM) و GR6 (EA) تم تقييم تراكم Cd في الأنسجة بواسطة الطيف الامتصاص الذري (AAS). تم تحديد وزن الحيوانات والمتغيرات البيوكيميائية (نسبة السكر في الدم ، اليوريا ، الكرياتينين ، الترانساميناسات وصيغة الدم). تم تحديد علامات الورم ، مستضد معين للبروستات (PSA) وهرمون التستوستيرون ، بواسطة اختبار ELISA المناعي المرتبط بالإنزيم. كانت مردود الاستخلاص 31.4 % (EA) و 44.4 % (EHM). كان نشاط مضادات الأكسدة 0.014 (IC₅₀) ملغ / مل (EHM) و 0.45 ملغ / مل (EA). أتاح تحليل مقتطف الأوراق من HPLC تحديد 30 مكوناً مع غلبة الفلافونويدات (29.5 % جينيسيتين ، 16.56 % ميثيل كيرسيتين و 13.26 % كيمفيرول). وأظهرت حيوانات GR2 (Cd) أن وزنها يبلغ 173.22 ± 1.96 جم مقارنة بـ GR3 (170.80 ± 4.55 جم) و GR6 (188.77 ± 4.02 جم). تم رفع نسبة السكر في الدم واليوريا والكرياتينين والترانساميناس في GR2 مقارنة بالمجموعة الشاهدة والمجموعات الأخرى التي عولجت بمستخلص M.c. كشفت مصل PSA ومقايسات هرمون تستوستيرون عن تركيزات 0.45 و 0.27 ± 1.49 نانوغرام / مل في GR2 (Cd) مقارنة مع GR3 و GR4 المعالجين بـ Cd-EHM على التوالي (0.07 و 0.1 ± 0.85 نانوغرام / مل) و <0.07 Cd-EA و 0.18 ± 0.07 نانوغرام / مل). كان مستوى الهيموغلوبين 10.3 ± 0.15 جم / دل (GR2) مقارنة بـ GR3 (12.38 ± 0.30 جم / دل). وكشف تحليل SAA تراكم الكادميوم في الأنسجة الكلوية والكبدية والبروستاتا والخصية (GR2) بينما كان أقل عند GR3-GR4. كشفت الدراسة التشريحية (GR2) عن تنكس دهني كبدي ، اختفاء الكبيبات ، انخفاض في عدد الأنابيب المنوية والحيوانات المنوية وأفات أنسجة البروستاتا. علاج الفئران ، التي سبق تعرضها Cd ، بأوراق M.c. تحسّن تنظيم الخلايا والأنسجة. تشير نتائج هذه الدراسة إلى أنه بفضل هذه الخصائص الدوائية، يمكن استخدام أوراق *Myrtus communis* في الوقاية من الاضطرابات الأيضية و تلف الأنسجة الناجمة عن الملوثات العضوية والمعدنية.

الكلمات المفتاحية: الكادميوم - البروستاتا - الخصية - PSA - *Myrtus communis* - التستوستيرون

TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	13
Liste des schémas.....	15
Liste des tableaux.....	16
Abréviation.....	17

INTRODUCTION GENERALE

1^{ère} Partie: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I Cadmium

I.Histoire de la découverte	24
I.1 Généralité.	25
I.2 Propriétés physico-chimique de cadmium.....	25
I.3 Toxicité du Cadmium.....	27
I.3.1 Toxicocinétique	27
I.3.1.1 <i>Absorption</i>	27
I.3.1.2 <i>Distribution et Redistribution</i>	28
I.3.1.3 <i>Elimination du cadmium</i>	30
I.3.2 Pathologie liée au cadmium	31
I.4 Cadmium et le stress oxydatif.....	32
Références de chapitre I	34

Chapitre II *Myrtus communis*

II. Myrtus Communis	42
II.1 Histoire de la plante <i>Myrtus communis</i>	42
II.2 Description botanique	42
II.2.1 Dénominations selon la nomenclature.....	43
II.2.2 Caractère botanique de <i>Myrtus communis</i> L.....	43
II.3 Application en médecine traditionnelle	44
II.4 Compositions de <i>myrtus communis</i>	46
II.4.1 Huile essentielle du Myrte et leurs composants.....	46
II.4.2 Composants phénoliques du myrte.....	47
II.4.2.1 <i>Acides phénoliques</i>	47
II.4.2.2 <i>Tanins</i>	48

TABLE DES MATIERES

II.4.2.3 <i>Flavonoïde</i>	48
II.5 Biodisponibilité des poly phénols	49
II.5.1 Absorption.....	49
II.5.2 Métabolisation des polyphénols dans le cycle entéro-hépatique.....	51
II.5.3 Distribution tissulaire.....	52
II.5.4 Excrétion des polyphénols.....	52
II.6 Extraction des polyphénols	53
II.7 Extraction de l'huile essentielle	53
II.8 Analyse chromatographique	54
II.8.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....	54
II.8.2 chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	55
Références de chapitre II	57

2^{ème} Partie: PRATIQUE

PREMIER VOLET	62
III. 1 Matériel végétal	62
III.2 Présentation de la zone d'étude	63
III.3 Identification et authentification de la plante	63
III.4 Etude histologique des structures végétales sécrétrices d'huiles essentielles	64
III 4.1 Etapes de la technique de double coloration.....	65
III.5 Préparation des extraits	66
III.5.1 Étape de séchage.....	66
III.5.2 Extraction.....	67
1.5.2.1 <i>Hydro-distillation</i>	67
1.5.2.2 <i>Macération</i>	68
1.5.2.3 <i>Infusion</i>	68
III.6 Calcul du rendement d'extraction	69
III.7. Analyses phyto-chimiques	69
III.8 Détermination de la composition chimique	71
III.8.1 Analyse des extraits par l'HPLC.....	71
III.8.2 Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM.....	72
III.9 Evaluation de l'activité anti-oxydante	73
DEUXIÈME VOLET	75
III.10 Préparation des animaux	75
III.11 Mode d'alimentation	75
III.12 Préparation du Traitement	76

TABLE DES MATIERES

III.13 Préparation la solution de cadmium	76
III.14 Traitement des rats	77
III.14.1 Administration des solutions préparées aux animaux.....	78
III.14.2 Suivi du poids des rats.....	79
III.14.3 Sacrifice des animaux et préparation des échantillons sanguins et tissulaires.....	79
III.15 Méthodes de dosage	79
III.15.1 Analyses biochimiques.....	79
<i>III.15.1.1 Exploration de la fonction rénale</i>	79
<i>III.15.1.2 Exploration de la fonction hépatique</i>	81
<i>III.15.1.3. Détermination quantitative de glucose</i>	82
III.15.2 Hémogramme, Numération de la formule sanguine(FNS).....	83
III.15.3 Dosage des marqueurs biologiques de la fonction reproductrice mâle.....	85
<i>III.15.3.1 Dosage sérique de l'hormone testostérone</i>	85
<i>III.15.3.2 Dosage sérique du l'antigène spécifique de la prostate (PSA)</i>	85
III.15.4 Dosage du cadmium tissulaire (Pris de document est la propriété du Centre National de Toxicologie).....	85
III.16 Etude histologique des organes	88
Références	94

3^{ème} Partie: RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIER VOLET.	98
IV.1 Histologie de la feuille Myrtus communis	99
IV.2 Screening phyto-chimique et ses principes bioactifs	99
IV.3 Activité anti-oxydante des extraits de feuilles de Myrtus communis	101
IV.4 Chromatographie HPLC et en phase gazeuse CPG	102
IV.5 DISCUSSION	106
Références	109
IV.6 Etude physiologique	112
IV.6.1 Variation du poids corporel.....	112
IV.6.2 Variation de poids des organes.....	114
IV.6.3 Observation macroscopique.....	115
IV.7 Dosage biochimique	116
IV.7.1 Evaluation du taux de glycémie.....	116
IV.7.2 Effets du Cadmium sur la fonction rénale et l'action protectrice des extraits.....	116
IV.7.3 Effets du Cadmium sur la fonction hépatique.....	118
IV.7.4 Dosage sérique de la testostérone et le (PSA).....	119
IV.8 Effets du Cd sur les paramètres hématologiques.....	120

TABLE DES MATIERES

IV.8.1 Paramètres de la lignée érythrocytaire.....	120
IV.8.2 Paramètres de la ligne leucocytaire.....	120
IV.9 Dosage du cadmium tissulaire.....	123
IV.10 Histologie.....	124
IV.10.1 Etude macroscopique.....	124
IV.10.2 Etude microscopique.....	126
IV.10.2.1 Effets du traitement sur les tissus régulateurs de métabolisme.....	126
A. Tissu hépatique.....	126
B. Tissu rénale.....	128
IV.10.2.2 Effets du traitement sur la voie génitale masculine.....	130
A. Tissu testiculaire.....	130
B. Tissu prostatique.....	132
IV.11 DISCUSSION.....	134
Références.....	144

CONCLUSION GENERALE

Annexe

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1 : Difformité osseuses constatées chez les japonaises.....	24
Figure I.2 : Cadmium métal, CAREX canada, 2009.....	26
Figure I.3 : Effet biologique des doses des xénobiotique.....	27

Chapitre II

Figure II.1 : Structure de quelques composants monoterpéniques.....	46
Figure II.2 : Exemples d'acides phénoliques.....	47
Figure II.3 : Structure générale de tanin.....	48
Figure II.4 : Structure de base des flavonoïdes.....	49
Figure II.5 : Schéma d'absorption certains acides phénolique.....	50
Figure II.6 : Schéma générale de la biodisponibilité des polyphénols.....	53
Figure II.7 : Schéma simplifié la fonction de (HPLC).....	55
Figure II.8 : Schéma simplifié la chromatographie en phase gazeuse (CPG)	56

Chapitre III

Figure III.1 : Rameaux des feuilles <i>Myrtus communis</i>	62
Figure.III.2 : Présentation géographique de la région de la récolte de la plante.....	63
Figure III.3 : Plante <i>Myrtus communis</i>	64
Figure III.4 : Etape de broyage.....	67
Figure III.5 : Montage de l'hydro-distillation.....	68
Figure III.6 : Réduction du radicale libre DPPH.....	74
Figure III.7 : Rats dans les cages dans l'animalerie de la faculté Ain Hdjar, Saida.....	76
Figure III.8 : Administration par gavage des extraits.....	78
Figure III.9 : Hémogramme modèle Bimex diagnostique BD 380.....	85
Figure III.10 : Courbe étalonnage du cadmium tissulaire.....	88
Figure III.11 : Mettre des échantillons dans les cassettes.....	89
Figure III.12 : Automate d'hydratation, <i>Leica TP1020</i>	90
Figure III.13 : Panie des cassettes.....	90
Figure III.14 : Station d'enrobage, la marque « <i>Leica</i> , EG 1160 ».....	91
Figure III.15 : Microtome à paraffine, « <i>Leica</i> RM 2125 ».....	91
Figure III.16 : Bain marie, « <i>Leica</i> . HT1210.....	92

Chapitre IV

Figure IV.1 : Micro-photo des coupes anatomique et histologique de la feuille de (MC).....	99
Figure IV.2 :Taux d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'EHM.....	101

Figure IV.3 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'EA.....	102
Figure IV.4 : Chromatographie GC/SM de l'huile essentielle de MC.....	105
Figure IV.5 : Effet des traitements (Cd, EHM et EA) sur l'évaluation du (PC) des rats.....	113
Figure IV.6 : Effet des traitements (Cd, EHM et EA) sur l'évolution du gain de poids des rat...113	
Figure IV.7 : Pâleur des yeux chez le rat traité avec le Cd (18mg/kg/j).....	115
Figure IV.8 : Lésions tissulaires de la partie caudale (queue).....	115
Figure IV.9 :Variation de la glycémie chez les rats traités avec Cd (18mg/kg/j), EHM ou EA feuilles MC.....	116
Figure IV.10 : Variation du niveau sérique de l'urémie	117
Figure IV.11 : Variation de taux sérique de la créatinine.....	117
Figure IV.12 : Variation du taux sérique de l'ASAT	118
Figure IV.13 : Variation de taux sérique de l'ALAT	118
Figure IV.14 :Observation microscopique des coupes histologiques transversales du foie des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).....	127
Figure IV.15 : Observation microscopique des coupes histologique transversale du rein des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).....	129
Figure IV.16 : Observation microscopique des coupes histologiques transversales du testicule des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).....	131
Figure IV.17 : Observation microscopique des coupes histologiques transversales du testicule des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).....	133

Liste des Schémas

Chapitre I

Schéma I.4 : Impact du Cd sur ses cibles cellulaire conduit à la production des ERO.....33

Chapitre III

Schéma III.1 : Etapes de la technique de la double coloration.....66

Schéma III.2 : Organigramme récapitulant le protocole expérimental.....77

Chapitre IV

Schéma IV.1 : Design de l'étude des paramètres chimiques des feuilles *Myrtus communis*.....98

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 : Propriété physico-chimique du Cadmium.....	26
---	----

Chapitre II

Tableau II.1 : Position systématique de l'espèce <i>Myrtus communis</i>	43
Tableau II.2 : Application différent partie de <i>Myrtus communis</i>	45
Tableau II.3 : Principaux enzymes survenant sur les flavonoïdes.....	51
Tableau II.4 : Métabolisation du flavonoïde.....	51

Chapitre III

Tableau III.1 : Coordonnés géographique locales du site de récolte (Blida, Algérie)...	63
Tableau III.2 : Composition chimique et organique du régime d'entretien.....	75
Tableau III.3 : Répartition et traitement des groupes.....	78
Tableau III.4 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de la créatinémie.....	79
Tableau III.5 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (Créatinine).....	80
Tableau III.6 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de l'urémie.....	80
Tableau III.7 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (Urée).....	81
Tableau III.8 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de TGO et TGP	82
Tableau III.9 : Protocole de préparation des échantillons testés (TGP & TGP).....	82
Tableau III.10 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de la glycémie.....	83
Tableau III.11 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (glucose).....	83
Tableau III.12 : Gamme étalonnage de cadmium.....	87
Tableau III.13 : Temps déshydratation, éclaircissement et imprégnation.....	90
Tableau III.14 : Batterie de déparaffinage et de réhydratation des coupes.....	93
Tableau III.15 : Batterie de coloration hématoxyline –éosine.....	93

Chapitre IV

Tableau IV.1 : Screening phytochimique de la poudre des feuilles de MC.....	100
Tableau IV.2 : Composition de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles <i>MC</i> déterminée par HPLC.....	103
Tableau IV.3 : Classes des composés des feuilles de <i>Myrtus communis</i>	103
Tableau IV.4 : Composition d'HE des feuilles <i>Myrtus communis</i> par GC / SM.....	105

Tableau IV.5 : Evolution du poids pondérale des rats.....	114
Tableau IV.6 : Effet des traitements (Cd, EHM et EA) sur les poids des organes.....	114
Tableau IV.7 : Variation des paramètres biochimique chez tous les groupes des rats..	119
Tableau IV.8 : Variation des taux de testostérone et le PSA chez les rats.....	120
Tableau IV.9 : Variation du nombre des globules rouges, des globules blancs, du taux d'hémoglobine, d'hématocrite, du volume globulaire moyenne (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), plaquettes et les leucocytaires chez les rats témoins, les traités par EHM ou EA, les contaminés au cadmium et les contaminés au cadmium et traités par EHM ou EA.....	122
Tableau IV.10 : Valeurs de taux du cadmium chez les rats traités.....	123
Tableau IV.11 : Etude macroscopique des tissus des rats.....	125

ABREVIATION

ADN : Acide désoxyribonucléique

BNEDR : Bureau National des Etudes pour le Développement Rural.

CAT: chloramphénicol acétyltransférase

DO : Densité optique.

Cd : Cadmium

CdCl₂ : Chlorure de cadmium

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

COMT : Catéchol-O méthyltransférase

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie

DMT1 : Divalent metal transporter 1

DPPH : diphénylpicryl-hydrazyl

EA : Extrait aqueux

ED : Eau distillée

EHM : Extrait hydro-méthanolique

ERO: Espèce réactives de l'oxygène

Fe Cl₃ : Chlorure ferrique.

g : Gramme.

GPx: glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

h : Heure

HCl : Acide chlorhydrique.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hg : Mercure

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

H₂SO₄: Acide sulfurique

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC₅₀ : Concertation inhibition à 50%

Kg : kilogramme

KOH : Hydroxyde de potassium.

LPH : Lactate phloridzine hydrolase

M : Molarité

MCT : Monocarboxylic acide transporteur

Mg : Magnésium

mg : Milligramme.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

MT : Métalthionine

N : Normalité

NaOH : Hydroxyde de sodium.

nm : Nanomètre.

PAM : Plante aromatique et médicinale

Pb : Plomb

pH: potentiel hydrogène

PSA : Prostate Specific Antigen

RBP : Rétino-binding protein

Rdt : Rendement

SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique

SGLT1 : Sodium-glucose dépendant

SOD: superoxydes dismutases

SULT : Sulfotransférase

TGO : glutamate-oxaloacetate-
transaminase

TGP : glutamate- pyruvate-
transaminase.

UGTs : Uridine-5'-diphosphate
glucuronosyltransférases

Zn : Zinc

% : *Pourcentage*

°C : *Degré Celsius*

µg : *Microgramme.*

µl : *Microlitre.*

INTRODUCTION

Les développements industriels, agricoles et urbains, qui venant s'ajoutant aux activités humaines, entraînent une importante augmentation des métaux lourds dans l'environnement et l'émergence de niveaux très élevés de pollution (sol, air et eau). Ces métaux lourds ne sont pas biodégradables. Bien que certains métaux soient essentiels, en tant qu'oligo-éléments, pour le développement et la croissance des organismes vivants, comme le Magnésium (Mg) et le Zinc (Zn), d'autres sont toxiques, même à faible dose comme le Mercure (Hg), le Plomb (Pb) et le Cadmium(Cd).

Les métaux lourds ne présentent pas les mêmes degrés de risque de toxicité, ou n'ont pas les mêmes effets sur les organismes vivants, à cause de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques différentes. La toxicité des métaux lourds et son impact sur l'environnement sont très variables (Mrabent, 2015).

Parmi ces métaux, on cite le cas du Cadmium (Cd). L'homme et les animaux sont exposés, directement ou indirectement, à ce métal par différentes voies d'administration. Les voies d'exposition au Cd les plus fréquentes sont la voie d'absorption d'aliments contaminés (fruits de mer, abats, céréales, riz, blé, champignons, choux....) et la voie par inhalation tel que l'exposition à la fumée du tabac ou tabagisme (Nawrot et *al.*, 2008) et donc susceptible de contaminer tous les êtres vivante. Le risque de toxicité chronique par le cadmium, chez l'homme, est omniprésent. La toxicité du Cadmium a des effets néfastes multiples et complexes sur la santé de l'homme et des animaux. Elle peut causer des dommages intracellulaires associés à l'altération des molécules biologiques, à savoir la dénaturation de certaines protéines, la peroxydation lipidique, formation de radicaux libres, clivage de la molécule d'ADN et sur expression de nombreux gènes (Mishra et *al.*,2009; Vandjiguiba et *al.*,2019). La toxicité chronique, par Cd, peut induire de nombreux troubles et désordres à signes apparents tels que des dents jaunes, douleurs et perturbations des fonctions rénales et hépatiques, atteintes osseuses et cancérogénèse (tumeurs des testicules, des reins et prostate)(Fujishiro et *al.*,2012).

Aujourd'hui, la médecine traditionnelle ou la santé par le naturel, voire la phytothérapie est focalisée sur l'exploration de nouveaux procédés pharmaceutiques tout en ayant recours à l'usage des plantes aromatiques et médicinales. Ces plantes pourront constituer une source de nouvelles molécules dotées de pouvoir pharmacologique et présentant différentes activités biologiques anti-oxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire et anti tumorale. L'industrie pharmaceutique produit encore, à nos jours, de fortes proportions de médicaments à base végétale (Bahorun et *al.*,2005).

Avec l'appui des anciennes études de grande envergure auxquelles viennent s'ajouter les développements exponentiels des nouvelles biotechnologies végétales, l'aromathérapie venait de naître et s'est alliée aux progrès de la science permettant ainsi de faire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) d'authentiques médicaments qui sont considérés comme de véritables sources de nouvelles molécules bioactives et caractérisées par des propriétés pharmacologiques à vertus thérapeutiques (Škerget et al., 2005; Boukhatem et al., 2010).

De nombreuses plantes, alimentaires ou médicinales, possèdent un pouvoir antioxydant grâce à leurs constituants. L'apport régulier en phyto-nutriments possédant des capacités antioxydantes significatives est associé à une faible prévalence de maladies liées au stress oxydatif (cancers, maladies cardiovasculaires et athérosclérose) (Bravo, 1998) et à un faible taux de mortalité (Anderson, 2001).

L'Algérie, par sa localisation géographique convoitée, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques (Chouikh et Selmane, 2014). La flore Méditerranéenne, notamment l'Algérienne, est fortement riche en plantes médicinales appartenant à des familles variées. Notre choix s'est porté particulièrement sur une espèce de la famille des Myrtacées (*Myrtus communis*).

Myrtus communis est une plante médicinale qui pousse à l'état spontané dans les plaines de Chréa de la région de Blida. Cette espèce est connue par ses propriétés antiseptiques, antiparasitaires, antimicrobiennes, désinfectantes et astringentes (diarrhées, dysenterie) ainsi par leur effet hypoglycémique et hypocholestérolémiant. Elle est également reconnue dans le traitement des maladies des voies urinaires et respiratoires (Mimica-Dukic et al., 2010 ; Baba Aissa, 1999). A toutes ces activités protectrices, venaient s'ajouter les propriétés anti-génotoxiques (Gultepe et al., 2020).

Notre travail de thèse a été divisée en trois parties; à savoir ;

- Une partie bibliographique approfondie sera consacrée d'une part à la présentation du métal Cadmium, sa toxicité et son comportement dans l'environnement vis-à-vis des systèmes biologiques, et d'une autre part la présentation de la plante aromatique et médicinale qui est *Myrtus communis* . (son appartenance à la famille des myrtacées, sa classification botanique, son intérêt biologique, ses métabolites secondaires et propriétés pharmacologiques). La fin de cette partie sera renforcée par le récit de quelques méthodes d'extraction et d'analyse quantitative et qualitative des polyphénols
- Une partie expérimentale décrivant le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude portant sur deux volets :

- Volet I : Etudes qualitative et quantitative des extraits des feuilles de *Myrtus communis*
 - Volet II : Etude *in vivo* pour investiguer l'effet préventif probable des extraits des feuilles *myrtus communis* contre les effets délétère du Cd sur les différents paramètres ainsi que sur l'architecture des tissus hépato-rénales, testicule et prostate.
- Une partie englobant les résultats, leur interprétation et ainsi leur comparaison avec d'autres études nationale et internationale mentionnées dans la littérature.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

I. Histoire de la découverte

Le cadmium (Cd) en grec qui s'appel Kadmeia (Amr et *al*, 2009), il fut découvert en 1808 par Magnus Martin af Pontin, mais c'est en 1817 qu'il fut isolé indépendamment en Allemagne par quatre chimistes, Friedrich Strohmeyer, Karl S.L. Hermann, M. Karsten et W. Meissner. (Waalkes, 2000).

Le plus important d'entre eux c'est Friedrich Strohmeyer, inspecteur principal des pharmacies de Hanovre, élève de Louis Nicolas Vauquelin, remarqua que certains carbonates de zinc étaient plus ou moins jaunâtres. Craignant la présence d'arsenic (Ciarrocca et al 2013), il en fit l'analyse et isola un métal dont les propriétés étaient assez voisines de celles du zinc et auquel il donna le nom de cadmium, dérivé du grec et du latin *cadmia*, Celui-ci désignait, d'une part, le minerai de zinc oxydé donnant naissance au nom « calamine » (de la mine de zinc de *Kadmos*, près de Thèbes) et, d'autre part, sous la forme *cadmia fornacum*, les dépôts de poussières et d'oxydes métalliques (les cadmies) formés sur les parois des fours métallurgiques. (« Cadmium, 2017 »).

Au début du siècle, la demande de cadmium était minime, et on ne faisait aucune tentative pour le récupérer au cours de la métallurgie du zinc (Matias, 2008). Par conséquent, le cadmium contaminait les objets en zinc ou était rejeté dans l'environnement au cours du grillage du minerai de zinc (Matias, 2008). Il a fallu attendre 1917 pour ce prononcer sur la causalité du cadmium dans la maladie d'itai itai (maladie osseuse endémique) figure I.1 décrite au japon dans une région contaminée par le cadmium était rejeté dans la rivière Jinzu comme sous-produit (Ferramola et *al*, 2012).



Figure I.1: Difformités osseuses constatées chez les japonais souffrant de la maladie Itai-Itai. Photo prise en 1968 par Ishizaki In Rousselet , 2007.

À partir de la fin des années 1940, ils ont fait des études destinées à élucider le rôle du cadmium dans la maladie Itai-Itai (signifiant littéralement: «aie, aie»). Les symptômes caractéristiques de cette maladie sont l'ostéomalacie, l'ostéoporose et une dysfonction rénale. Il a été détecté de fortes concentrations de cadmium et de zinc dans les sols et les eaux de cette région contaminée, La concentration de cadmium dans le riz et l'excrétion de cadmium étaient plus élevées dans les régions polluées (Yamagata et Shigematsu, 1970; Kjellström, 1985), Le contenu en cadmium présent dans le squelette des individus affectés était beaucoup plus important que chez les individus non exposés (pour les hommes 2.7 g/g compare à 0.3g/g et pour les femmes 1.8 g/g compare à 0.6 g/g) (Jarup, 2002).

I.1 Généralité

Le cadmium est un polluant lié à plusieurs processus industriels modernes, c'est l'un des métaux les plus toxiques non essentiel dans l'environnement, en plus il se produit sur la région agricole comme contaminant des engrais phosphoreux (Prankel et *al.*, 2004). Est connu pour de nombreux effets indésirables sur la santé des animaux et les êtres humains (Thompson, *et al.*, 2008) ; chez les mammifères il s'accumule principalement dans le foie et les reins qui sont deux organes cibles en lesquels la toxicité systémique de ce métal est exprimée.(Stosic et *al.*,2010).

I.2 Propriétés physico-chimique de cadmium

Le cadmium est un élément relativement rare à l'état natif. Il est présent dans la croûte terrestre à des concentrations d'environ 1 à 2 ppm, où il est souvent associé au zinc et au plomb (Bissou et *al.*, 2011).. Il est également obtenu comme sous-produit de raffinage du plomb et du cuivre (Pichard, 2005). Le cadmium est rencontré sous forme métallique ou de sels (oxyde, chlorure, sulfure. . .), Les sels de cadmium ont une très grande stabilité thermique et chimique (Andujar et *al.* , 2010).

Le cadmium est un métal blanc et bleuâtre, mou, malléable, ductile et résistant à la corrosion et argenté avec des teintes de bleu appartenant à la famille des métaux de transition, figure 02. Le cadmium élémentaire a un numéro atomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g/mol. Son point de fusion est d'environ 321 C° et son point d'ébullition d'environ 765 C°,se transformant rapidement dans l'air sous forme d'un oxyde métallique (Andujar et *al.* , 2010). Il est insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques qui a été résumé dans le tableau 01 suivant :



Figure I.2 : Cadmium métal, Monographie du CIRC. Vol. 58 (1993)

Tableau I.1 : Propriété physicochimique de Cadmium (Anses,2012).

Nom	Cadmium	Chlorure de Cadmium	Oxyde de Cadmium	Sulfate de Cadmium	Sulfure de Cadmium	Nitrate de Cadmium
Forme physique	Solide blanc	Solide	Solide	Solide	Solide	Solide
Densité	8,65	4,05	8,15	4,69	4,82	3,6
Masse molaire (g/mol)	112,41	183,32	128,41	208,47	144,47	236,42
Point d'ébullition (C°)	765	960-964	Sublimation à 1559	ND	Sublimation à 960	ND
Point de la fusion	321	568	ND	1000	ND	360
Pression de vapeur	1 mm Hg à 394 C°	10 mm Hg à 656 C°; 40mm Hg à 736 C°; 760mm Hg à 967 C°	ND	ND	ND	ND
Solubilité dans l'eau	Insoluble	Soluble (1,27 kg/l à 25C°)	Insoluble	Soluble (767 g/l à 25C°)	Quasi insoluble (1,3 mg/l à 25 C°)	Soluble (1,56 kg/l à 25C°)
Solubilité dans d'autres solvants	Acide NH ₂ NO ₂ H ₂ SO ₄ chaud	Acétone Légèrement dans MeOH et EtOH	Acides dilués	Insoluble dans l'acool. Acétone ammoniac	Acides minéraux concentré ou dilués à chaud	Très soluble Acools acétone Acétate D'éthyle

* Note : ces composés existent aussi sous forme d'hydrates (un ou plusieurs hydrates) pour lesquelles certaines propriétés différent comme la densité ou le point de fusion. Les données indiquées sont celles du composé anhydre. ND : Données non disponibles dans les bases de recherches.

I.3 Toxicité du cadmium :

N'importe quel élément inutile, utile ou indispensable, peut occasionner des difficultés du métabolisme chez l'ensemble des organismes vivants lorsqu'il est absorbé en trop grande quantité par rapport à la normale (Malayeri, B. E. 1995), La figure I.3 résume la relation entre la concentration d'un xénobiotique et son effet biologique (croissance ou biomasse de produit).

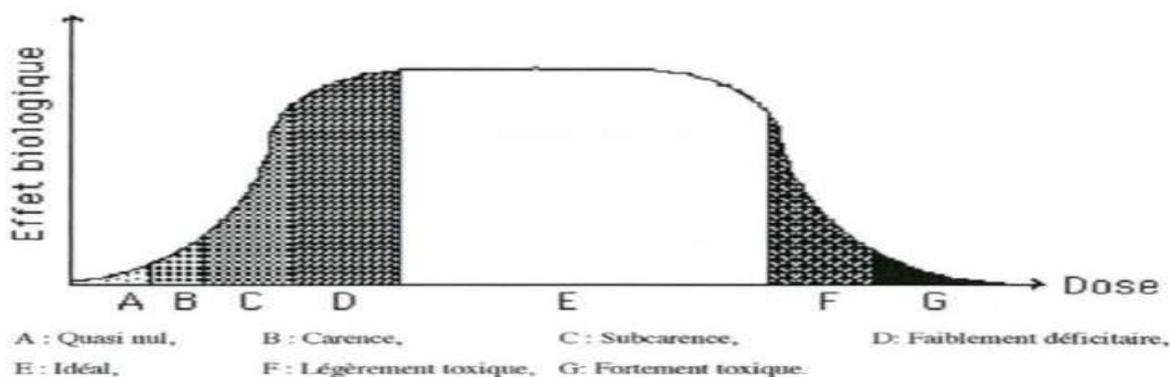


Figure I.3: Effet biologique des doses des xénobiotique (Malayeri, B. E. 1995)

I.3.1 Toxicocinétique

Avant d'étudier la présence de cadmium dans les organismes vivants, il faut comprendre comment ce métal peut être absorbé par les organismes et comment il y est stocké. En effet, le cadmium peut être assimilé avec de la nourriture contaminée, et s'accumule dans différents organes où ils deviennent des « bombes à retardement », Le cadmium est un métal n'ayant aucun rôle biologique dans les cellules animales (Rousselet, 2007).

I.3.1.1 Absorption

Le premier d'exposition environnementale au Cd passe par la consommation d'aliment (l'eau potable contaminé, végétaux à feuillage, céréales, poissons et des abats d'animaux, etc....) L'absorption par voie digestive est faible environ 5 % et est facilitée par la carence martiale (Andersen, 2004) et par des régimes carencés en fer, en calcium, en zinc (Olsson, 2002) et diminuée par des régimes riches en fibres. (Andersen, 2004). Et le deuxième d'exposition par inhalation (en industrie et tabagisme). Le cadmium est alors plus assimilable sous forme ionique libre que sous forme complexée avec des chlorures ou des molécules organiques.

I.1.3.2 Distribution et Redistribution

Le cadmium ne possède aucune voie d'entrée ou de sortie qui lui soit spécifique. Il agit donc par *mimétisme de métaux physiologiques* ou d'autres molécules afin de traverser les membranes cellulaires et ce par divers mécanismes dépendant du type cellulaire et du tissu biologique. Il y a des systèmes d'Entrée-Sortie cellulaires du cadmium par des protéines de transporteurs (Rousselet, 2007).

- ❖ *Divalent Metal Transporter 1* : (DMT1) est une protéine de la membrane plasmique permettant l'import de fer non hémérique à travers certaines barrières biologiques comme lors de l'absorption intestinale du fer à la membrane apicale des entérocytes du duodénum (Fleming MO et al., 1997 ; Gunshin H, et al 1997). D'autres iso-formes de DMT1 prennent en charge le transport du fer à travers la membrane endosomiale après sa libération du complexe transferrine-récepteur de la transferrine par acidification. Les propriétés de DMT1 en font un transporteur assez générique de cations métalliques divalents en association avec un symport de protons (Gunshin et al., 1997). Ainsi, ***DMT1 est impliquée dans l'absorption du cadmium intestinal*** (Tallkvist et al., 2001). Alors, l'augmentation de la traduction de DMT1 en cas de carence en fer permet une augmentation de la capacité d'absorption en fer et par la même occasion en cadmium comme des femmes enceintes ou des patients animés aient une absorption de Cadmium augmentée. (Satarug et al., 2003);(Jarup et al 2009).
- ❖ *Les transporteurs du zinc* : Zn et Cd sont des éléments dans la même colonne du tableau périodique, ce qui confère au cadmium certaines propriétés physico-chimiques semblables à celles du zinc. Cependant le zinc, contrairement au cadmium, est un métal indispensable en Biologie jouant des rôles structuraux, catalytiques et Co-catalytiques (Rousselet E., 2007). Le mimétisme du zinc par le cadmium a des conséquences sur la perturbation de l'homéostasie du zinc. Plusieurs études mettent en évidence le rôle protecteur du zinc vis-à-vis de la toxicité du cadmium (Rousselet, 2007).

1- L'IARC a fait des études chez des rats et souris exposées à des faibles quantités de Cd par différentes voies avec un régime alimentaire contrôlé en zinc, L'IARC ont été observées comme ceux-ci :

- *Des tumeurs malignes du poumon ont été observées chez des rats exposés à de faibles quantités de cadmium pendant des expositions courtes.*
- *Des tumeurs locales ont été observées chez des rats et souris exposés au cadmium par injection*
- *l'exposition orale au cadmium est associée à des tumeurs de la prostate, des testicules, et du système hématopoïétique.*

Le régime alimentaire contenant en zinc inhiberait les effets leucémiques du cadmium par voie orale (Waalkes, 2003).

2- Autre étude d'effet l'interaction cadmium-zinc au niveau de sérum PSA et l'étude histologique de prostate des rats mâles qui a été réalisée par Berroukech et al., 2017, on a observé que le zinc protège la glande de prostate ou bien la présence de zinc empêche la fixation de cadmium et inhibe le stress oxydatif.

Enfin, le zinc permet de réduire l'absorption du cadmium par compétition avec des sites d'entrée de ce toxique.

❖ *les canaux calciques*: Les canaux calciques, notamment voltage dépendants, sont hautement sélectifs pour le calcium; cependant le transport d'autres cations divalents comme le cadmium est possible dans certaines conditions. Les cellules épithéliales du tubule distal (Friedman et Gesek, 1994) et les cellules médullo-surrénales impliquées dans la libération de catécholamines (Kandasamy et al., 2008). Bien que les flux calciques à travers les canaux voltage-dépendants soient inhibés par le cadmium (Järup et Åkesson, 2009.), il n'en demeure pas moins que le cadmium pénètre quand même à travers ces canaux calciques dans certains cas engendrant ainsi une toxicité (Hinkle et al., 1987). Les canaux qui semblent impliqués dans l'entrée de cadmium.

cependant le cadmium inhibe la réabsorption de calcium probablement en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie ainsi qu'à la formation de caillots (Barbier et al., 2004).

- ❖ *La toxicité importante du cadmium est celle d'interférer avec des métaux essentiels comme le fer, le zinc ou le calcium dont les homéostasies sont finement ajustées par les cellules.*
 - ❖ *Une diète ou les apports en fer, zinc et calcium sont faibles favorise l'ingestion et l'accumulation du cadmium dans le duodénum.*
- (Reeves et al., 2008).

➤ Après la phase d'absorption, le cadmium présent dans le compartiment sanguin est principalement (environ 95%) intra-érythrocytaire lié à l'hémoglobine (Alfvén et al., 2000 ; Friberg et al., 2019) par mécanisme du mimétisme.

- le cadmium sous forme de complexe avec diverses protéines comme l'albumine, aboutit rapidement au foie. C'est un organe où se produisent de nombreuses réactions permettant la détoxification et en particulier le lieu de conjugaison du toxique au glutathion (GSH). Les cellules hépatiques sont très riches en GSH et en métallothionéines (MT). Ces deux types de molécules possèdent une forte affinité pour le cadmium et forment des complexes Cd-GSH, qui peuvent être excrétés dans la bile, et des complexes Cd-MT qui restent stockés dans le foie ou sont dirigés (redistribué) dans tous les organes, notamment dans les reins (Klaassen et al., 1999).

métallothionéines (MT) qui se lient au cadmium et abaissent ainsi les concentrations des ions libres de cadmium (ATSDR, 2013).

métallothionéines (MT) qui sont des protéines de faible poids moléculaire (6000 daltons) riches en cystéine (30% de cystéines, pas d'acide amine aromatique, ni d'histidine) ce qui leur permet de complexer les cations métalliques par les groupements thiols et ainsi d'avoir une teneur importante en métal. Les métallothionéines diminuent ainsi la disponibilité du cadmium dans la cellule ce qui réduit sa toxicité (Beattie et al., 2005). Les MT sont synthétisées dans le foie, les reins et également d'autres organes, dont les intestins et les poumons (OEHHA, 2006).

1.1.3.3 Elimination du cadmium :

Dans les reins, la faible dimension du complexe Cd-MT facilite son passage à travers les glomérules vers les tubules rénaux où il pénètre facilement par pinocytose dans les cellules tubulaires en se liant notamment à la mégaline et à la cubiline apicales. Les vacuoles de pinocytose fusionnent avec les lysosomes dont les enzymes dégradent les MT et libèrent ainsi le cadmium (Murakami, M et al., 1983). Le cadmium se recombine alors avec les MT synthétisées par les cellules tubulaires et peut s'accumuler dans les reins, sous forme complexée non toxique, durant plusieurs dizaines d'années (OEHHA, 2006). Dans les cellules tubulaires, la MT est alors détruite par des enzymes lysosomales, libérant ainsi des ions Cd²⁺ dans le cytoplasme. Le Cd²⁺ cytoplasmique est alors à nouveau lié à une nouvelle MT synthétisée dans le cytoplasme.

Lorsque les capacités de production de MT sont dépassées, le cadmium exerce alors des effets toxiques tubulaires rénaux, expliquant pourquoi la concentration rénale de cadmium est toujours plus importante dans le cortex rénal que dans la médullaire rénale (Andujar et al., 2010). En effet, la demi-vie biologique du cadmium correspondant à la durée d'élimination de la moitié de la quantité de cadmium présent dans l'organisme, est particulièrement longue, puisqu'elle est d'environ 20 à 40 ans (Wang et al., 2003 ; Andujar et al., 2010). Environ la moitié du cadmium de l'organisme est localisé dans le foie et les reins.

L'excrétion du cadmium est faible et très lente, elle est essentiellement urinaire. L'apparition d'une atteinte néphrologique altère les capacités d'élimination rénale du cadmium. Une très faible partie du cadmium est excrétée par voie biliaire (après conjugaison avec du glutathion), salivaire, fécale et sudorale (Andujar et *al.*, 2010).

I.3.2 Pathologie lient au cadmium

Comme il a été vu précédemment, le cadmium est un accepteur pouvant former des complexes stable avec des macromoléculaires biologique. Ces complexes se révèlent plus stable que ceux impliquant des ions Zn^{2+} . Cette caractéristique explique que les ions Cd^{2+} peuvent déplacer les ions Zn^{2+} de leurs sites d'origine et ainsi perturber le fonctionnement des macromolécules, car nombre d'enzymes utilise le zinc comme cofacteur. Le zinc est également lié à l'ADN grâce à des facteurs transrégulateur (Olisekodiaka et *al.*, 2003). La perturbation fonctionnelle des acides nucléiques, des protéines et des enzymes par le cadmium rend compte de la multiplicité des effets toxiques de ce contaminant.

Pathologie	Référence
<p>Toxicité aiguë</p> <ul style="list-style-type: none"> -Elle provoque rapidement à partir de 3mg ingérés des <i>vomissements</i> souvent sanglants associés à des <i>douleurs abdominales intenses</i>, des <i>diarrhées</i> et des <i>myalgies</i>. -Les troubles <i>hémodynamiques</i> sont responsables d'une insuffisance rénale aiguë, associés à la toxicité rénale directe du cadmium. -Parfois, il existe une <i>cytolyse hépatique</i> et certains auteurs ont décrit l'apparition d'<i>oedèmes faciotronculaires</i>. - L'inhalation accidentelle de fortes concentrations de fumées de cadmium conduit à une irritation intense des voies respiratoires et a occasionné des décès en milieu professionnel]. 	<p>Villa, 2011</p> <p>Casalino et <i>al.</i>, 2002</p> <p>ATSDR, 2013</p>
<p>Toxicité chronique</p> <ul style="list-style-type: none"> -Atteinte <u>rénale</u> : néphropathie tubulaire proximale caractérisée par une fuite de protéines de faible poids moléculaire (<i>retinol-binding protein</i> [RBP], α1-microglobuline, β2-microglobuline.) non réabsorbées par les cellules tubulaires proximales. -Les douleurs <u>osseuses</u>, l'ostéoporose, l'ostéomalacie et les fractures spontanées font partie du tableau clinique de la maladie décrite au Japon "Itai-Itai" chez des personnes dont la nourriture a été contaminée par du cadmium. Ce dernier, provoque des anomalies ou dérèglement du métabolisme de calcium et de la vitamine D. -<u>Hépatique</u> : nécrose des lobules centraux, fibroses hépatiques, hyperplasie biliaire, diminution du poids du foie. augmentation de l'activité de l'alanine aminotransférase sérique, indicateur de lésions hépatiques. -<u>Testicule</u> : Des études expérimentales chez l'animal ont montré que le cadmium produit des atteintes testiculaires et diminue la fertilité chez les mâles. -Autre : le cadmium peut provoquer des cancrs de poumons, de la prostate, du pancréas, du foie et des reins. anémie, diminution du poids corporel 	<p>Andujar et <i>al.</i>, 2010</p> <p>Tellez-Plaza, et <i>al.</i>, 2002</p> <p>(Anses, 2012)</p> <p>(ATSDR, 2008 ; Laib et <i>al.</i>, 2018).</p> <p>(Verougstraete et <i>al.</i>, 2002; Nawrot et <i>al.</i>, 2010).</p>

I.4 Cadmium et le stress oxydatif

L'intoxication du cadmium est essentiellement indirecte, Ce métal lourd non oxydoréducteur en milieu biologique provoquerait la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants comme le SOD (Stohs and Bagchi, 1995), CAT, et GPx. (Szuster *et al.* 2000). Par contre des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines (Potts *et al.* 2001; Waisberg *et al.* 2003), probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. (Potts *et al.* 2001; Waisberg *et al.* 2003). L'autre possibilité expliquant l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des SODs (Filipic *et al.* 2006). Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc (Aramini *et al.* 1995) peuvent se traduire par une déméthylation des protéines, une altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), une interférence dans la signalisation dépendante du calcium. L'impact du Cd sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyles, superoxydes, ou le peroxyde d'hydrogène (Fotakis *et al.* 2006; Oh *et al.* 2006). Les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) (Lopez *et al.* 2006; Nzungue, Y. 2008).

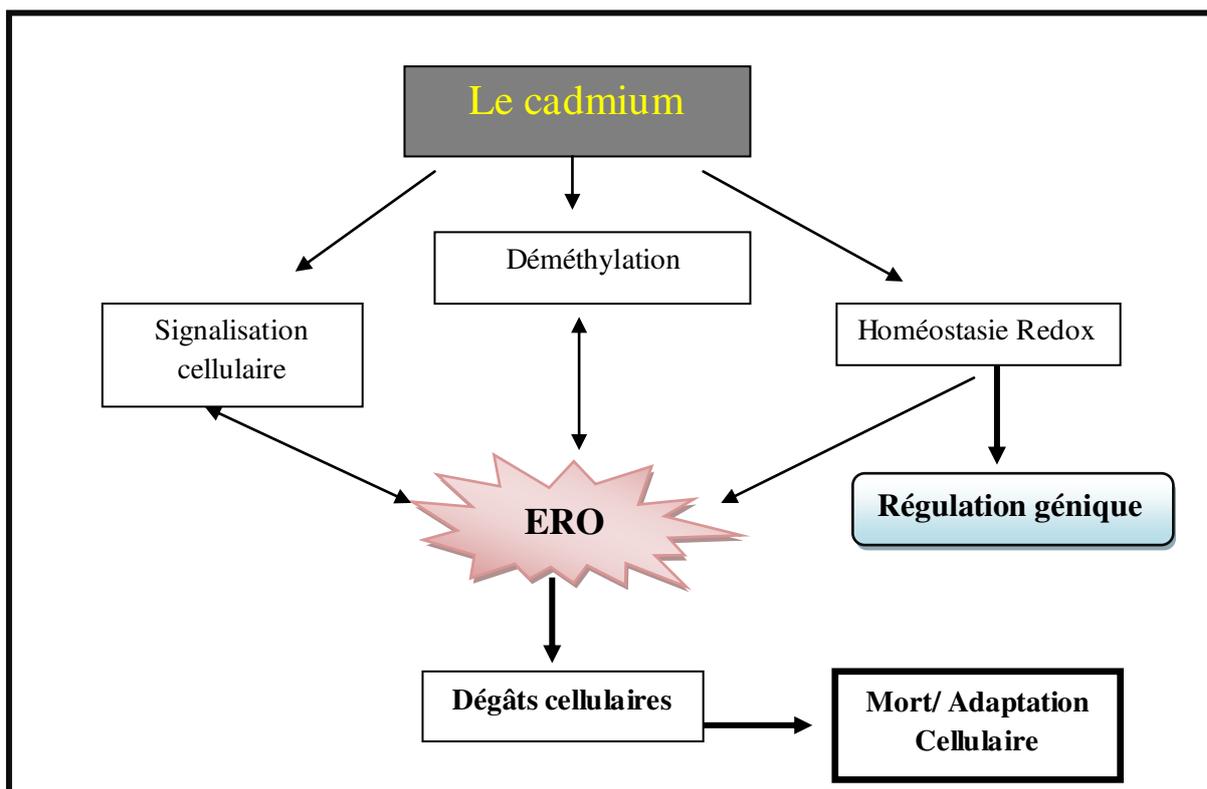


Schéma I.1 : Impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO.

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Kehili et al, 2018). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Li et al, 2003). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. (Curtin *et al*, 2002 ;Mclaughlin *et al.*, 2007).

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants (les radicaux libre) /antioxydants » en faveur des oxydants (Almasiova *et al* ,2012), ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Sergent *et al.*, 2001; Djellouli, 2013) a redéfini le stress oxydatif comme « une perturbation dans la signalisation et le contrôle redox ». Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Arita *et al.*, 2009).

Références

Références de l'introduction

A

Anderson, R.R. Targeting of sebaceous follicles as a treatment of sebaceous gland disorders. In. Google Patents. 2001.

B

Bahorun, T., V.S. Neergheen, and O.I. Aruoma Phytochemical constituents of Cassia fistula. African journal of Biotechnology 4. 2005.

Boukhatem, M.N., M.S. Hamaidi, F. Saidi, and Y. Hakim Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Nature & Technology:37. 2010.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition reviews 56:317-333. 1998.

C

Chouikh, A., and M. Selmane Contribution à l'inventaire et l'utilisation des plantes médicinales spontanées dans les zones semi-aride (cas de la région d'Om El Bouaghi, Est-Algérien). 2014.

F

Fujishiro, H., Y. Yano, Y. Takada, M. Tanihara, and S. Himeno Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. Metallomics 4:700-708. 2012.

G

Gultepe, E.E., A. Iqbal, I.S. Cetingul, C. Uyarlar, U. Ozcinar, and I. Bayram Effect of Myrtus communis L. Plant Extract as a Drinking Water Supplement on Performance, Some Blood Parameters, Egg Quality and Immune Response of Older Laying Hens. KAFKAS ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ 26. 2020.

M

Mimica-Dukić, N., D. Bugarin, S. Grbović, D. Mitić-Ćulafić, B. Vuković-Gačić, D. Orčić, E. Jovin, and M. Couladis Essential oil of Myrtus communis L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. Molecules 15:2759-2770. 2010.

Mishra, S., R. Tripathi, S. Srivastava, S. Dwivedi, P.K. Trivedi, O. Dhankher, and A. Khare Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by Ceratophyllum demersum L. Bioresource technology 100:2155-2161. 2009.

Références

Mrabent, B.S.E. Evaluation de la contamination métallique dans trois organes (foie, gonades et muscle) du Rouget de roche *Mullus surmuletus* (L. 1758) par quatre métaux lourds (Zn, Cu, Cd, Pb) pêché dans la baie d'Oran. In. Université de Tlemcen. 2015.

N

Nawrot, T.S., E. Van Hecke, L. Thijs, T. Richart, T. Kuznetsova, Y. Jin, J. Vangronsveld, H.A. Roels, and J.A. Staessen Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environmental health perspectives* 116:1620-1628. 2008.

S

Škerget, M., P. Kotnik, M. Hadolin, A.R. Hraš, M. Simonič, and Ž. Knez Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry* 89:191-198. 2005.

V

Vandjiguiba, D., A. Francis, A. Yolande, and A. Djama evaluation de la toxicité du sulfate de cadmium sur le poids moyen des organes internes chez les rats wistar. 2019.

Références du chapitre I

A

Alfvén, T., C.G. Elinder, M.D. Carlsson, A. Grubb, L. Hellström, B. Persson, C. Pettersson, G. Spång, A. Schütz, and L. Järup Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 15:1579-1586. 2000.

Amr A F., Qureshi, Habib A., Yacoubi, Mohamed T., *et al.* Protective role of carnosine in mice with cadmium-induced acute hepatotoxicity. *Food and chemical toxicology*, vol. 47, no 11, p. 2863-2870. 2009

Andersen, O., J.B. Nielsen, and G.F. Nordberg Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake-possibilities for risk reduction. *Biometals* 17:543-547. 2004.

Andrade, S.A.L., A.P.D. da Silveira, R.A. Jorge, and M.F. de Abreu Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International journal of Phytoremediation* 10:1-13. 2008.

Andujar, P., L. Bensefa-Colas, and A. Descatha Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *La Revue de médecine interne* 31:107-115. 2010.

Anses, A. Valeur toxicologique de référence pour le cadmium et ses composés. 2012.

Références

Arita, A., and M. Costa Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics* 1:222-228. 2009.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for Cadmium. Atlanta: ATSDR/US department of Health and Human Services. 2013.

B

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P. and Cougnon, M. Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J PhysiolRenalPhysiol*, 287, F1067-1075. 2004

Berroukche, A., M. Terras, A. Labani, H. Dellaoui, and W. Lansari Effects of interaction CdZn on serum-PSA level and prostate histology in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7:245-248. 2017

Beattie, J. H., Owen, H. L., Wallace, S. M., Arthur, J. R., Kwun, I. S., Hawksworth, G. M., and Wallace, H. M. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicology letters* **157**, 69-78. 2005.

Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J. P., ... & Pichard, A. (2011). Cadmium et ses dérivés. *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques* 82p.[En ligne] URL: <http://www.ineris.fr/hml>, consulté le, 10(04), 2012.

C

Casalino, E., G. Calzaretti, C. Sblano, and C. Landriscina Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179:37-50. 2002.

Ciarrocca, M., A. Capozzella, F. Tomei, G. Tomei, and T. Caciari Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone. *Chemosphere* 90:2077-2084. 2013.

D, F

Davis, A.C., P. Wu, X. Zhang, X. Hou, and B.T. Jones Determination of cadmium in biological samples. *Applied Spectroscopy Reviews* 41:35-75. 2006.

Djellouli F. (2013). Aspect qualitatif et quantitatif des lipoprotéines sériques chez les agriculteurs utilisant les pesticides. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en biologie.

Ferramola, M.L., M.F.P. Díaz, S.M. Honoré, S.S. Sánchez, R.I. Antón, A.C. Anzulovich, and M.S. Giménez Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the myocardium. Effects of a soy-based diet. *Toxicology and applied pharmacology* 265:380-389. 2012.

Fleming MO, Trenor CC 3rd, Su MA, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997 ; 16: 383-6.

Filipič, M., T. Fatur, and M. Vudrag Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology* 25:67-77. 2006

Fotakis, G., and J.A. Timbrell Modulation of cadmium chloride toxicity by sulphur amino acids in hepatoma cells. *Toxicology in vitro* 20:641-648. 2006.

Références

- Friberg, L.T., G.-G. Elinder, T. Kjellstrom, and G.F. Nordberg Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal: Volume 2: Effects and Response. CRC press. 2019.
- Friedman, P.A., and F.A. Gesek Hormone-responsive Ca²⁺ entry in distal convoluted tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* 4:1396-1404. 1994.

H, J et K

- Hinkle P.S., P.A. Kinsella, K.C. Osterhoudt, Cadmium uptake and toxicity via 935 voltage-sensitive calcium channels, *J. Biol. Chem.* 262:16333–16337. 1987.
- Johansen, P., G. Mulvad, H.S. Pedersen, J.C. Hansen, and F. Riget Accumulation of cadmium in livers and kidneys in Greenlanders. *Science of the Total Environment* 372:58-63. 2006.
- Järup, L. Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17:35-39. 2002.
- Jarup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol.*;238:201–8.2009
- Kandasamy, A., R. Mohan, M. Lydia Caroline, and S. Vasudevan Nucleation kinetics, growth, solubility and dielectric studies of L-proline cadmium chloride monohydrate semi organic nonlinear optical single crystal. *Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography* 43:186-192. 2008
- Kehili, N., S. Saka, and O. Aouacheri L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie* 16:194-203. 2018.
- Kjellström, T., «Appendix, Itai Itai Disease», *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal, Volume II. Effects and Response*, L. Friberg, C.-G. Elinder, T. Kjellström et G.F. Nordberg (éd.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 257-290 (1985).
- Klaassen, C. D., J. Liu, et al. (1999). "Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 267-94.
- Klaassen, C.D., J. Liu, and B.A. Diwan Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 238:215-220. 2009.
- Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C. and Hediger, M.A. (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett* 509, 309-316.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Natun!* 1997 ; 388 : 482-8.

L, M et N

- Laib, S., and K. Lalaoui Le rôle de *Thymelaea microphylla* dans l'amélioration du stress oxydant et du taux de la métallothionéine induits par le cadmium dans le rein chez le rat. Thèse de doctorat. A l'Université des Frères Mentouri Constantine, 2018.

Références

- Li, M., T. Xia, C.-S. Jiang, L.-J. Li, J.-L. Fu, and Z.-C. Zhou Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis. *Toxicology* 194:19-33. 2003.
- Malayeri, B. E. (1995). Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- Matías Miguel Salvarredy Aranguren.(2008). Contamination en métaux lourds des eaux de surface et des sédiments du Val de Milluni (Andes Boliviennes) par des déchets miniers. Approches géochimique, minéralogique et hydrochimique.Thèse doctorat de l'université de Toulouse.P 498.
- Marano, F. Doses-réponses non monotones: un enjeu pour l'évaluation des risques. *Environnement, Risques & Santé* 2:45. 2017
- Mcelroy J.A., Shafer M.M., Trentham-Dietz A., Hampton J.M. and Newcomb P.A. Cadmium exposure and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 12, 869-873. 2006.
- McLaughlin MJ, Singh BR (1999) Cadmium in soils and plants, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 273
- Mclaughlin, M.J., M. Whatmuff, M. Warne, D. Heemsbergen, G. Barry, M. Bell, D. Nash, and D. Pritchard A field investigation of solubility and food chain accumulation of biosolid-cadmium across diverse soil types. *Environmental Chemistry* 3:428-432. 2007.
- Monographie du CIRC. Vol. 58 (1993) [en anglais] : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/volume58.pdf>
- Murakami, M., Cain, K., Webb, M., (1983). Cadmium-metallothionein-induced nephropathy: a morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *Journal of Applied Toxicology*, 3, 237-244.
- Nawrot, T.S., J.A. Staessen, H.A. Roels, E. Munters, A. Cuypers, T. Richart, A. Ruttens, K. Smeets, H. Clijsters, and J. Vangronsveld Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals* 23:769-782. 2010.

O

- Oehha, OEHHA Office of environmental health hazard assessment,: Public health goals for chemicals in drinking water. Cadmium. 2006.82 p. 2006.
- Oh, S.-H., and S.-C. Lim A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicology and applied pharmacology* 212:212-223. 2006.
- Olisekodiaka, M., C. Igbeneghu, A. Onuegbu, R. Oduru, and A. Lawal Lipid, lipoproteins, total antioxidant status and organ changes in rats administered high doses of cadmium chloride. *Medical Principles and Practice* 21:156-159. 2012.

Références

- Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in blood and urine- impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking-association of renal effects. *Environ Health Perspect* ;110 :1185-90. 2002.
- Ouanoughi, S. Possibilités d'élimination du cadmium par précipitation chimique à la chaux et au sulfate d'aluminium. In. Université Mohamed Khider-Biskra. 2004.

P, R

- Pichard, A., M. Bisson, R. Diderich, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, J. Lefèvre, S. Leveque, H. Magaud, and A. Morin Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS, Verneuil-en-Halatte. 2005.
- Potts, R., I. Besselov, S. Wallace, R. Melamed, and B. Hart Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology* 161:25-38. 2001
- Prankel, S., R. Nixon, and C. Phillips Meta-analysis of feeding trials investigating cadmium accumulation in the livers and kidneys of sheep. *Environmental research* 94:171-183. 2004.
- Rousselet, E. Réponses cellulaires vis-à-vis de l'exposition au cadmium chez les animaux. In. 2007.
- Reeves P.G. and Chaney R.L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: a review. *Sci Total Environ*, 398, 1-3, 13-19.2008.

S

- Satarug, S., J. R. Baker. "A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population." *Toxicol Lett* 137(1-2): 65-83.2003.
- Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J. (2001). Alcohol et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49: 689-695.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine*, 18, 321-336
- Stosic, J., I. Mirkov, S. Belij, M. Nikolic, A. Popov, D. Kataranovski, and M. Kataranovski Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomedical and Environmental Sciences* 23:293-299. 2010.
- Szuster-Ciesielska, A., A. Stachura, M. Słotwińska, T. Kamińska, R. Śnieżko, R. Paduch, D. Abramczyk, J. Filar, and M. Kandefler-Szerszeń The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145:159-171. 2000.

T

- Tallkvist, J., C.L. Bowlus, and B. Lönnerdal DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology letters* 122:171-177. 2001.

Références

- Tellez-Plaza, M., A. Navas-Acien, C.M. Crainiceanu, and E. Guallar Cadmium exposure and hypertension in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environmental health perspectives* 116:51-56. 2008.
- Thompson, J., and J. Bannigan Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive toxicology* 25:304-315. 2008.
- Trinchella, F., M. Riggio, S. Filosa, M.G. Volpe, E. Parisi, and R. Scudiero Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144:272-278. 2006.

V, W, Y

- Verougstraete, V., D. Lison, and P. Hotz Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 6:227-256. 2003.
- Villa, A. Intoxication par le cadmium. Centre antipoison de Paris. 2011.
- Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of inorganic biochemistry* 79:241-244. 2000.
- Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533:107-120. 2003.
- Waisberg, M., P. Joseph, B. Hale, and D. Beyersmann Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192:95-117. 2003.
- Wang, H., G. Zhu, Y. Shi, S. Weng, T. Jin, Q. Kong, and G.F. Nordberg Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *Journal of Bone and Mineral Research* 18:553-560. 2003.
- Yamagata, N. et I. Shigematsu, «Cadmium Pollution in Perspective», *Bull. Inst. Public Health*, 19:1-27 (1970).
- Zorrig, W. (2011). Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue " *Lactuca sativa* " (Doctoral dissertation).

SOURCE D'INTERNET

- Cadmium : cité dans le site de société chimique de France,2017. Société Chimique de France.[https://www.societechimiquedefrance.fr/Cadmium.html#:~:text=%5BArsenic%2D%3E222%5D\)%2C, grec%20et%20du%20latin%20cadmia](https://www.societechimiquedefrance.fr/Cadmium.html#:~:text=%5BArsenic%2D%3E222%5D)%2C, grec%20et%20du%20latin%20cadmia).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II

II. *Myrtus Communis*

II.1 Histoire de la plante *Myrtus communis*

Depuis plusieurs années, le myrte a été utilisé en médecine traditionnelle comme antiseptique et désinfectant ; il était employé dans l'Égypte ancienne pour soigner les troubles de la peau et les infections des sinus (Özkan et al, 2009). En Perse, on en usait, sous la forme d'une compresse chaude, pour traiter les furoncles. En Afrique du Nord, les fleurs séchées sont préconisées pour soulager l'asthme et pour traiter la variole. Enfin, les afro-américains inhalent des vapeurs chaudes de thé à base de myrte pour lutter contre les migraines causées par un rhume ou une grippe (Venturini, 2012).

En Algérie, le myrte est utilisé comme un remède contre les infections des voies respiratoires et des voies urinaires, Les préparations à base de cette plante sont préconisées contre les bronchites, les sinusites, les otites, les diarrhées et les hémorroïdes, Les fruits constituent un remède contre la dysenterie, l'entérite et les hémorragies (Beloued A ,2003).

En d'autres pays du grand Maghreb (Maroc et Tunisie), le myrte est utilisé dans le Nord du pays où les fruits sont recommandés (à l'état frais ou sous forme de décoction) pour soulager l'ulcère et les douleurs gastriques, Le même décocté est préconisé en gargarisme pour traiter les gingivites, la décoction des fleurs est proposée pour arrêter les diarrhées aiguës et comme traitement de la toux et des rhinites. L'huile essentielle issue des fruits est utilisée pour atténuer les douleurs rhumatismales en application local (Boukef M K, 1986).

Dans la même région, l'infusion et la décoction sont utilisées comme remèdes des affections respiratoires et des diarrhées, L'infusion est également préconisée en bains d'yeux dans les conjonctivites , le décocté sert à imbiber les compresses à appliquer sur les plaies, les abcès, les furoncles et les hémorroïdes saignants, le décocté concentré est donné aux femmes dans les hémorragies de la délivrance, Le fruit est mâché contre les gingivites et les aphtes. (Bellakhdar J, 1997)

II.2 Description botanique

Le genre *Myrtus* appartient à la famille des Myrtaceae (Tableau II.1), Ces plantes sont originaires du bassin méditerranéen dont certaines sont également présentes en Asie occidentale, en Amérique du sud et en Australie (Venturini, 2012). La Famille des myrtacées est une famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 3800 espèces réparties en 133 genres (Oldrich, L et al., 2005).

Ce sont des arbustes à feuilles entières et opposées (Quezel, P., Santa, S. 1963). Les fleurs blanches, axillaires, solitaires, longuement pédonculées apparaissent à partir de la mi-juin. Les baies d'un noir bleuâtre sont ovoïdes (environ 5 mm de diamètre), charnues, à graines peu nombreuses et couronnées par le calice. La pleine maturité de ces fruits est atteinte au mois de novembre (Brada et al, 2012).

Tableau II. 1 : Position systématique de l'espèce *Myrtus Communis* L. (Dahmoune et al 2015)

Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnaliophytina
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Myrtus
Espèce	<i>Myrtuscommunis</i> L
Variétés	Myrtuscommunis var. italica L Myrtuscommunis var. baetica L Myrtuscommunis var. lusitanica L

II.2.1 Dénominations selon la nomenclature. (Goetz et Ghedira, 2012).

Portugais : mirta ,murta , murteira.

Berbère : tarihant ,chilmoum.

Occitan : nertha, nerto.

Corse : morta ,mortula.

Allemand : brutmyrte, myrte.

Français :myrte, myrte commun.

Anglais :Bridalmytle, myrtle.

Grec : myrtos.

Arabe : rihan ,mersin.

Italien : mirto, mortell

II.2.2 Caractère botanique de *Myrtus communis* L.

Le myrte (*Myrtus communis*, L.) est la seule espèce de la famille des Myrtacées qui existe à l'état naturel en Algérie, au Maroc et Tunisie etc.(Messaoud et al., 2012). Il pousse au niveau de la mer à 500-800 m d'altitude (Migliore,. 2011), il se développe au sein des matorrals thermophiles. En Algérie, il est commun dans les maquis et les forêts du Littoral (Wannes et al., 2010).

Il s'adapte au sol siliceux, calcaire, on le rencontre plus sur terrain acide, en compagnie d'*Arbutus unedo* L., de *Pistacia lentiscus*, *Quercus suber*, *Quercus ilex*, *Ceratoniasiliqua*... Occupant principalement l'étage thermo-méditerranéen (moyenne des minima du mois le plus froid comprise entre 3 et 7 °C) (Chidou, 2014).

C'est un arbrisseau de grandeur variable, de 2 à 5 mètres, divisé en de nombreux rameaux dès la base. Les feuilles opposées, courtement pétiolées, ovales, aiguës, entières, fermes, d'un beau vert luisant, sont parsemées de petits poils transparents, ainsi que le fruit est une baie ovoïde, noire à maturité, couronnée par le limbe du calice. Les fleurs blanches, odorantes, visibles de mai à juillet, sont portées par un long pédoncule dressé et solitaire à l'aisselle des feuilles. (Ghanmi, M et al., 2011).

II.3 Application en médecine traditionnelle

Le *myrtus communis* possède des vertus médicinales grâce aux composés phénoliques. Cette plante a des activités biologiques énorme (antioxydante, antispétique, anti-inflammatoire. Anti diabétique etc....) (Nassar et al., 2010) et c'est pour cela le myrte a toujours considéré comme un bon remède traditionnel en raison de leur propriétés thérapeutiques nombreuses, telles que l'hyperglycémie, diarrhée et l'infection. Les populations locales utilisent les différents organes de myrte en médecine traditionnelle. Le *myrtus communis* est listé dans la pharmacopée africaine comme plante médicinale d'intérêt. Toutefois, les feuilles et les baies sont plus utilisées pour leurs valeurs nutritionnelles et leurs diverses propriétés. Parmi les différents usages cités dans littérature (tableau II.2) (Cakir, 2004), le myrte a été principalement utilisé comme anti-inflammatoire, les troubles gastro-intestinaux et antiseptique.

Tableau II.2: Application différent partie de *Myrtus communis*

Partie de <i>Myrtus communis</i>	Application traditionnelle	Références	
feuilles		<p><i>Préparation des recettes de cuisine</i> (aromatisé de viande et de sauces) et <i>de santé</i> (Parfum et préparation les produits cosmétique ex : tonique et stimulant capillaire); <i>Médicament</i> (utilisé par voie orale en tant qu'antiseptique, agent anti-inflammatoire, laxatif, analgésique, agent hémostatique et à l'extérieur pour la cicatrisation des plaies)</p>	(Chokri et al. 2012), Gortzi et al. 2008), (Serce et al., 2010)
Baies		<p><i>Préparation des recettes de cuisine</i> (aromatisé de viande et de sauces); <i>Médicament</i> (utilisé également par voie orale pour des maladies infectieuses telles que la diarrhée et la dysenterie et par la voie cutané (maladies de la peau et la cicatrisation des plaies)</p>	(Messaoud et al., 2012),(Serce et al.,2010)
branches		<p><i>Médecine</i> (remède contre l'asthme, l'eczéma, le psoriasis, la diarrhée, les troubles gastro-intestinaux et les infections urinaires, administré par voie orale; appliqué par inhalation)</p>	(Agrimonti et al.,2007)
Fleurs		<p><i>Médecine</i> (contre les varices et pour préparer des lotions capillaires à usage externe)</p>	Abaza et al, 2010

II.4 Compositions de *Myrtus communis*

Des études antérieures sur le Myrte ont révélé la présence de plusieurs composés chimiques spécifiques les huiles essentielles, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins dans les feuilles et fruits (Messaoud et al., 2005, Aidi Wannas et al., 2010). et l'anthocyanine, les acides gras et organiques dans les baies (Tuberoso et al., 2010, Chokri et al., 2012 ; Affroune et al., 2016).

II.4.1 Huile essentielle du Myrte et le leurs composants

L'huile essentielle est un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le mot « volatil » signifie que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement.

En général, les principes aromatiques des plantes sont des gouttes minuscules qui se forment dans les chloroplastes des feuilles. Les organites dans lesquelles s'effectue la photosynthèse. Elles se combinent par la suite avec du glucose et sont transportées vers toutes les parties de la plante.

D'après les études antérieures de la plante *Myrtus communis* ont montré le rendement de l'huile essentielle de myrte est compris entre (0,2-1,2 %) et la présence majoritairement des terpènes volatils, les principaux composants ont été identifiés par le CPG (Chromatographie en phase gazeuse) sont les mono terpéniques caractéristiques de l'huile essentielle de myrte (α -pinene (12,6-64 %), 1,8 cineole (5,4-40,9), myrtenol, linalol (0,74-18,92%), α terpineol (4,4 %), limonene (3,8 %), acetate de myrtenyl, acetate de bornyl (5,2 %), acetate de linalyl (4,2 %), acetate de geranyl (1,83-20,54 %) (Aidi Wannas et al., 2010).

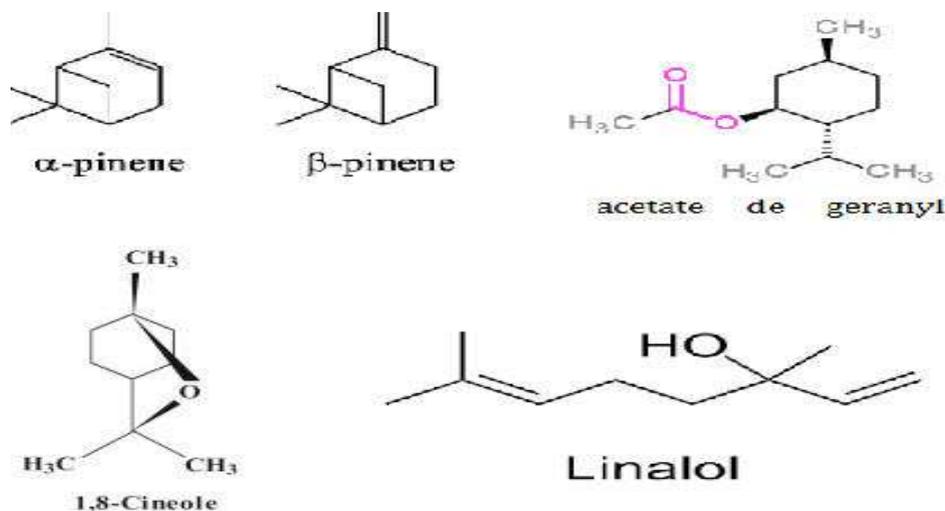


Figure II.1 : Structures de quelques composants mono terpéniques.

II.4.2 Composants phénolique du Myrte

Le profile des extraits de *Myrtus communis* constitue de composés phénoliques, qui sont des molécules hydrosolubles. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de par leurs actions antibactériennes et anti-fongique (Benkherara et al., 2013). Les composés phénoliques sont regroupés en trois grandes classes chimiques les acides phénoliques, les tanins et les flavonoïdes.

II.4.2.1 Acides phénoliques

L'acide phénolique est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, ils appartiennent à deux groupes, les acides hydro-benzoïques et les acides hydro-cinnamiques. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes anti-inflammatoires, antiseptique urinaire, anti-radicalaires et hépatoprotecteurs (Bruneton, 1999).

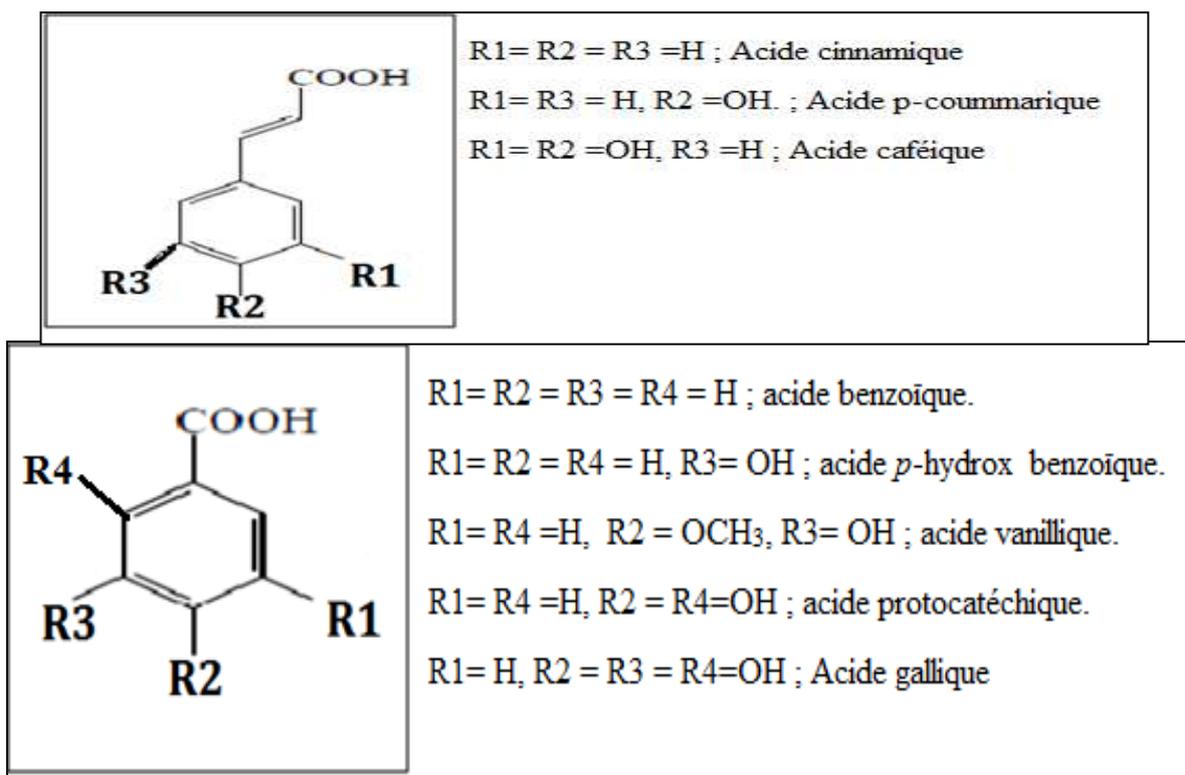


Figure II.2 : Exemples d'acides phénoliques (Yang et al., 2012)

II.4.2.2 Tanins

Les tanins sont des poly phénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques (Hemingway, 1992). Leurs propriétés coagulants des albumines des muqueuses et des tissus qui créent ainsi une couche de coagulation isolante et protectrice qui réduit l'irritation et la douleur.

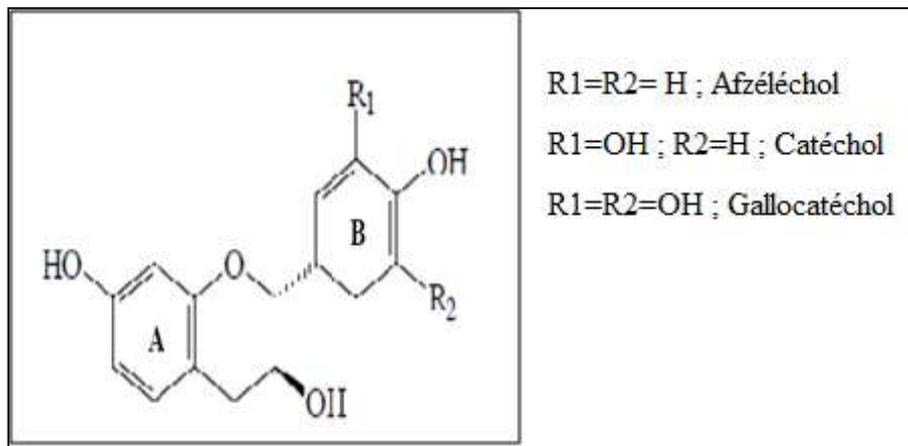


Figure II.3 : Structure générale de tanin (Canon, 2010)

II.4.2.3 Flavonoïde

Les flavonoïdes sont très réponde dans la règne végétal et présents dans les extraits de myrte sont la myricétine, la quercétine, la catéchine et leurs dérivés. Certains des dérivés de la myricétine et de la quercétine (flavonols) sont trouvés comme la myricétine-3-d-galactoside, la myricétine-3-d-rahmnoside, la quercétine-3-d-rahmnoside et de la catéchine (flavanols) (Canon, 2010). Actuellement, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médicale où on leur reconnaît des activités : antivirales, antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti- radicalaires, antibactériennes, anti-oxydantes et on leur reconnaît également une activité anti-malaria (Naghbi et al.,2013). Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase, comme le myricétine par exemple. (Brada et *al.*, 2012).

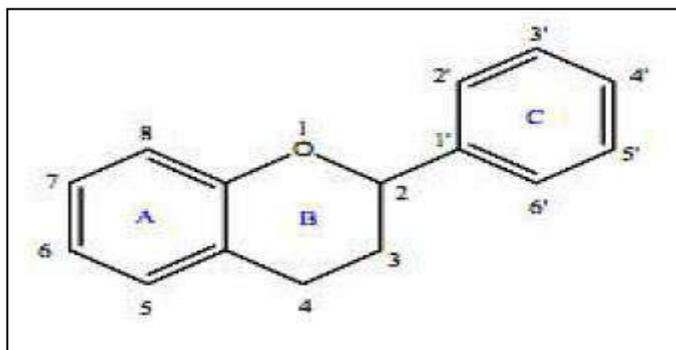


Figure II.4 : Structure de base des flavonoïdes. (Addouche, 2019)

II.5 Biodisponibilité des poly phénols

La notion de biodisponibilité fait entrer un grand nombre de paramètres comme l'absorption intestinale, la distribution, le métabolisme par la microflore et l'hépatique, l'excrétion, les propriétés des métabolites circulants (structure du polyphénol, sa polarité, sa masse moléculaire, liaison avec d'albumine et autres protéines du plasma) (Galland S, 2006).

II.5.1 Absorption

Le cas du gavage, l'estomac est le premier site en contact avec des métabolites secondaires de la plante, seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamique sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement dans l'estomac, Les flavonoïdes sous forme de glycoside résistent au pH acide de l'estomac (Lafay et al, 2006), L'extraction se poursuit dans le duodénum sous l'action des sécrétions biliaires et pancréatique (Borel, P. 2014)., Du fait de leur hydrophobicité, ces phyto-micronutriments doivent être incorporés dans les micelles mixtes, constituées particulièrement de sels biliaires et de produits de la lipolyse des lipides via la glande pancréatique afin de pouvoir être solubilisé dans la phase aqueuse (Tyssandier et al., 2001 ; Borel, P. (2014). Cependant, l'efficacité de l'absorption se trouve réduite car la surface d'échange est plus faible dans le côlon que dans l'intestin grêle car la flore intestinale dégrade une grande partie des glucosides. L'absorption intestinale se fait par les entérocytes (Amiot et al., 2009). Ceux-ci sont procurés de nombreuses protéines membranaires implique dans l'absorption de ces éléments. Ces protéines sont plus au moins spécifiques de certain molécules et peuvent être entraînées dans le captage.

Les polyphénols ont différent formes glycosylés, estérifiés ou encore polymérisés qui ne peuvent pas être absorbés tels quels. Certains polyphénols vont être absorbés dans l'intestin grêle dans lequel se trouve un système de transport actif dépendant du sodium et les enzymes

présentes dans les cellules épithéliales (Gaston, 2010). L'acide cinnamique, acide férulique et acide p-coumarique pénètrent dans la cellule intestinale par diffusion passive à l'aide d'un transporteur d'acide monocarboxylique la MCT (monocarboxylic acid transporteur), alors que l'acide gallique ne l'est pas (Konishi et al., 2004). En ce qui concerne l'acide caféique, il est entrainé dans la réaction d'estérification par l'acide quinique pour donner l'acide chlorogénique (figure II.5), ce produit réduit son absorption (Lafay et al., 2006). En fait, l'absorption de l'acide chlorogénique se fait principalement dans le côlon après hydrolyse par les estérases microbiennes.

L'enzyme lactate phloridzine hydrolase (LPH) présente dans l'entérocyte de la bordure en brosse de l'intestin et plus faiblement au niveau du côlon. La LPH possède deux sites catalytiques : l'un hydrolyse de lactose tandis que l'autre sert à la déglycosylation de flavonoïdes plus hydrophobes. Les aglycones libres peuvent entrer dans les cellules épithéliales par diffusion passive du fait de leur lipophilie suffisante. Et l'autre mécanisme d'absorption des polyphénols nécessite la β -glycosidase cytosolique des cellules épithéliales. Certains polyphénols polaires transportés via un transporteur membranaire actif sodium-glucose dépendant nommé SGLT1 (Hollman et al., 1995).

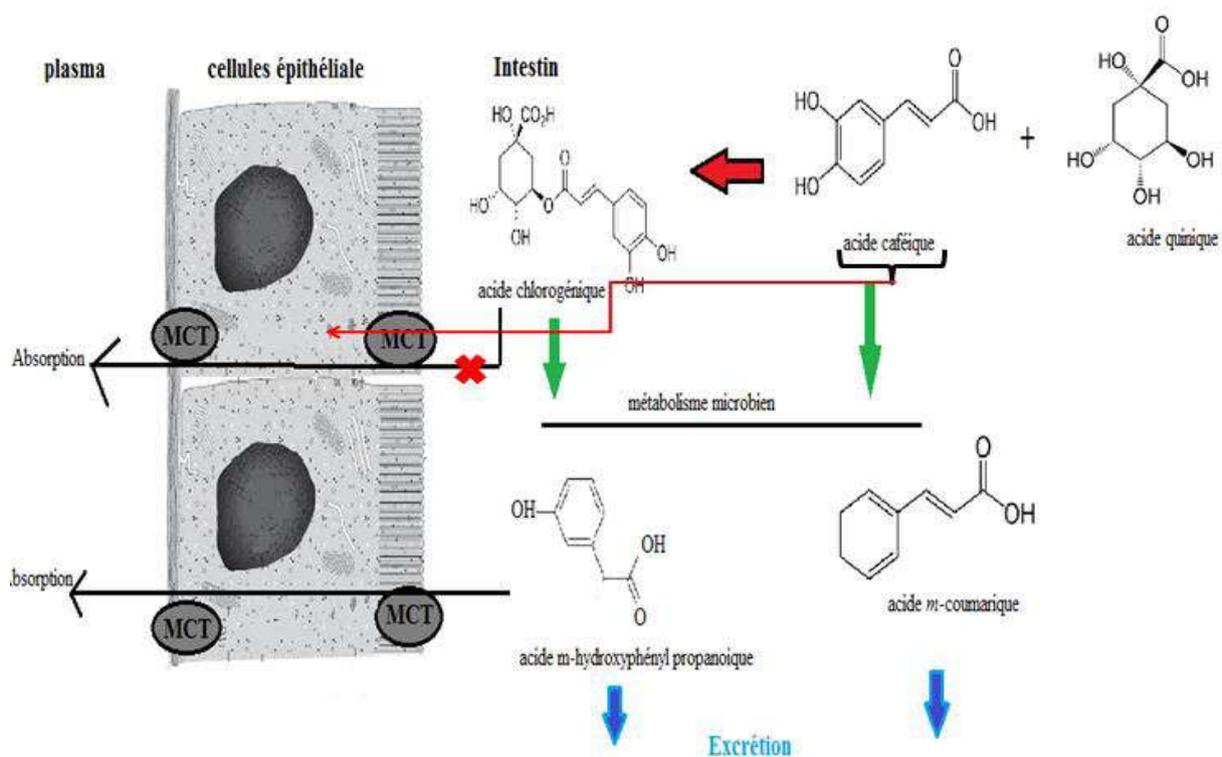


Figure II.5 : Schéma d'absorption certains acides phénolique (Galland S, 2006).

II.5.2 Métabolisation des polyphénols dans le cycle entéro-hépatique

Les polyphénols absorbés ne circulent pas dans le sang sous forme libre, mais plutôt en association avec des protéines transporteurs, comme l’albumine avec des liaisons faible. Les interactions avec les protéines peuvent diminuer la biodisponibilité des polyphénols (Dufour, 2015). La circulation entéro-hépatique, les composés phénoliques sont conjugués principalement par des réactions de glucuroconjugaison, de méthylation et de sulfatation. Cette opération de détoxification métabolique est commun à de nombreux xénobiotiques, l’objectif étant de limiter leurs effets toxiques potentiels et de faciliter leur élimination biliaire et urinaire, en augmentant leur hydrophilie. Les trois principales conjugaisons sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau II.3: Principaux enzymes survenant sur les flavonoïdes (Gaston, 2016)

Enzyme	Action	Localisation
Catéchol-O méthyltransférase (COMT)	catalyse le transfert d’un groupement méthyl depuis l’adénosyl - méthionine vers les polyphénols contenant un groupement diphénolique comme la quercétine, la catéchine, et la cyanidine.	Foie – Rein
Sulfotransférases (SULT)	catalysent le transfert d’un sulfate depuis la phosphoadénosine - phosphosulfate vers un groupement hydroxyle de certains polyphénols.	Foie
Uridine-5’-diphosphate glucuronosyltransférases (UGTs)	catalysent les transferts d’un acide glucuronique vers les polyphénols.	situées dans le réticulum endoplasmique dans de nombreux tissus, dont l’intestin grêle.

Tableau II.4: Métabolisation du flavonoïde (Ferrier, 2018)

Flavonoïde	Site de métabolisation	Types de conjugaison	Métabolites
Quercétine	Microbiote	Hydroxylation des deux noyaux phénolique	Acide parahydroxybenzoïque Acide protocatéchique Acide 3,4-dihydroxyphenylacétique
	Foie	Sulfoconjugaison, glucuroconjugaison ou O - méthylation du groupe catéchol (COMT)	Quercétine - 3 - glucuronide ; Quercétine - 3’ - glucuronide Quercétine - 3’ - sulfate Isorhamnétine - 3 - glucuronide ; Tamarixétine

Phloroglucinol	Microbiote	Hydroxylation du cycle A	Acide 3,4-dihydroxyhydrocinnamique Acide 3-dihydroxyhydrocinnamique
myricétine	Microbiote	Trihydroxylation de l'hétérocycle cycle B	Acide 3,5-dihydroxyphénylacétique Acide 3-hydroxybenzène acétique Acide 2-(3,4,5-trihydroxyphényl) acétique
kaempférol	Microbiote	Hydroxylation de l'hétérocycle B	Acide p-hydroxyphényl acétique

II.5.3 Distribution tissulaire

Les polyphénols sont retrouvés en particulier dans les organes où ils sont métabolisés, mais ils semblent pouvoir s'accumuler dans des tissus spécifiques (Manach C et al., 2004). Et selon les études qui ont été focalisés *in vivo* sur la distribution de certains polyphénols comme (quercétine, gallate d'épigallocatechine, quercétine 4' - glucoside, resvératrol) chez le rat et la souris par l'utilisation le radio-marquage montrent les tissus digestifs et le sang sont plus radioactifs. Mais les polyphénols ont également été détectés dans le cerveau, les cellules endothéliales, le cœur, les reins, la rate, le pancréas, la prostate, l'utérus, les ovaires, les testicules, la vessie et les os. (Galland, 2006).

II.5.4 Excrétion des polyphénols

Elimination des polyphénols se fait principalement dans l'urine et la bile comme tous les xénobiotique (Manach C et al., 2004). Certains composés phénoliques sont excrétés dans le duodénum par la voie biliaire où ils sont soumis à l'action d'enzymes bactériennes après quoi ils peuvent être absorbés. Ce recyclage entéro-hépatique peut élever la présence des polyphénols dans le corps. Les métabolites les plus imposants sont plus susceptibles d'être éliminés dans la bile, tandis que les plus petits tels que les monosulfates sont excrétés préférentiellement dans l'urine (Manach C et al., 2004 ; Ferrier M., 2018).

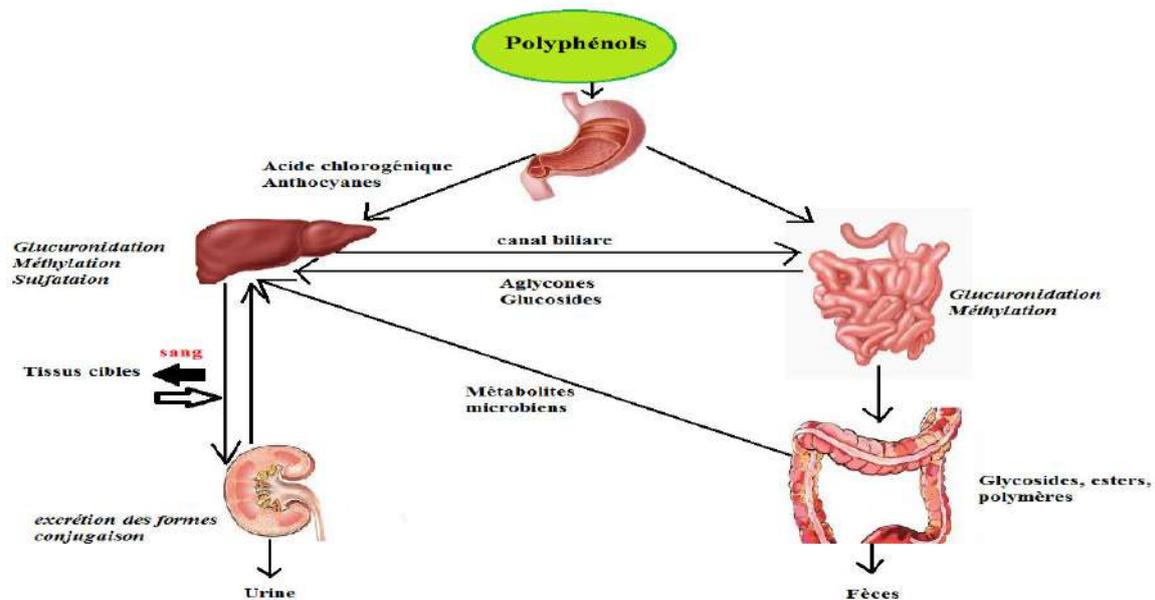


Figure II.6 : Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols (Lafay et al., 2006)

II.6 Extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénolique d'une plante est un procédé visant à extraire certains constituants présents dans les plantes. C'est une méthode de séparation solide/liquide c.à.d. le corps solide c'est la plante est mise en contact d'un liquide c'est le solvant (Chaouche, 2010). Cependant les composés d'intérêts végétaux sont alors solubilisés et contenus dans le solvant. Alors la solution obtenue est l'extrait recherché contient les constitués solide ou liquide. A ce jour là, les chercheurs scientifique utilisent des précédés ancienne afin d'extraire les principes actifs des plantes médicinales tel que l'infusion, macération et décoction. La simplicité de ces techniques, les outils, les matériaux on encore les modes de chauffe faisaient de l'extracteur un homme de l'art plutôt qu'un scientifique (Restocours. Net Fiche produit).

II.7 Extraction de l'huile essentielle

Les plantes aromatique généralement contiennent des compositions complexes, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement bien définie, la procédure de l'extraction de l'huile essentielle est basée sur les techniques anciennes (Wenqtang et al 2007). La plus simple et la plus répondeu c'est la technique hydro-distillation. Celle-ci consiste à immerger la matière première (les feuilles, rameaux, baies, tiges ou les fleurs) directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à l'ébullition (Gad et al 2010). L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs formées sont condensées par un

système de réfrigérateur par courant d'eau. La séparation du distillat qui constitué deux phases liquide non miscible (hydrolat et l'huile) se fait par l'utilisation ampoule à décanter afin de récupérer la phase huileuse (Ouis, 2015).

II.8 Analyse chromatographique

II.8.1 Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

L'HPLC est une technique utilisée pour séparer le mélange complexe de l'extrait polaire ou peu polaire afin d'identifier de composés contenus dans un extrait. L'appareillage est constitué de deux pompes, chacune reliée à deux solvants différents et d'une boucle d'injection, Les pompes HPLC permettent d'avoir un débit constant sous de fortes pressions qui assure la reproductibilité des résultats (Nelly, 2008).

La séparation des composées se fait dans une colonne remplie de phase stationnaire. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- Si la phase stationnaire est polaire (silice), la phase mobile doit être peu polaire et dans ce cas la chromatographie est dite en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire silice (greffée par des chaines d'acide gras, C₈ ou par C₁₈ par ex) la phase mobile doit être polaire généralement un mélange de alcool ou d'acétate de nitrile avec l'eau. La chromatographie est dite en phase inverse.

Les composants sont ainsi élués en fonction de leur polarité par rapport aux deux phases. A la sortie de la colonne, se trouve un détecteur qui mesure en permanence l'absorbance de la phase mobile à la sortie de la colonne (Nelly, 2008).

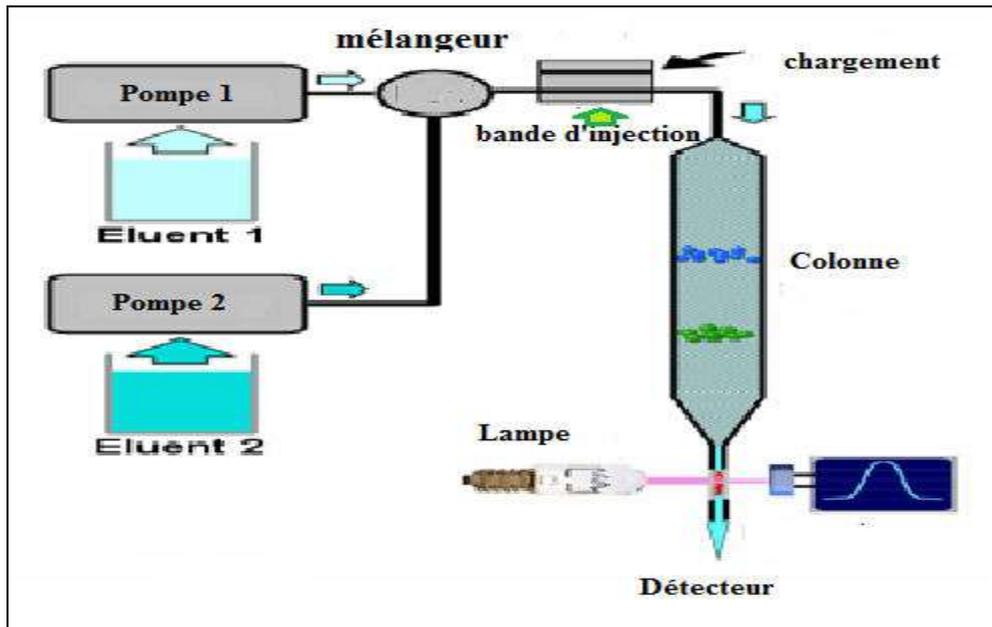


Figure II.7: Schéma simplifié la fonction de chromatographie liquide à haute performance HPLC

II.8.2 chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une technique utilisée pour la séparation très puissante des composants organiques est basée sur les différences d'affinités des substances analyser, dans laquelle les composants à séparer sont répartis de façon sélective en fonction de leur poids moléculaire, leur taille ou leur charge entre deux phases (la phase stationnaire et la phase mobile), Les éléments gazeux ou volatils d'un échantillon sont placés dans un injecteur (A.I.T France). Ils vont ensuite être emportés (phase mobile) par un gaz vecteur qui va les amener dans la hase stationnaire dans le but de les séparer, Les molécules ont plus d'affinité avec la phase stationnaire, plus ils prennent de temps pour sortir de la colonne de chromatographie, A la sortie de la colonne, se trouve un détecteur qui mesure l'absorbance des échantillons, Les éléments peuvent être identifiés mais aussi quantifiés (Ouis, 2015). La CPG comporte plusieurs éléments, comme indiqué dans la figure II.8.

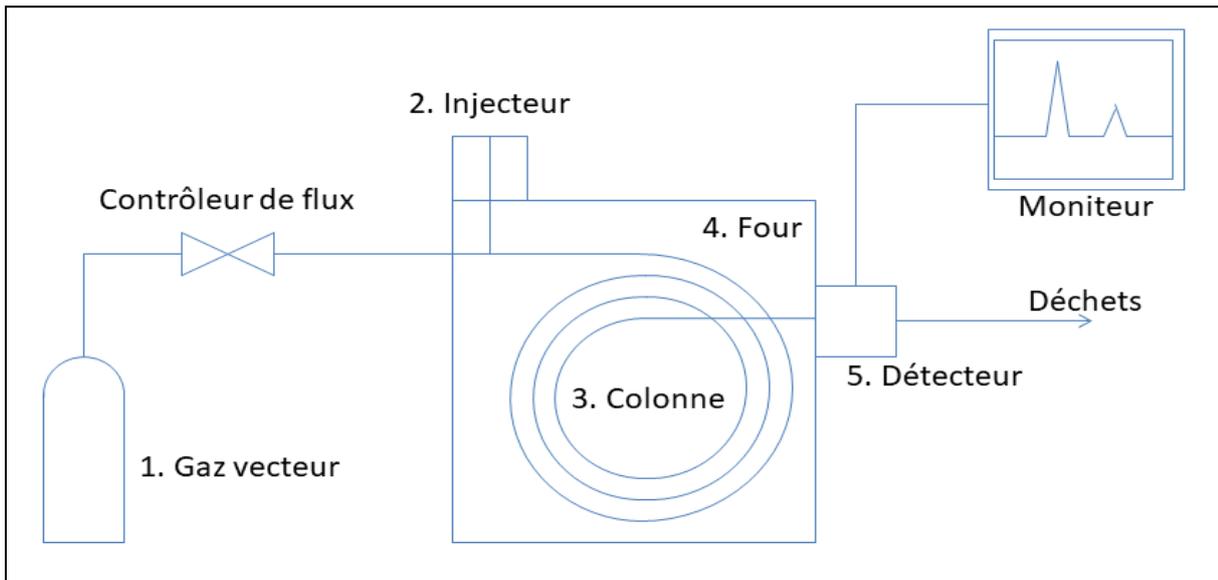


Figure II.8: Schéma simplifié la chromatographie en phase gazeuse

Références du chapitre II

A

- Addouche K. Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques, la composition, l'activité antibactérienne et le pouvoir antioxydant des huiles essentielles du «Myrtus Communis L. 2019.
- Abaza, K., A.M. gammar, and z. Ghrabi-gammar Une nouvelle espèce pour la flore vasculaire spontanée de la Tunisie: *Rhus coriaria* L. *Revue d'écologie*. 2010.
- Affroune, K., K. Behria, and K.E. Madani The effect of *Myrtus Communis* fruits on physicochemical and antioxidant activity of yogurt. 2016.
- Agrimonti, C., R. Bianchi, A. Bianchi, M. Ballero, F. Poli, and N. Marmioli Understanding biological conservation strategies: a molecular-genetic approach to the case of myrtle (*Myrtus communis* L.) in two Italian regions: Sardinia and Calabria. *Conservation Genetics* 8:385-396. 2007.
- Amiot, M.-J., C. Riollet, and J.-F. Landrier Polyphénols et syndrome métabolique: Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des maladies métaboliques* 3:476-482. 2009.

B

- Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. Paris. France.
- Beloued A (2003) Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger
- Benkherara Salah, Bordjiba Ouahiba et Djahra Ali Boutlelis. Action des principes actifs naturels d'une plante aromatique algérienne vis-a-vis des enterobactéries pathogènes. *Algerian journal of arid environment Journal* vol. 3, n° 2: 15-23, 2013.
- Borel, P. (2014). Biodisponibilité des phytomicronutriments: Mécanismes impliqués et stratégies d'amélioration. *Innovations Agronomiques*, 42, 27-37.
- Boukef M K (1986) Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris
- Bouaziz, A., S. Abdalla, A. Baghiani, and N. Charef Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5:19-28. 2015.
- Brada, M., N. Tabti, H. Boutoumi, J.-P. Wathélet, and G. Lognay Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis* L.). *Journal of essential oil Research* 24:1-3. 2012.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.

C

- Cakir, A. Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L.(Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical systematics and ecology* 32:809-816. 2004.
- Canon, F. Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins. In. Thèse de doctorat du Centre international d'études supérieures en sciences, 2010.
- Chaouche M., 2010. Recherche et détermination structurale des composés flavoniques de l'espèce: *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). Mémoire de Magister, Université de Constantine, 116p.
- Chidou A. Caractérisations chimiques et physico-chimiques des extraits hydrosolubles du myrte (*Myrtus communis*). In. Université Badji Mokhtar-Annaba. 2014.
- Chidouh, A., S. Aouadi, and A. Heyraud Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. *Food hydrocolloids* 35:733-739. 2014.
- Chokri M., Laabidi, and Boussaid *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities. *Journal of food science* 77:C941-C947. 2012.

D,F

- Dahmoune, F., B. Nayak, K. Moussi, H. Remini, and K. Madani Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry* 166:585-595. 2015.
- Ferrier Mylène, les polyphénols contenus dans le vin rouge : leurs propriétés pharmacologiques. Thèse pour l'obtention du diplôme du doctorat en pharmacie, 2018.
- Hemingway, R. W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *L pant polyphenols: synthesis, properties, significande*. Hemingway R W, Laks P. E. New York.
- Hollman, P., Devries, J., Vanleeuwen, S., Mengelers, M., & Katan, M. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *AM J Clin Nutr*, 62 , pp. 1276-1282.

G

- Gad M. M. S., Mohammad Y. S., Mohammad T.G.M. 2013. Acute and Repeated-Doses (28 Days) Toxicity of Thymol Formulation in Male Albino Rats. *Aust. J. Basic &Appl. Sci.*, 7(10): 594-601, ISSN 1991-8178.
- Gaston, E., J.M. Frias, P.J. Cullen, C.P. O'Donnell, and A.A. Gowen Prediction of polyphenol oxidase activity using visible near-infrared hyperspectral imaging on mushroom (*Agaricus bisporus*) caps. *Journal of agricultural and food chemistry* 58:6226-6233. 2010.
- Gaston étienne. Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers?. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de bordeaux des sciences pharmaceutiques, 2016

Référence

- Galland Stéphanie, polyphénols : Synthèse organique et propriétés physicochimiques. Thèse pour l'obtention du diplôme du doctorat en chimie. À l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille, France, p 20-31, 2006.
- Goetz, P., and K. Ghedira *Myrtus communis* L. (Myrtaceae): Myrte. In: Phytothérapie anti-infectieuse. Springer. pp 313-320. 2012.
- Gortzi, O., S. Lalas, I. Chinou, and J. Tsaknis Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European food research and technology* 226:583-590. 2008.

K, L

- Konishi, Y., Y. Hitomi, and E. Yoshioka Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:2527-2532. 2004.
- Lafay, S., C. Morand, C. Manach, C. Besson, and A. Scalbert Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition* 96:39-46. 2006.

M, N

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 1 mai 2004;79(5):727-47.
- Migliore, J. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en Méditerranée et au Sahara. In. Aix-Marseille 3. 2011
- Mansour, A. Extraction et caractérisation des métabolites secondaires de plantes médicinales du genre *Juniperus* et du genre *Myrtus*. In. 2017.
- Nassar, M.I., E.-S.A. Aboutabl, R.F. Ahmed, E.-D.A. El-Khrisy, K.M. Ibrahim, and A.A. Sleem Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy research* 2:325. 2010.
- Naghibi, F., S. Esmaeili, N.R. Abdullah, M. Nateghpour, M. Taghvai, S. Kamkar, and M. Mosaddegh In vitro and in vivo antimalarial evaluations of myrtle extract, a plant traditionally used for treatment of parasitic disorders. *BioMed research international* 2013. 2013.
- Nelly le grand, Démarche de l'ethnopharmacologie appliquée : plantes antidiabétiques de Madagascar. Thèse de doctorat en pharmacie à l'université de Rennes, 2008.

O, S

- Oldrich, L., Klejdus, B., Ladislav, K., Michaela, D., Khaled, A., Vlastimil, K., Richard, H. (2005).
- Ouis Naouel, étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de doctorat en chimie organique. Université d'Oran 2015.
- Quezel, P., Santa, S. (1963)**, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ; Tome II, CNRS, Paris.

Référence

- Özkan, A.M.G., and Ç.G. Güray A mediterranean: *Myrtus communis* L.(myrtle). Plants and culture: seeds of the cultural heritage of Europe. Edipuglia, Bari:159-168. 2009.
- Sadou, M., A. Hamidi, and A.E. Chikhounne Huiles essentielles et extraits éthanoliques de *Myrtus communis* L.: Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante. 2012.
- Seghaouil Manel et Zermane Aya. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques *in vitro* de l'espèce *Myrtus communis* L. In Université des Frères Mentouri Constantine, 2017
- Serce, S., S. Ercisli, M. Sengul, K. Gunduz, and E. Orhan Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. Pharmacognosy magazine 6:9. 2010.

T, V, W et Y

- Tuberoso, C.I.G., A. Rosa, E. Bifulco, M.P. Melis, A. Atzeri, F.M. Pirisi, and M.A. Dessì Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. Food Chemistry 123:1242-1251. 2010.
- Venturini, n. contribution chimique a la definition de la qualite: exemples des spiritueux de myrte (*myrtus communis* l.) et de cedrat (*citrus medica* l.) de corse. in. 2012.
- Wannes, W.A., B. Mhamdi, J. Sriti, M.B. Jemia, O. Ouchikh, G. Hamdaoui, M.E. Kchouk, and B. Marzouk Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf , stem and flower. Food and chemical toxicology 48:1362-1370. 2010.
- Wenqtang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T., Can Q., 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001: 1558-1564.
- Yang, C.-Y., S.-M. Chen, T.-H. Tsai, and B. Unnikrishnan Poly (diphenylamine) with multi-walled carbon nanotube composite film modified electrode for the determination of phenol. Int. J. Electrochem. Sci 7:12796-12807. 2012.

Site électronique

- Restocours. Net Fiche produit.

A.I.T FRANCE : GUIDE DES COLONNES HPLC ; Support et mode chromatographiques

PARTIE EXPERIMENTALES

matériels et méthodes

La partie expérimentale a englobé deux grands volets, à savoir un volet a été consacré à l'extraction des métabolites secondaires polaire et apolaire à partir des feuilles de la plante médicinale « *Myrtus communis* », l'étude qualitative et phyto-chimique, la détermination du pouvoir antioxydant des extraits et enfin le dosage analytique des composés bioactifs par les deux méthodes d'analyse de séparation qui sont bien la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Le deuxième volet s'était penché sur l'évaluation des effets préventifs possibles des différents extraits hydro-alcoolique et aqueux des feuilles de *Myrtus communis* sur le dysfonctionnement du système biologique et le désordre de l'architecture tissulaire induits par un sel métallique, le chlorure de cadmium (CdCl_2), chez un modèle animal expérimentale.

PREMIER VOLET : Etudes qualitative et quantitative des extraits des feuilles de *Myrtus communis*

III. 1 Matériel végétal

La plante de *Myrtus communis* L. est constituée par des feuilles entières et opposées et ainsi des fruits. Cette plante a été récoltée à l'état frais pendant le mois mi-janvier 2016 dans les zones montagneuses de Chreaa, situées dans la région Sud-Est de Blida, province située au Centre-Nord de l'Algérie ou plus précisément dans le tell Algérien, figure III.1.



Figure III.1:Rameaux de feuilles et fruits de *Myrtus Communis* récoltés dans la région de Chreaa.

III.2 Présentation de la zone d'étude

La région de Chréaa est située au Sud-Ouest d'Alger à environ 64 km de cette même ville. Elle est localisée à des hauteurs de 18 km environ au Sud-Est de la région de Blida. Elle est limitée au nord par les wilayas d'Alger et de Tipaza, au sud par la wilaya de Médéa, à l'est par les wilayas de Boumerdès et de Bouira et à l'ouest par la wilaya d'Aïn Defla, Figure III.2.

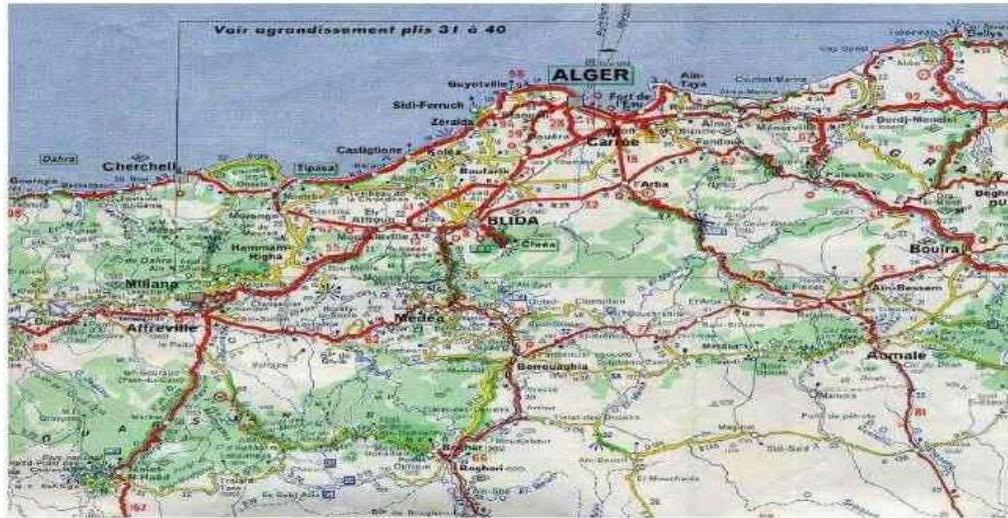


Figure III.2 : Présentation géographique de la région de la récolte de la plante.

Les coordonnées géographiques nationales de la région de Chreaa sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.1: Coordonnés géographiques locales du site de récolte (Blida, Algérie).

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique	Caractéristique
Chréaa, Blida	158 à 1 627 m	36° 25' 32" Nord	2° 52' 36" Est	Humide et sub-humide	Parc national de haute montagne

III.3 Identification et authentification de la plante

Après la période de récolte, les plantes *Myrtus communis* ont été conservées, séchées et attachées sur un support de papier rigide figure III.3. Ces plantes étaient destinées pour une identification et une authentification. Ces mêmes plantes ont été déposées pour être conservées au niveau du laboratoire de recherche en ressources hydriques et environnement, département de biologie, faculté de sciences, Université Dr Tahar-Moulay de Saida, Algérie. Des

échantillons de cette plante ont été transportés vers le laboratoire de botanique, Université de Murcie, Espagne. Cette espèce a été identifiée, le 03 Mai 2017, par le professeur espagnol Pedro Sánchez, botaniste à l'Université de Murcie, Espagne. Les résultats de l'identification de la plante ont été concrétisés par l'établissement d'un certificat d'authentification et de confirmation au sein du laboratoire de botanique, Université de Murcie, Espagne (Annexe 01).



Figure III.3 :Plante *Myrtus Communis* .

III.4 Etude histologique des structures végétales sécrétrices d'huiles essentielles

L'observation des caractères généraux au niveau des structures végétales des feuilles et tiges a été réalisée au niveau du laboratoire de la biologie végétale, département de biologie, faculté des sciences, Université Dr. Taher Moulay de Saida dans le but d'étudier la morphologie interne ou l'histologie des parties végétales aériennes de la plante en envisageant d'observer les tissus suivants ; xylème, phloème et poches sécrétoires par microscope optique binoculaire de type *MOTIC B SERIES*.

Afin d'identifier des spécificités morphologiques et anatomiques au niveau des différentes parties végétales de la plante et ainsi de localiser éventuellement les sites sécréteurs des essences aromatiques, il a été opté pour l'utilisation des feuilles et des tiges fraîches qui étaient destinées pour un traitement et une analyse par la technique de double coloration (Vert de méthyl et rouge congo)(Prat, 2007).

III 4.1 Etapes de la technique de double coloration

La plante a été soumise à un examen microscopique en réalisant des coupes anatomiques au niveau des feuilles et tiges, qui étaient traitées par la technique de double coloration (Schéma III.1). La coloration a été faite sur du matériel végétale fixé dans de l'alcool à 70° de pureté pour obtenir des cellules mortes ou un matériel inerte. Les coupes ont subi des traitements chimiques suivants selon le protocole édité par (Langeron, 1934).

En premier lieu, des coupes ont été réalisées à mains levées avec une lame de rasoir. Le mouvement du rasoir et la coupe devrait être perpendiculaire au grand axe de l'organe pour les sections transversales.

Les coupes végétales étaient récupérées dans des verres de montre contenant l'hydro-chlorite de sodium et laissées imprégnées pendant 20 min.

Les coupes végétales étaient rincées abondamment 3 fois, ensuite soumises à l'action d'un bain d'acide acétique (1%) pendant 2 min pour neutraliser l'action de l'hydro-chlorite de sodium et faciliter ainsi la fixation des colorants sur les parois cellulaires.

Les coupes étaient colorées au vert de méthyle et laissées pendant 5 min puis tout de suite rincées à l'eau distillée et soumises à la coloration au rouge congo et laissées pendant 20 min.

Les coupes les plus minces étaient sélectionnées et observées au microscope optique aux différents grossissements (10×10) et (40×10).

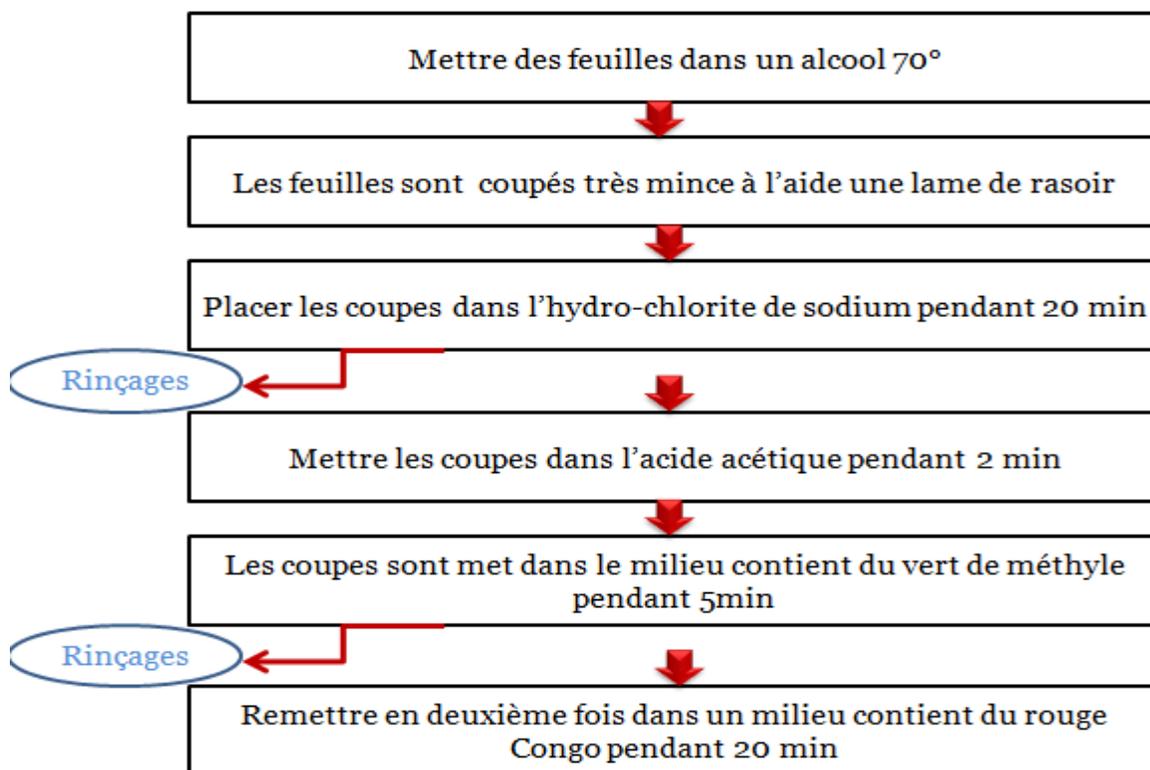


Schéma III.1 : Etapes de la technique de la double coloration

III.5 Préparation des extraits

Toutes les plantes médicinales possèdent des activités pharmacologiques dues en leurs teneurs en métabolites secondaires et antioxydants. La nature chimique, l'identification et la concentration de ces ingrédients ont nécessité des études quantitative et qualitative de la composition chimique de la plante *Myrtus communis* suite à une préparation des extraits à partir des feuilles de cette plante.

III.5.1 Etape de séchage

Après la récolte de la plante, le matériel végétal a été nettoyé et débarrassé de ses débris, étalé et laissé à l'air libre pour être séché graduellement à une température ambiante. Une semaine après, le matériel végétal a été complètement déshumidifié et le changement de la couleur des feuilles facilitaient le déchirage et la séparation des différentes parties. L'ensemble a été réduit en poudre au moyen d'un moulin électrique à usage domestique (modèle MF 10BASIC) figure

III.4, utilisé à une vitesse de 4000 à 6500 tpm. Cette étape a été effectuée au niveau de laboratoire de biologie végétale de la faculté des sciences de l'université de Saïda.



Figure III.4: Etapes de broyage des feuilles

III.5.2 Extraction

III.5.2.1 Hydro-distillation

Lors de cette phase technique et analytique, les feuilles fraîches de *Myrtus communis* ont été utilisées dans le but d'extraire les huiles essentielles. Les feuilles ont été découpées en petits morceaux pour faciliter leur introduction dans un ballon en verre d'un litre, rempli d'eau distillée jusqu'aux 2/3 de sa capacité. L'eau a été ensuite chauffée dans le chauffe ballon jusqu'à ébullition, ce qui entraînait la formation d'une vapeur qui va entraîner les composants volatiles figure III.5.

Les vapeurs s'élevaient et passaient dans le réfrigérant qui était constamment refroidi à une température comprise entre 15 et 18C°.



Figure III.5 : Montage de l'hydro-distillateur

III.5.2.2 Macération

Cette opération consistait à épuiser le matériel végétal au contact d'un mélange de solvants (Eau / Alcool). L'extrait végétal, à analyser, a été obtenu comme suit :

D'après la méthode (Talbi et al, 2015), la poudre des feuilles étaient mises à macérer dans un mélange eau / méthanol (20:80 V/V) à un rapport de 10/100 (P/V), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique a été récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre Wattman n°1. Le méthanol a été éliminé par évaporation sous pression réduite dans un rota-évaporateur (de marque Heidolph). L'évaporation de l'alcool a permis d'obtenir un extrait brut caractérisé par une couleur brune foncée.

III.5.2.3 Infusion

L'infusion ou la dite extraction par l'eau bouillante est un type de procédé utilisé quand les principes actifs de la plante sont hydrosolubles et peuvent facilement être obtenus à partir du tissu de la plante. Une quantité de 10 g de broyat était additionnée à un volume de 100 ml d'eau chaude (45°C) de façon à obtenir une concentration de 10% (P/V). L'infusion a été laissée reposer pendant 24 heures à l'obscurité et à température ambiante. Après agitation à l'aide d'un agitateur magnétique, deux filtrations successives ont été effectuées sur papier Wattman n°1. Une solution aqueuse de l'extrait brut était obtenue. Le filtrat a été séché par un rota-vapeur (Heidolph).

III.6 Calcul du rendement d'extraction

L'équation, indiquée en ci-dessous, a été utilisée pour la détermination du rendement (Rdt) des trois extraits. Cette formule mathématique représente le rapport entre la masse de l'extrait obtenu (m) et le poids de matériel végétal utilisé (m_0) (Bssaibis *et al.*, 2009)

$$Rdt(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Rdt : rendement de l'extrait de la plante.

m : quantité de l'extrait exprimé en gramme (g).

m₀ : quantité de la matière sèche utilisée pour l'extraction exprimée en gramme (g).

III.7 Analyses phyto-chimiques

L'analyse qualitative a été réalisée sur des extraits hydro-alcooliques des feuilles de la plante *Myrtus communis*. Un criblage phyto-chimique a été suivi et basé sur la présence ou absence de certains métabolites secondaires, à savoir le développement de coloration et /ou la formation de trouble ou un précipité témoignant d'une réaction spécifique entre les groupements chimiques et les réactifs utilisés. Dans cette partie, différents tests ont été appliqués afin de détecter qualitativement les principales familles de métabolites secondaires extraits des feuilles de la plante *Myrtus communis*.

A. Tanins

La présence des tanins a été mise en évidence dans 1 ml de l'extrait alcoolique des feuilles dans le premier tube et 1 ml de l'extrait alcoolique dans le deuxième tube par l'addition de 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de chlorure de Fer (ou FeCl_3) diluée à 1 %. La réaction au FeCl_3 peut soit provoquer l'apparition de précipité d'une coloration bleuâtre ou bleue-noire intense caractérisant la présence des tannins galliques, ou une coloration verdâtre ou bleue-verte qui fait preuve de présence de tannins (Alilou *et al.*, 2014).

B. Flavonoïdes

A un échantillon de 5 ml de l'extrait alcoolique de la plante, il est ajouté 5 ml d'une solution d'alcool chlorhydrique (0,5 N), trois copeaux de Magnésium et quelques gouttes d'alcool. La

présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rouge orangée ou rosée et / ou rouge violacée (Adida et *al.*, 2016).

C. Stérol et stéroïde

Cinq millilitres d'extrait alcoolique des feuilles de la plante étaient évaporés à sec sur un bain de marie. Le résidu était dissous dans deux gouttes d'anhydride acétique CH_3COOH . L'addition d'une goutte d'acide sulfurique H_2SO_4 pure développait en présence de produits stéroliques ou terpéniques une coloration mauve virant au vert (Isidore et *al.*, 2019).

D. Composés réducteurs

Leur détection consistait à traiter 1 ml de l'extrait alcoolique avec 0.5ml de la liqueur de Fehling A et B puis chauffer. Un test positif était révélé par la formation d'un précipité rouge brique (Amonkan et *al.*, 2010).

E. Saponosides

Dix millilitres de l'extrait aqueux de la plante étaient incorporés dans un tube de 16 mm de diamètre et de 16 cm de hauteur. Après l'avoir agité verticalement pendant quinze minutes, la hauteur de mousse était mesurée. Une hauteur de mousse supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (AD et *al.*, 2019).

F. Alcaloïdes

Cinq millilitres d'extrait d'alcoolique étaient évaporés à sec. Le résidu était repris par 5 ml d'alcool chlorhydrique dans le tube à essai où on ajoutait quelques gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indiquait la présence d'alcaloïde (Bamba, 2013).

G. Quinones libres

Un gramme de poudre des feuilles de la plante myrte était placé dans un tube à essai avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole, après agitation et à laisser reposer pendant 24 heures, les extraits étaient filtrés et concentrés au rota-vapeur. La présence des quinones libres était confirmée par l'ajout de quelques goutte de NaOH (0,1 N) et l'obtention de la phase aqueuse virant au jaune rouge ou violet (Adida et *al.*, 2016).

H. Anthraquinones

Un gramme de poudre des feuilles a été placé dans un tube à essai avec 15 ml de méthanol et le tout était laissé reposer pendant 30 min. Les extraits alcooliques ont été filtrés et séchés par rota-vapeur, puis il a été ajouté 5 à 10 ml de chloroforme. Ensuite, 2 ml de l'extrait alcoolique

ont été ajoutés à une solution de KOH 10% suivie d'une agitation. La présence des anthraquinones était confirmée par un virage de la coloration de la phase aqueuse au rouge (Allangba et *al.*, 2016).

I. Anthocyanes

Dans un erlenmeyer, il a été ajouté 2 g de poudre des feuilles de la plante dissoute dans 100 ml l'eau distillé à 90 C°. Avant la filtration, l'extrait devrait reposer 30min. Il a été ajouté ensuite 2ml de l'extrait préparé des feuilles dans un tube à essai puis additionné de 2ml de HCl (2N). L'apparition d'une coloration rose-rouge qui virait au bleu-violacé par addition d'ammoniac indiquait la présence d'anthocyanes (AD et *al.*, 2019).

J. Coumarines

Un gramme de poudre des feuilles de la plante a été placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec du papier imbibé de NaOH dilué et ont été portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoignait de la présence de coumarines après un examen sous ultra-violet (Allangba et *al.*, 2016).

k. Terpènes

Un gramme de poudre des feuilles de la plante a été mélangé avec 10 ml de méthanol dans un tube à essai pendant quelque minute. Ce mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre. 5 ml de l'extrait méthanolique a été additionné avec 3 ml d'acide sulfurique pure. L'apparition d'une couleur vert indique la présence des terpènes (Dif et *al.*, 2015)

III.8 Détermination de la composition chimique

III.8.1 Analyse des extraits par l'HPLC

Principe

L'analyse de la composition chimique des feuilles de *Myrtus communis* a été réalisée au laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie à Université Libre de Bruxelles, Belgique. La technique d'HPLC faisait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique le plus souvent utilisée, car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ces diverses possibilités de couplages

avec d'autres techniques chromatographiques et / ou des systèmes de détection (Medana et al., 2008; Michel, T. 2011 ; Fawzia., 2015).

Appareillage

HPLC analytique de type (Waters, Milford, MA, USA) est constituée des éléments suivants: une colonne Symmetry C18 (7µm, 4,6 x 50 mm), avec un flux débit de 5 ml / min, avec l'acide formique (2% dans l'eau)/ méthanol comme phase mobile (solution A), CH₃OH (solution B). la séparation a été effectuée dans 90 min pour l'extrait comme suit (méthanol %, temps):

(5%, 0 min) (95%, 70 min) et (30%, 90 min), (V_{cap} 3500 eV; Source T °, 350 ° C; fragmenteur, 110 V; skimmer, 65 V).

Mise en œuvre pratique

10 g de poudre des feuilles a été extrait trois fois avec 100 ml de méthanol dans un bain d'eau pendant 1,5h. Ensuite l'extrait brut a été filtré à l'aide du papier whatman n°1 pour obtenir le filtrat (liquide), ce dernier a été évaporé à sec sous pression réduite à 60°C. L'extrait sec méthanolique a été mis dans un 200ml d'eau distillé pour l'extraire avec 200ml de chloroforme. Deux couches ont été apparues, la couche organique a été rejetée et la phase aqueuse a été extraite avec 200 ml d'actétate d'éthyle à trois reprises. Puis l'extrait était évaporé pour obtenir l'extrait final et sec. Afin de commencer effectué sur le système de séparation par HPLC, l'extrait final doit être dissolution dans l'eau milliQ (l'eau distillé pure).

III.8.2 Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM

L'analyse quantitative de l'huile essentielle de *Myrtus communis* a été réalisée au laboratoire d'analyse de la qualité (AFAK), Oran, Algérie.

Mise en œuvre pratique

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse CPG (VARIAN CHROMPACK-CP 3900) couplé à un spectromètre de masse SM (SATURN 20200). La colonne utilisée est colonne capillaire de type VF5 de 30 cm de longueur et de 0,25 mm de diamètre intérieur, sa nature : 5% phénylpolysinoxane et 95% de méthyle (cette colonne est considérée comme phase stationnaire), l'injection a été faite en mode SPLIT ; le volume injecté de l'huile essentielle diluée à 20%

dans l'hexane est de 0.2 μ l. L'hélium (He) a été employé comme gaz vecteur à un débit de 0,3 ml/min ; le gradient de température utilisé est de 50 à 220 à raison de 5°C min⁻¹ en mode SPLIT. La température de l'injecteur et de la ligne de transfert sont de 250°C. Au début la température du four a été programmée de 50 °C en isotherme pendant 10 min puis augmentée à raison de 5°C/min pour atteindre 220 °C. Les composés de l'huile essentielle correspondant aux pics majeurs, l'identification des composants a été effectuée par la comparaison des temps de rétention avec la base des données NIST (National Institute for Standard Technology) et par comparaison avec des données de la littérature.

III.9 Evaluation de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des deux extraits (hydro-alcoolique et aqueux) des feuilles de la plante *Myrtus Communis* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (diphénylpicryl-hydrazyl).

Principe

Les antioxydants sont des molécules qui lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation (Chaouch, T. M. 2014). Pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux (Prior et *al.*, 2005). Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, (Floegel et *al.*,2011).

Dans cette présente étude, la mise en évidence de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits (hydro-alcoolique et aqueux) a été réalisée par le piégeage du radical libre DPPH.

Mise en œuvre pratique

Selon le protocole décrit par (Mansouri et *al.*,2005 ; Talbi et *al.*, 2015), les antioxydants réduisaient le diphénylpicryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, figure III.6, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

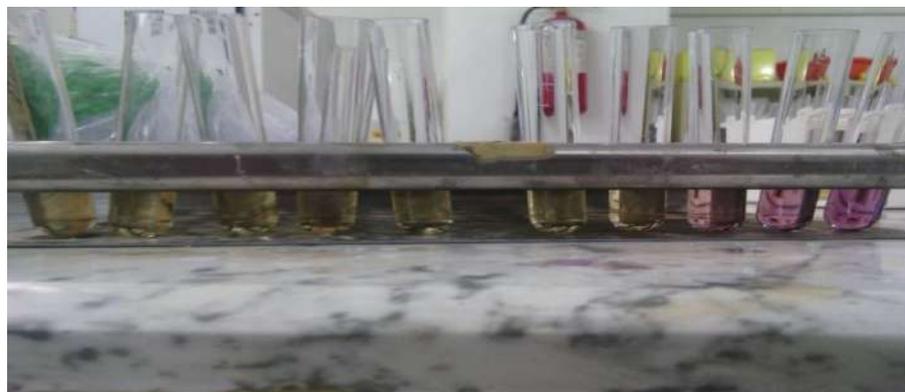


Figure III.6 : Réduction du radical libre DPPH

Un volume de 1800 μl des extraits a été ajouté à 200 μl DPPH (0.024 % préparé dans du méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif était préparé en mélangeant 1800 μl de méthanol avec 200 μl de la solution de DPPH. La lecture de l'absorbance était effectuée contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. L'activité anti-radicalaire était estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité anti-radicalaire}(\%) = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

(%)= Activité anti-radicalaire.

Abs contrôle : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol).

Abs échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Les concentrations des extraits en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées graphiquement à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC_{50} (la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50%) (Houia et al., 2018).

DEUXIEME VOLET : Etude *in vivo* (Dosages biochimiques et Histologie)

Les explorations biologiques étaient basées sur une étude *in vivo* incluant une toxicité sub-chronique (60 jour). La méthodologie et le protocole expérimental suivi sont été décrits selon (Ramírez et al., 2007). Cette présente étude cherchait à évaluer les effets préventif des extraits hydro-alcoolique et aqueux à partir des feuilles de la plante *Myrtus communis* contre la toxicité du cadmium induites chez un modèle animal expérimental à savoir le rat *Wistar*.

III.10 Préparation des animaux

Les animaux d'expérience étaient des rats albinos (ou *Wistar*) de sexe mâle ayant un poids moyen de 145 ± 20 g. L'élevage des animaux était réalisé au niveau de l'animalerie de département de biologie, faculté des sciences, université de Saida. La température moyenne, à l'intérieur de l'animalerie, variait entre 20-25°C, avec un cycle photopériodique de 12 heures de lumière/obscurité. Les rats étaient logés dans des cages en plastique, chacune portait cinq rats recevant la nourriture et l'eau à volonté (Annexe 02). La litière utilisée est la sciure, renouvelée quatre fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

III.11 Mode d'alimentation

Les animaux sont soumis à un régime standard (ONAB) (Office National de l'aliment de Bétail, Oued Tlelat, Oran). Les conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis (Benaicheta et al, 2015). Ce régime standard est supplémenté en minéraux et vitamines et fournit 371.88 kcal. Il contient 14 % de l'énergie sous forme de protéines, 76 % sous forme de glucides et 10 % sous forme de lipides (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Composition chimique et organique du régime d'entretien		
Constituants	Teneur (g/100g de régime)	Valeur énergétique Kcal
Caséine	16	65.6
Méthionine	0.30	1.23
Amidon	60.33	247.35
Saccharose	05	20.50
Cellulose	05	-

Sels minéraux	7.37	-
Vitamines	02	-
Huile	04	37.20
Totale	100	371.88

Composition du mélange minéral (g/100g de régime) : $Ca^{2+}=4$, $K^+=2.4$, $Na^+=1.6$, $Mg^{2+}=0.4$, $Fe^{2+}=0.12$, éléments traces : manganèse : 0.032, cuivre : 0.05, zinc : 0.018.

Composition du mélange de vitamines (mg/kg de régime) : rétinol = 1.8, cholécalférol = 0.019, thiamine = 6, riboflavine = 4.5, acide pantothénique = 21, inositol = 5, acide ascorbique = 240, α -tocophérol = 51, acide nicotinique = 30, acide folique = 1.5, biotine = 0.09.

III.12 Préparation du Traitement à base des extraits des feuilles *Myrtus communis*

Les méthodes de la préparation des extraits ont été mentionnées dans le premier volet. Les extraits utilisés comme les traitements qui ont été préparés à partir de la dose de 1g/kg. Alors, 10g de l'extrait brut de l'extrait hydro-méthanolique ou extrait aqueux (EHM ou EA) doit être dissous dans 100ml l'eau distillée (p/v) pour l'obtention d'une solution à une concentration 100mg/ml. Cette dernière, est une dose pour un rat qu'il pèse 100 g.

III.13 Préparation la solution de cadmium

La dose du sel de Cadmium $CdCl_2$ utilisé dans la présente étude, était de 18mg/kg. Cette dose a été utilisée comme dose toxicologique et représentait le dixième (1/10) de la dose létale ($DL_{50}=180$ mg/kg) élaborée par l'équipe (ANSES, 2012), au cours de leurs expériences sur les modifications morphologiques et le stress oxydatif opérés au niveau des différents tissus (Reins, foie, testicules et prostate).

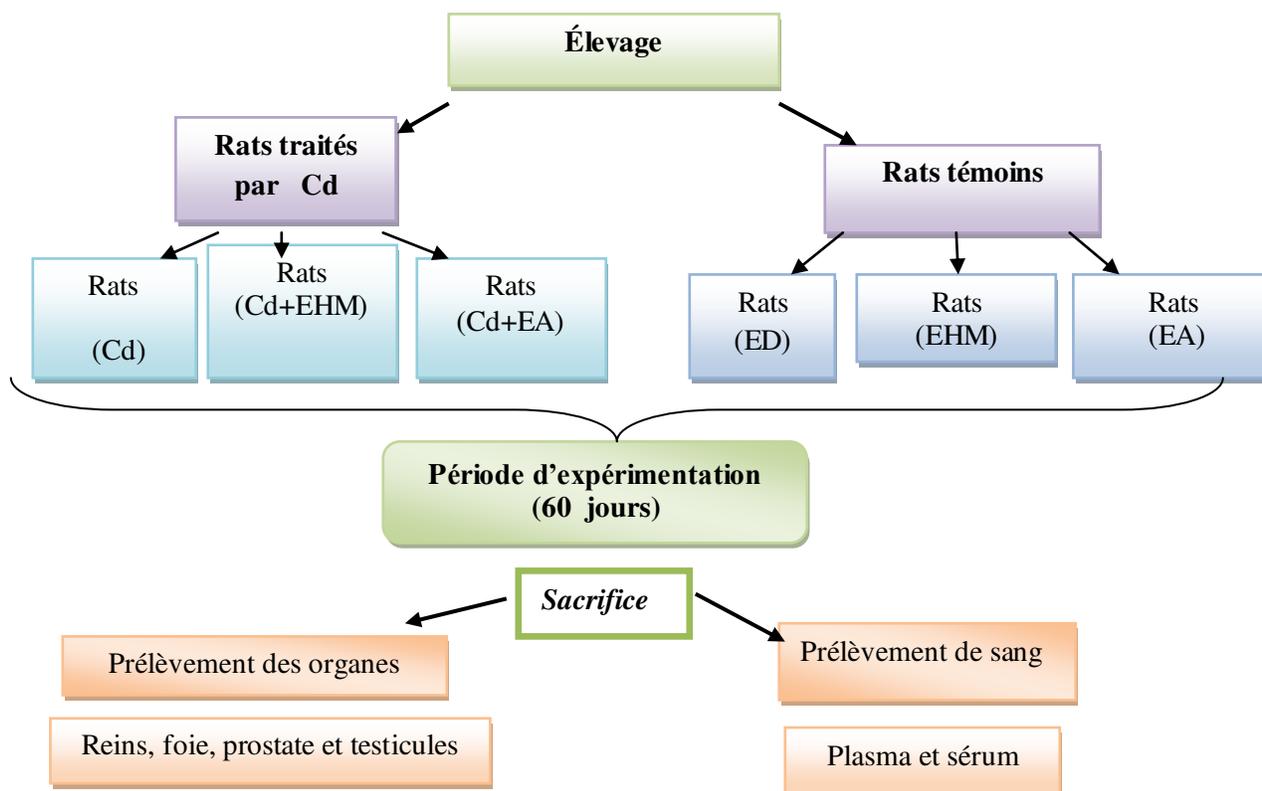


Schéma III.2 : Organigramme récapitulant le protocole expérimental ; (Cd) : rats exposés au cadmium, (EHM) ; rats traités avec l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Myrtus communis* ; (EA) : rats traités avec extrait aqueux ; (Cd-EHM) : Rats exposés au Cd et traités par EHM en même temps, (Cd-EA) : Rats exposés au Cd et traités par EA en même temps ; (ED) : rats témoins recevant de l'eau

III.14 Traitement des rats

Les rats étaient répartis en 6 groupes (10 rats / GR) (Tableau III.3) ; chaque lot recevait un régime spécifique et étaient soumis à un entretien selon les lois de protections des animaux. Les animaux ont été suivis durant une période de 60 jours d'expérimentation avec la détermination quotidienne du poids corporel.

Tableau III.3 : répartition et traitement des groupes			
Groupes	Effectif (n)	Solutions administrées	Doses utilisées
GR 1	10	Eau de boisson	-
GR 2	10	CdCl ₂	18mg /kg (ANSES,2012)
GR 3	10	EHM /Cd Cl ₂	1g / kg et 18 mg / kg en même temps
GR 4	10	EA / Cd Cl ₂	1g/kg et 18mg/kg en même temps
GR 6	10	EHM	1g/kg (IA Issa,2015)
GR 7	10	EA	1g/kg (IA Issa,2015)

CdCl₂ : Chlorure de cadmium ; EHM : extrait hydro-méthanolique ; EA : Extrait aqueux ; p.c : Poids corporel.

Figure III.8 : Administration par gavage des extraits de feuilles et de la solution de Cd



III.14.1 Administration des solutions préparées aux animaux

Les extraits EHM et EA et la dose de cadmium étaient solubilisés dans de l'eau distillée. Ils étaient administrés quotidiennement à des rats par gavage intra-gastrique à l'aide d'une sonde rigide. Les doses des extraits des feuilles de la plante et du cadmium étaient résumées dans le tableau précédent (tableau III.3). La technique reposait sur le principe suivant ; il faut immobiliser le rat lors du procédé de l'administration des solutions et puis entamer l'opération du gavage par la sonde. Une fois le bout de la sonde arrive à son estomac la substance est injectée (figure III.8). Les doses administrées en millilitre par gramme de poids d'un rat.

III.14.2 Suivi du poids des rats

Le poids corporel et la croissance des rats étaient suivis tous les cinq jours après administration par voie orale. Le poids était mesuré à l'aide d'une balance en gramme (g) et le taux de croissance des rats par rapport au 1^{er} jour était exprimé en % et calculé selon la formule suivante.

$$\text{Taux de croissance \%} = \frac{(P_j - P_{j0})100}{P_{j0}}$$

P_{j0} : Poids de 1^{er} jour.

P_j : Poids tous les 15 jours.

III.14.3 Sacrifice des animaux et préparation des échantillons sanguins et tissulaires

Le jour de sacrifice était le jour de la fin d'expérimentation. Les rats étaient mis à jeun pendant 12 heures. Il a été réalisé des prélèvements du sang et des organes pour réaliser des analyses biochimique sérique, hormonale, hématologique et ainsi l'étude histo-pathologique.

III.15 Méthodes de dosage

III.15.1 Analyses biochimiques

III.15.1.1 Exploration de la fonction rénale

A. Dosage de la créatinine (selon la fiche technique *Biomaghreb*)

Principe :

Les tableaux Ci-dessous montre la réaction colorimétrique de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcaline pour donner un complexe coloré, le développement de cinétique est mesurée dans l'intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon.

	Compositions	Volume
Réactif 1 (alcaline)	Hydroxyde de sodium	1,6 mol/l
Réactif 2 (coloration)	Acide picrique	17,5 mmol/l
étalon	Créatinine	2 mg/dl

Tableau III.4 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de la créatinémie.

Mode opératoire

	Standard	Echantillon
Standard	100 µl	-----
échantillon	-----	100µl
Réactif de travail	1ml	1ml
<p><i>Le réactif de travail a été préparé avec deux réactifs (R1+ R2)</i></p> <p><i>La lecture de l'absorbance (A1) après 30s ensuite (A2) exactement 60s après.</i></p> <p><i>La concentration de créatinine est mesurée par spectrophotomètre à une longueur d'onde 492 nm (490-510).</i></p>		

Tableau III.5 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (Créatinine).

B. Dosage de l'urémie (selon la fiche technique *Biomaghreb*):

Principe

L'enzyme l'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2). L'ion ammonium réagit avec le salicylate et hypochlorite dans une réaction catalysée par nitroprusside pour donner un composé de couleur verte indophénol dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

	Composants	Volume
Réactif 1 (R1)	Tampon	
Réactif 2 (R2)	EDTA	2mmol/l
	Salicylate de sodium	60mmol/l
	Nitroprussiate de sodium	32mmol/l
	Uréase	30000U/l
	Phosphate pH 6,7	60mmol/l
Réactif 3 (R3)	Etalon urée	0,50g/l 8,325mmol/l
Réactif 4 (R4)	Hypochlorite de sodium	40mmol/l
	Hydroxyde de sodium	150mmol/l

Tableau III.6 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de l'urémie.

Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon	-----	10µl	-----
Echantillon	-----	-----	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1ml
- Le réactif de travail est un mélange des deux réactifs (R1+R2). - l'incubation des tubes qu'ont été préparés pendant 5 min à 37 C°			
Réactif 4	1 ml	1ml	1ml
-L'incubation deuxième fois après avoir ajouté le réactif 4. -La concentration de l'urée est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 590nm.			

Tableau III.7 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (Urée).

III.15.1.2 Exploration de la fonction hépatique

A. Détermination de l'activité des transaminases plasmatiques (selon la fiche technique *Spinreact*)

Principe

L'aspartate aminotransférase (ASAT/ TGO) et alanine aminotransférase (ALAT/TGP) font partie d'un type d'enzyme, ces enzymes catalysent des acides α -cétoniques (substrat) en acides aminés glutamate (produit) par transfert de groupe amine. Selon les réactions suivantes :



La concentration de ces enzymes dans le sérum est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm.

	Les compositions	Le volume
Réactif de travail (substrat TGO+ tampon)	Tris pH 7,8	80mmol/l
	L-Aspartate	200mmol/l
	NADH	0,18mmol/l
	Lactate deshydrogène (LDH)	800U/L
	Malate deshydrogénéisé (MDH)	600U/L
	α Cétoglutarate.	12mmol/l
Réactif de travail (substrat TGP+ tampon)	Tris pH 7,8	100mmol/l
	L- Alanine	500mmol/l
	Lactate deshydrogénase (LDH)	1200U/L
	α Cétoglutarate.	15mmol/l
	NADH	0,18mmol/l

Tableau III.8 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de TGO et TGP

Mode opératoire

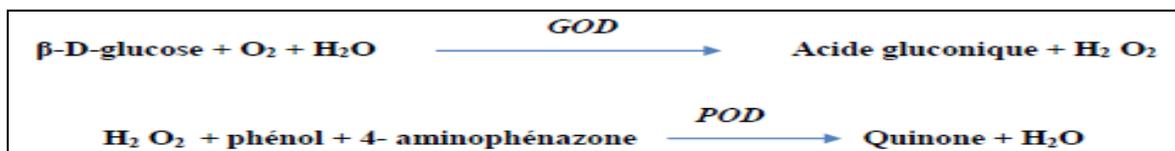
	TGO	TGP
Réactif de travail (ml)	1	1
Echantillon (μ l)	100	100
L'incubation pendant 1min à 37C°		
Après l'incubation,		
les tubes des échantillons sont mis au spectrophotomètre afin de lire l'absorbance (A).		

Tableau III.9 : Protocole de préparation des échantillons testés (TGP & TGP).

III.15.1.3. Détermination quantitative de glucose

Principe

Le glucose oxydase (GOD) catalyse le glucose sanguin en acide gluconique en formant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence de l'enzyme peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine) selon les réactions suivantes :



	composants	volume
Réactif 1	Tampon tris pH=7	100mmol/l
	Phénol	0,3 mmol/l
Réactif 2 (Enzyme)	Glucose oxydase	10000 U/L
	Péroxydase amine 4-	1000U/L
	antipyrine	2,6mmol/l
Réactif 3 (standard)	Glucose	1g/l

Tableau III.10 : Compositions chimiques des réactifs utilisés dans le dosage de la glycémie.

Mode opératoire

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-----	10 µl	-----
Echantillon	-----	-----	10 µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml
- Réactif de travail est un mélange les deux réactif (R1+R2) - La lecture les (A) se fait après l'incubation les tubes pendant 10 min à 37°C			

Tableau III.11 : Protocole de préparation de l'échantillon testé (glucose).

III.15.2 Hémogramme, Numération de la formule sanguine (FNS)

Principe

Hémogramme est un examen hématologique se fait par un appareil de mesure automate (Annexe 03), qu'il travail par deux procédure :

1- La détection du volume des cellules par variation d'impédance : cette technique a été mise au point par COULTER . Le principe repose sur la détection de la charge électrique spécifique à chaque type de cellule ou particule. Les sont traversées dans un conducteur fluide, elles provoquent des vibrations mesurables à travers un orifice. Le nombre de vibrations indique le

nombre de molécules. Chaque particule est identifiée puisque l'amplitude de chaque vibration est proportionnelle au volume de la particule (Siby, M. T. 2008).

2- La détection optique : le passage des particules du sang se fait l'une par une dans un microcanal qu'est traversé transversalement par un faisceau lumineux. L'interaction comporte une diffusion et une diffraction de la lumière dépendant de plusieurs paramètres dont la taille et la forme de la cellule. La lumière est essentiellement recueillie par une cellule photoélectrique et chaque variation d'intensité lumineuse est convertie en signal électrique (Keita, I. 2011).

Paramètres de l'hémogramme :

L'hémogramme permet de mesurer le nombre absolu et identifier de cellules contenues par unité de volume de sang comme (l'hémoglobine, l'hématocrite, numération des érythrocytes ; numération des leucocytes et numération des plaquettes). Les principales constantes érythrocytaires « Volume Globulaire Moyen (VGM) ; Volume plasmatique Moyen (VPM) ; Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH) ; Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH) et Indice de distribution du globule rouge (IDR) ». et les principes constante leucocytaires « polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, de monocytes et de lymphocytes ».

III.15.3 Dosage des marqueurs biologiques de la fonction reproductrice male

Le sang prélevé a été mis dans des tubes héparines à une température ambiante du laboratoire (20 °), puis centrifugé à une vitesse de 3000 tr / min pendant 10 min pour la séparation du sérum.

III.15.3.1 Dosage sérique de l'hormone testostérone

Les concentrations sériques de testostérone ont été mesurées à l'aide d'un appareillage automate mini analyseur VIDAS (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France). La méthode utilisée était un dosage enzymatique fluorescent de type sandwich « ELISA » en phase hétérogène où les hormones sont capturées entre deux anticorps monoclonaux murins. Les niveaux sériques de testostérone ont été obtenus en deux étapes pour une détection finale par fluorimétrie. Un contrôle de qualité a été effectué pour chaque kit utilisé VIDAS-TESTOSTERONE afin de valider les résultats.

III.15.3.2 Dosage sérique du l'antigène spécifique de la prostate (PSA)

Les concentrations sériques du PSA total ont été mesurées à l'aide d'un appareillage automate mini analyseur VIDAS (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France). La méthode utilisée était un dosage enzymatique fluorescent de type sandwich « ELISA » en phase hétérogène où les molécules des marqueurs biologiques (PSA) sont capturées entre deux anticorps monoclonaux murins. Les niveaux sériques du PSA ont été obtenus en deux étapes pour une détection finale par fluorimétrie. Un contrôle de qualité a été effectué pour chaque kit utilisé VIDAS-PSA afin de valider les résultats.

III.15.4 Dosage du cadmium tissulaire (Pris de document est la propriété du Centre National de Toxicologie).

Principe

Le dosage du cadmium dans les tissus (Foie, reins, testicules et prostate) a été réalisé par la technique d'analyse qui est la spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) au niveau de laboratoire AFAK à Oran, Algérie. La raie de résonance de l'élément à doser est envoyée dans la vapeur atomique de cet élément.

Dans ce cas, seuls les atomes à l'état E_0 peuvent absorber la radiation. La mesure de l'intensité lumineuse avant et après le passage dans la vapeur atomique permet de déterminer le pourcentage d'absorption selon la loi de Beer-Lambert.

Appareillage :

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une correction par effet Zeeman type Analyst 800 Perkin Elmer.
- Four d'atomisation type THGA (four graphite à chauffage transversal)
- Lampe de cadmium de type EDL (Electrodless discharge lamp).

Réactifs et solution d'étalonnage :

- Eau distillée acidifiée à 0,2% acide nitrique
- Acide nitrique (d=1,4) supra pur à 65%
- Solution stock de cadmium 1g.L^{-1} .
- Solution fille étalon à 1mg.L^{-1} (1ppm) obtenue par la dilution au 1/1000 de la solution stock 1g.L^{-1} dans de l'eau acidifiée à 25% d'acide nitrique.
- Solution fille étalon de cadmium à $20\ \mu\text{g.L}^{-1}$ (20 ppb) obtenue par la dilution au 1/50 de la solution intermédiaire à 1mg.L^{-1} dans de l'eau acidifiée à 25% d'acide nitrique
- Modificateur de matrice : Mélange de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ et $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
 - Ammonium dihydrogénophosphate.....10g
 - Nitrate de magnésium0,6g
 - Eau distillée.....q.s.p 1000ml

Protocole opératoire

a) Prétraitement de l'échantillon :

Les organes subiront une minéralisation comme suit :

- Introduction de 50 mg des organes dans la bombe de digestion en téflon
 - Ajouter 0,5 mL d'un mélange de 05 volumes d'acide nitrique HNO_3 et 01 volume d'acide chlorhydrique HCl supra pur. Ensuite, on le met dans l'étuve à $170\ ^\circ\text{C}$ pendant 05 heures.
 - Laisser refroidir. Puis on dissout le résidu dans l'eau distillée et compléter 05 ml avec le même solvant à l'aide de micro pipette ($1000\ \mu\text{l}$)

b) Condition opératoires :

- Longueur d'onde : 228,8 nm
- Fente : 0,7 nm
- Alimentation de la lampe EDL : 230 mA
- Gaz vecteur : Argon
- Programme thermique

c) Établissement de la courbe d'étalonnage

La spectrophotométrie d'absorption atomique (ou SAA) est une méthode quantitative et qualitative qui consistait tout d'abords à réaliser l'étalonnage.

La gamme d'étalonnage a été effectuée soit manuellement soit par auto sampler (échantillonneur automatique) à partir de la solution étalon fille à 20 ppm. Les points de gamme étaient préparés comme suit :

Le volume d'étalon ou d'échantillon à analyser (minéralisât des organes) injecté dans le four était de 20µl. Le volume de modificateur de matrice prélevé pour chaque échantillon de minéralisât était de 5µl. Les densités optiques ont été relevées après l'établissement de la moyenne de trois lectures successives de chaque solution. La concentration de l'échantillon a été directement lue sur la courbe d'étalonnage établie.

d) Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en µg de cadmium par kilogramme d'organe en prenant en compte le facteur de dilution de l'échantillon. Le domaine de linéarité sélectionné pour notre domaine de validation comprend l'intervalle de concentrations suivantes :

0,1µg.L⁻¹, 0,3µg.L⁻¹, 0,5µg.L⁻¹, 0,7µg.L⁻¹, 0,91µg.L⁻¹.

Gamme d'étalonnage :

La SAA est une méthode quantitative et qualitative, il donc faire un étalonnage :

Tableau III.12 : Gamme étalonnage de cadmium

Paramètre	I	II	III	IV	V
Concentration µg.L ⁻¹	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Densité optique (DO)	0,0069	0,0180	0,0351	0,0414	0,0591

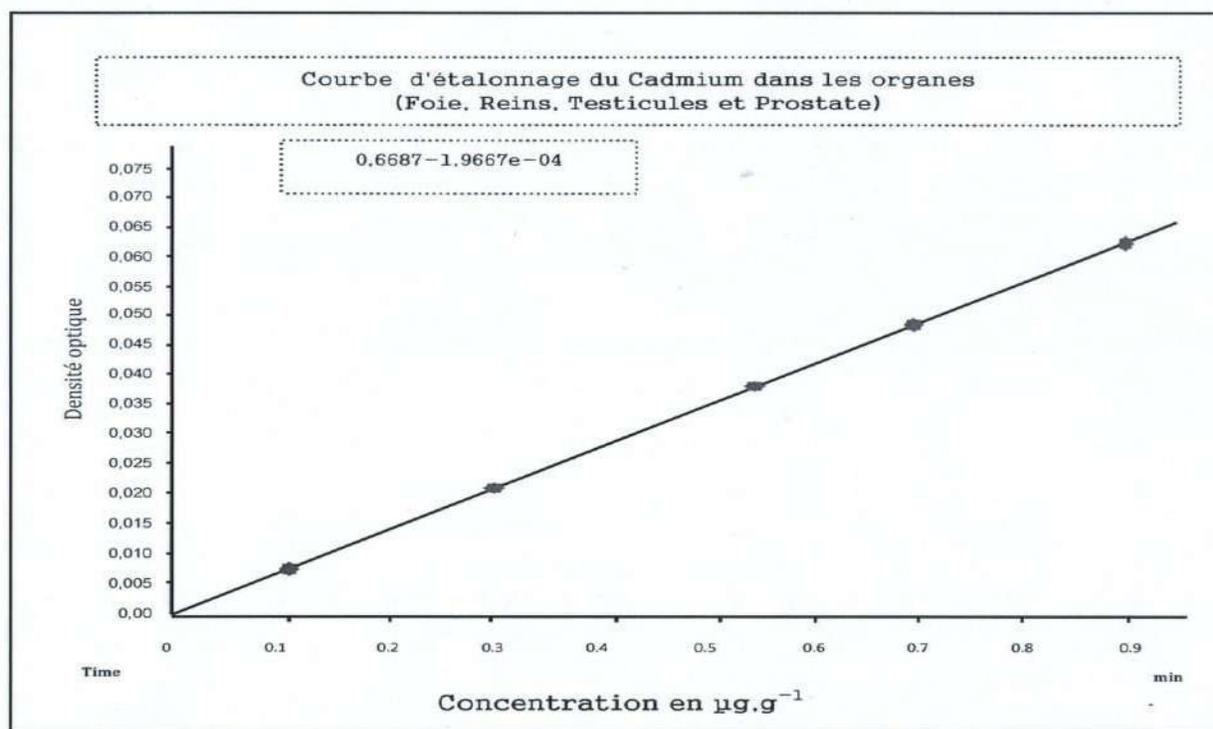


Figure III.10: Courbe étalonnage du cadmium tissulaire

III.16 Etude histologique des organes

L'étude histologique a été réalisée au niveau du service d'anatomie et pathologie à l'EPH (Etablissement Public Hospitalier) Youcef Damardji de Tiaret par une praticienne spécialiste en anatomie pathologique. Les différentes étapes étaient les suivantes: les étapes pris de site "Over-blog. Web »

a. Prélèvement

Après sacrifice des animaux, les tissus à savoir les reins, le foie, les testicules et la prostate ont été prélevés puis pesés et plongés dans un liquide fixateur.

b. Fixation

La fixation a pour but d'immobiliser les tissus dans un état aussi proche que possible que celui chez le vivant. C'est l'étape obligatoire, irréversible. Elle agit sur les molécules qui composent les tissus :

- Elle inhibe l'action microbienne

- Elle inactive les molécules qui pourraient changer la morphologie tissulaire comme les enzymes.
- Elle également préserve au maximum l'intégrité chimique des tissus.

Le formaldéhyde (CH₂O) est le seul aldéhyde gazeux. Il est dissout dans l'eau avec une saturation de 40%. Cette solution est généralement appelé « formol » ou « solution de formaldéhyde concentré ». le fixateur est préparé avec :

Formaldéhyde « concentré du commerce ».....1 volume
Eau distillée.....9 volume

c. Prélèvements des sections tissulaires

C'est une étape fondamentale dans l'analyse histologique, puisque la lecture et l'interprétation microscopique des préparations en dépendent. Après la fixation, le pathologiste effectue des prélèvements repérés et orientés par la macroscopie. Ces données sont consignées sur une fiche de macroscopie et chaque prélèvement est de ce fait individualisé. Les fragments sélectionnés doivent être placés dans les cassettes identifiées. L'ensemble des cassettes est regroupé dans le fixateur en attendant l'étape suivant (figure III.11).



Figure III.11 : Mettre des échantillons dans les cassettes

d. Déshydratation, éclaircissement et l'imprégnation en paraffine

Elle repose sur la substitution de l'eau qui est dans les tissus par une substance hydrophobe et chimiquement inactive. Elle a lieu dans une série de bains d'alcool à différents degrés, qu'est effectuée à l'aide d'un automate « Leica , TP 1020 » figure III.12, qui est programmable selon le cycle choisi et peut contenir un grand nombre de cassettes rangées dans un panier figure III.13. ensuite l'étape suivante d'éclaircissement nécessite de faire 3 bains de xylène afin

d'éliminer toutes les traces d'alcool. Et enfin l'étape dernière à l'aide d'automate, c'est l'imprégnation qui se fait par remplacement la paraffine liquide au xylène. Ces étapes sont résumées dans le tableau III. .



Figure III.12: Automate d'hydratation,
Leica TP1020



Figure III.13 : Panier des cassettes

Tableau III.13: Temps de déshydratation, éclaircissement et imprégnation

Etapes	Solvants	Temps donnés
Déshydratation	Alcool 80°	15 min
	Alcool 95°	30 min
	Alcool 100°	30 min
	Alcool 100°	30 min
Eclaircissement	Xylène	15 min
	Xylène	30 min
	xylène	30 min
Imprégnation	Paraffine	1 heures
	Paraffine	1 heures

e. Mise en blocs enrobage

A l'aide « Station d'enrobage » figure III.14 qu'il comporte deux plaques:

- ❖ une plaque de travail avec une température de 70°C (A).
- ❖ Plaque de refroidissement 15°C (B).

Mettre les échantillons dans les moules métalliques afin de couler dans des cassettes après les repérages du future plan coupe est délicatement posé. Un complément de paraffine est ajouté. Une fois la paraffine refroidie dans une deuxième plaque, les cassettes marquées et les blocs sont prêts à la coupure.



Figure III.14 : Station d'enrobage, la marque « *Leica*, EG 1160

f. Réalisation des coupes

L'appareil utilisé est le microtome à paraffine modèle «*Leica RM2235*» figure III.15. Ce l'appareille permet d'obtenir des coupes sériées disposées en forme de ruban et très fines dont l'épaisseur de 3 à 5 μm .



Figure III.15: Microtome à paraffine,
« *Leica RM 2125* ».

g. Réalisation des lames blanches**1. Confection des lames**

Les coupes sont plissées et doivent être étalés sur un milieu liquide (bain marie) à T° 45°C, figure III.16. Puis déplier les coupes recueillies à sa surface, et montées sur lame de verre. Ensuite inscrire le nom de l'échantillon à l'aide de graveur.



Figure III.16 : Bain marie, « *Leica*. HT1210

2. Séchage des lames

Cette étape permet de faciliter l'adhérence des coupes sur les lames de verre avant l'étape de déparaffinage. Le séchage des lames est réalisé dans une étuve ventilée à 58°C pendant une heure afin d'évaporer les gouttelettes d'eau et de bien adhérer la coupe.

h. Coloration

1. Déparaffinage et hydratation

Cette étape consiste à éliminer le milieu d'inclusion (paraffine) puis de la réhydrater tableau II.2.

Tableau III.14 : Batterie de déparaffinage et de réhydratation des coupes avant coloration						
Déparaffinage			Réhydratation des coupes			
Xylène 1	Xylène 2	Xylène 3	Alcool 100%	Alcool 95%	Alcool 70%	Eau courante (rinçage)
2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
3 bains de xylène pour éliminer la paraffine			3 bains d'alcool pour éliminer le xylène		Pour éliminer l'alcool	

2. Coloration et déshydratation :

La coloration standard a été appliquée pour nos lames à savoir l'hématoxyline-Eosine, qu'elle permet de colorer le noyau en bleu et le cytoplasme en rose, selon les étapes suivantes (tableau II.2) :

Tableau III.15: Batterie de coloration Hématoxyline-éosine		
Coloration	Hématoxyline Harris	2 min
	Alcool acide	2 min
	Bicarbonate de lithium	2 min
	Alcool 95%	2 min
	Eosine alcoolique	20 seconds
	Eau robinet	quelque second
Déshydratation	Alcool absolu 100%	2 min
Éclaircissent	Xylène	2 min

i. Montage des coupes

Il consiste à fixer à l'aide d'une résine (Eukitt) synthétique une lamelle couvre-objet sur la coupe afin de protéger de la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent à l'air et des bris mécaniques. Les coupes colorées ne supportent pas le dessèchement. Il est nécessaire d'interposer entre la lame et la lamelle un milieu répondant à certaines rigueurs.

A

- Abderrezak, R., and S. AIB Analyse phytochimique et activités biologiques des extraits aqueux de *Satureja calamintha* des monts de Maadid (région de Hodna). In. Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila. 2019.
- AD, N., and O. ZEKRI Caractérisation phytochimique et étude de quelques activités biologiques de deux plantes, *Capparis spinosa* et *Camellia sinensis*. 2019.
- Adida, H., N. Benariba, A. Bechiri, E. Chekroun, and R. Djaziri Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie* 14:207-212. 2016.
- Allangba, M.R.A., A.B. Kadja, N.K. Guessennnd, J.A. Mamyrbékova-Békro, and Y.-A. Békro Etude phytochimique bio-guidée, activités antibactérienne et analgésique de décoctions éthanoliques d'une Mimosaceae de Côte d'Ivoire/Bio-guided phytochemical survey, antibacterial and analgesic activities of ethanolic decoctions of a Mimosaceae from Côte d'Ivoire. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 18:569. 2016.
- Alilou, H., B. Bencharki, L.I. Hassani, and N. Barka Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraveolens* subsp. *odorus*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* 10. 2014.
- Amonkan, A., A. Konan, L. Kouakou, G. Bouafou, M. Bleyere, M. Ahui, V. Zannou, H. Ouattara, J. Datte, and S. Kati-Coulibaly Criblage phytochimique et effets d'un extrait aqueux de feuilles de *Ficus exasperata* Vahl. 1805 (Moraceae) sur la pression artérielle et l'activité contractile du cœur chez les mammifères. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 4. 2010.
- Anses, A. Valeur toxicologique de référence pour le cadmium et ses composés. 2012.

B, D et F

- Bamba, M. criblage phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne de dix (10) plantes médicinales de la région du Bafing (cote d'ivoire). 2013.
- Benaicheta Nora, Fatima Zohra LABBACI, Malika BOUCHENAK, Farida Ouda BOUKORTT. Sardine proteins mitigate hyperglycemia and oxidative stress in type 2 diabetic rat *Nutr. Santé*, Vol. 04.N°01: 6-15.2015.
- Bssaibis, F., N. Gmira, and M. Meziane Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rev Microbiol Ind San et Environn* 3:44-45. 2009.
- Chaouch, T. M. (2014). Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. *Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (UABT)*, 35.
- Dif, M., H. Benchiha, Z. Mehdadi, F. Benali-Toumi, M. Benyahia, and K. Bouterfas Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie* 13:314-319. 2015.
- Fawzia, B. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Université

- Abou Bakr Belkaid-Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. In. Thèse de Doctorat. 2015.
- Feknous, S., F. Saidi, and R.M. Said Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature & Technology*:7. 2014.
- Floegel, A., D.-O. Kim, S.-J. Chung, S.I. Koo, and O.K. Chun Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* 24:1043-1048. 2011.

H, I et M

- Houia, A., A. Chouikh, F. Alia, E.H. Adjaj, A. Chefrour, and Y. Ait Kaki Antibacterial activity and DPPH• radical scavenging of different metabolites extracted from two plants: essential oil from (*Matricaria recutita* L.) and flavonoids from flowers and leaves of (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie* 25:26-32. 2018.
- Issa I and Bule M. A comparative study of the hypoglycemic effect of aqueous and methanolic extracts of *Myrtus communis* on alloxan induced diabetic Swiss albino mice. *Med Aromat Plants* 4: 2167-0412. 2015.
- Isidore, S.A., A. Kouabenan, O.K. Etienne, and Z.G. Noël Étude botanique, tri phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits de feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll. Arg. 2019.
- Keita, I. (2011). Profil de l'hémogramme chez les donneurs volontaires de sang au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako, Mali.
- Langeron, M., 1934. Précis de microscopie (Eds) Masson et Cie, Paris, France.
- Malekpour A, Dehghani S, Zahedi S, Eskandari F. Effects of the hydro-ethanol extract of *Myrtus communis* L. On blood glucose level and histopathological changes in alloxan-induced diabetic rats. *Middle-East J Sci Res* 12: 517-22. 2012
- Mansouri, A., G. Embarek, E. Kokkalou, and P. Kefalas Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food chemistry* 89:411-420. 2005.
- Medana, C., F. Carbone, R. Aigotti, G. Appendino, and C. Baiocchi Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* 19:32-39. 2008.
- Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (Doctoral dissertation).

R ,T et P

- Ramírez, J.H., M. Palacios, O. Tamayo, R. Jaramillo, and O. Gutiérrez Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology* 109:348-353. 2007.

Références

- Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8: 121-137.
- SIBY, M. T. (2008). Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-stomatologie.
- Talbi, H., A. Boumaza, K. El-Mostafa, J. Talbi, and A. Hilali Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Science* 6:1111-1117. 2015.
- Prat, R. Expérimentation en biologie et physiologie végétales. Quae. 2007
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Over-blog."anatomopathologie techniques en anatomopathologie."
<http://bibirou.over-blog.com>. /<http://bibirou.over-blog.com/2020/01/anapath-suite-chapitre-vi-fixation-en-microscopie-optique.html>
(accessed 25 janvier 202)

PARTIE EXPERIMENTALES

RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ère} Volet : Extraction, screening chimique, tests anti-oxydatifs et dosages des composants des feuilles de *Myrtus communis*

Ce chapitre présente les résultats de l'étude, englobant les différents paramètres chimiques, réalisée sur une partie végétale de la plante médicinale « *Myrtus communis* » à savoir les feuilles. Ces résultats sont présentés ci-dessous renfermant des données sur les expérimentations histologique et analytique (screening phytochimique et dosage quantitative des composants des feuilles de la plante par les techniques de CPG et HPLC) et l'activité antioxydante par DPPH.

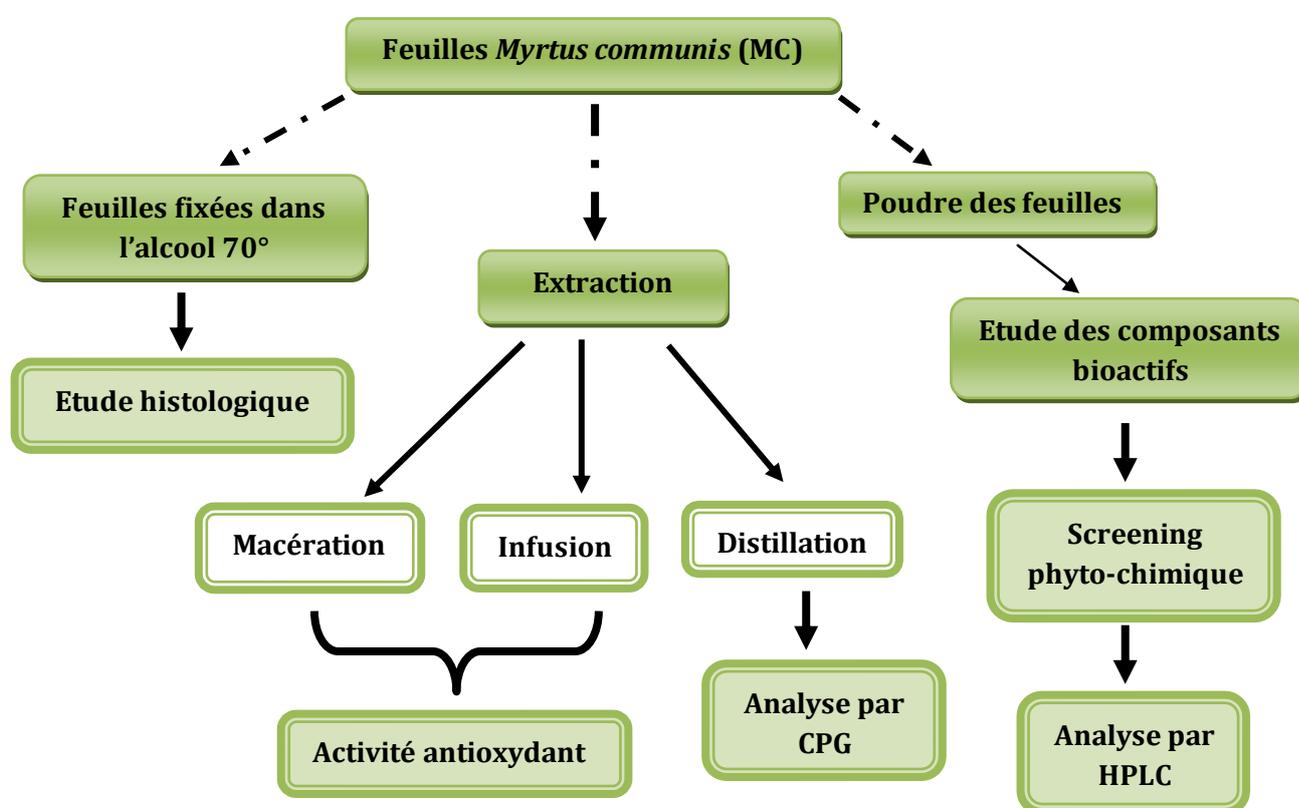


Schéma IV.1 : Design de l'étude des paramètres chimiques concernant la partie végétale (Feuilles) de *Myrtus communis*.

IV.1 Histologie de la feuille *Myrtus communis*

L'observation des coupes anatomiques des feuilles de *M. communis* (figure IV.1) a été réalisée à l'aide du microscope optique. Il a été ainsi permis d'une part de visualiser les différents tissus et d'une autre part de localiser les poches sécrétoires des huiles essentielles au niveau des feuilles de *M. communis*. L'étude des coupes histologiques transversales des feuilles a révélé la présence des poches sécrétrices sub-épidermiques au niveau des feuilles qui sont impliquées dans la synthèse de l'huile essentielle.

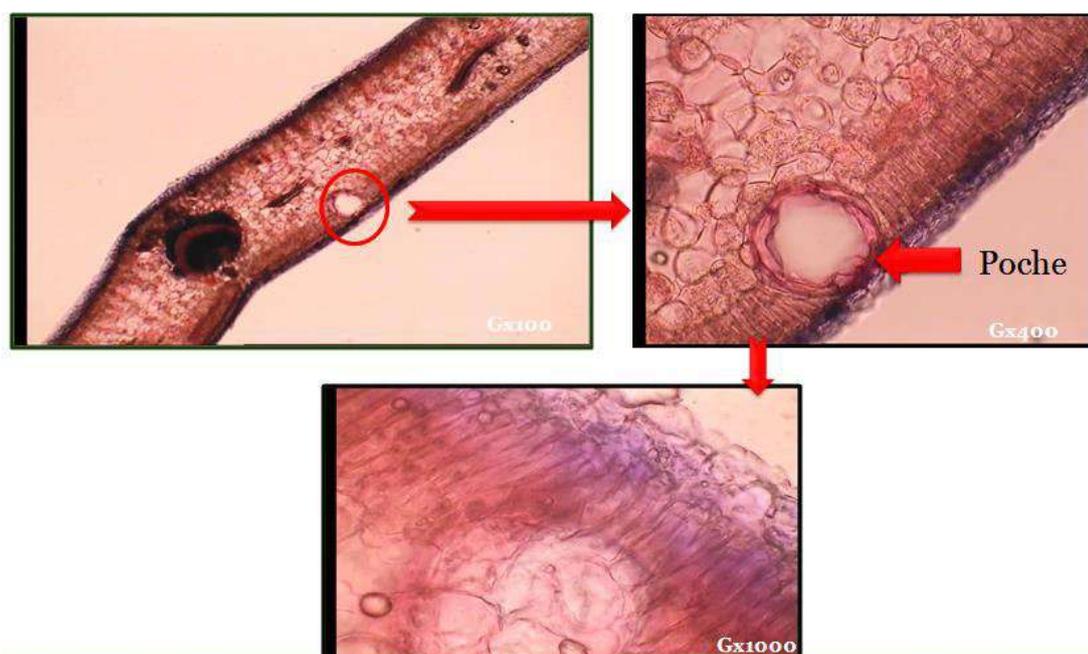


Figure IV.1: Micro-photos des coupes anatomique et histologique de la feuille de *M. communis*

IV.2 Screening phyto-chimique et ses principes bioactifs

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur la poudre des feuilles de *M. communis* en utilisant différents solvants organiques de polarité décroissante et des réactifs spécifiques d'analyse chimique. Les résultats obtenus ont été mentionnés dans le tableau IV.1. L'analyse chimique a révélé la présence de terpènes, flavonoïdes, tanins, quinones, des anthraquinones, alcaloïdes et autres composés réducteurs dans la poudre des feuilles alors que les coumarines, anthocyanes, saponines et stéroïls étaient totalement absents dans la poudre des feuilles de *Myrtus communis*.

Tableau IV.1: Screening phyto-chimique de la poudre des feuilles de *M. Communis*

Métabolites secondaires		Feuilles MC	Résultats
Terpènes		+++	
Flavonoïdes		+++	
Tanins		+++	
Quinones		+++	
Anthraquinones		++	
Alcaloïdes	Mayer	+	
	Dragendorff		
Coumarines		+	
Anthocyanes		-	
Saponines		-	
Stérols		-	
Composés réducteurs		+++	

Les résultats sont classés selon : Réaction fortement positive : +++ ; Réaction faiblement positive : + ; Réaction moyennement positive : ++ ; Réaction négative :-.

IV.3 Activité anti-oxydante des extraits de feuilles de *Myrtus communis*

Les extraits aqueux et hydro-alcooliques, obtenus par la macération et l'infusion à partir des feuilles de *Myrtus communis* (MC), ont permis d'aboutir à des rendements respectifs de 31,4 et 44,4 %. Concernant l'huile essentielle (HE), il a été enregistré un faible rendement de l'ordre de 0,15 %. L'huile essentielle a été utilisée pour identifier les composants bioactifs volatiles par la technique d'analyse qui est la chromatographie en phase gazeuse (CPG) en raison de leur teneur et volatilité.

Les profils des activités anti-oxydantes des extraits hydro-méthanolique (EHM) et aqueux (EA) ont été présentés dans les courbes ci-dessous (figure IV.2 et figure IV.3). Les taux d'inhibition correspondant à des valeurs nécessaires pour diminuer de 50 % la concentration initiale des radicaux libres DPPH* ont été déterminés par la régression linéaire à partir du tracé graphique (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits EHM et EA). La comparaison des activités anti-oxydantes de l'extrait EHM des feuilles de MC obtenu par macération ($IC_{50}=0.014\text{mg/ml}$) et l'extrait EA obtenu par infusion ($IC_{50}=0,0027\text{mg/ml}$) avec celle exprimée par l'acide ascorbique pur servant de standard ($IC_{50}=0,003\text{mg/ml}$) a montré que l'EA présentait un effet inhibiteur ou antioxydant plus élevé que celui de l'extrait EHM. Alors que, l'effet antioxydant de l'extrait EHM était inférieur d'environ 4 fois par rapport au standard, et ce dernier était inférieur une fois par rapport à l'extrait EA. (EHM < standard < EA)

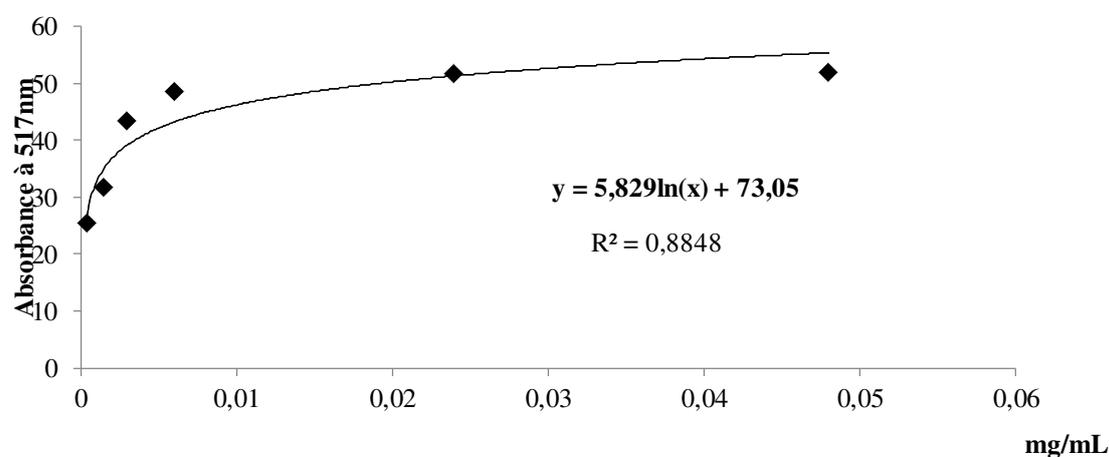


Figure IV.2 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'EHM.

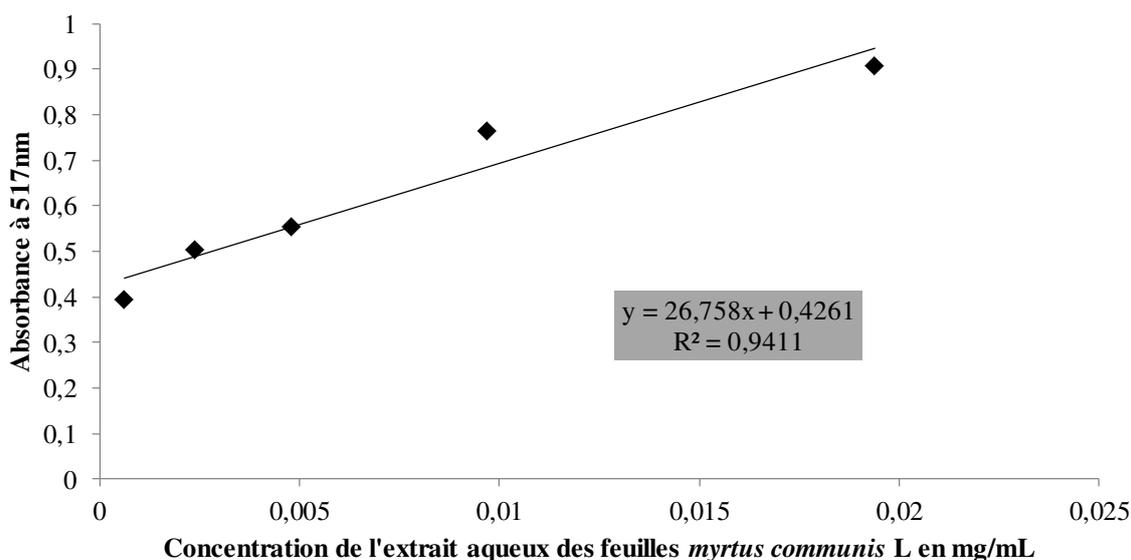


Figure IV.3: Taux d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'EA

IV.4 Chromatographie liquide à haute performance HPLC et en phase gazeuse CPG

L'analyse de l'extrait des feuilles du *Myrtus communis* par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier 30 composés importants avec un pourcentage élevé soit de 99,97%. Cette analyse a été marquée par la prédominance de flavonoïdes (88,59 %) et d'acide phénolique (3,94 %). Parmi ces deux familles de métabolites secondaires, il a été observé des taux différents pour les composés suivants ; à savoir génistéine (29,48 %), méthylquercétine (16,56 %), kaempférol (13,26 %), pinobanksine-3-acétate (9,18 %), cafféate de prényle (6,89 %), quercétine bis-méthylée (3,66 %), quercétine (3,61 %), acide caféique (3,53 %), tectochrysin (3,39 %), acacétine (2,88 %), naringinine (2,12 %) et pinocembrine (2,07 %). Les autres composés étaient faiblement représentés tels que les terpènes (0,25%) et les stilbènes (0,07 %) (Tableau IV.2).

Tableau IV.2 : Composition de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles *Myrtus communis* déterminée par HPLC.

N	Composition	Formule	RT(min)	%
01	Acacétin	C16 H12 O5	11.786	2.88
02	naringinine	C15 H12 O5	11.833	2.12
03	Tectochrysin	C16 H12 O4	11.85	3.39
04	catéchine	C15 H14 O6	11.864	0.03
05	methylquercétine	C16 H12 O7	11.876	16.56
06	Pinocembrin	C15 H12 O4	11.896	2.07
07	quercétine	C15 H10 O7	11.933	3.61
08	sucrose	C12 H22 O11	11.958	0.01
09	Bis-methylatedquercétine	C17 H14 O7	11.966	3.66
10	Acide Ferulicmethyl ester	C11 H12 O4	11.978	0.01
11	Pinobanksin-3-acetate	C17 H14 O6	12.004	9.18
12	genistéine	C15 H10 O5	12.015	29.48
13	Methoxy-pinobanksin	C16 H14 O5	12.052	1.43
14	chry sine	C15 H10 O4	12.149	0.31
15	acide cinnamique	C9 H8 O2	12.198	0.25
16	acide caféique	C9 H8 O4	12.237	3.53
17	Prenylcaffeate	C14 H16 O4	12.242	6.89
18	Coumaricacidmethyl ester	C10 H10 O3	12.251	0.12
19	Kaempferol	C15 H10 O6	12.284	13.26
20	Resveratrol	C14 H12 O3	12.42	0.07
21	Pinobanksin-3-propionate	C18 H16 O6	12.553	0.04
22	acide coumarique	C9 H8 O3	12.904	0.01
23	Pinostrobin	C16 H14 O4	13.21	0.57
24	Totarol	C20 H30 O	13.269	0.09
25	Isoprenylcoumarate	C14 H16 O3	13.417	0.01
26	Isoprenylferulate	C15 H18 O4	13.598	0.04
27	Acide pimarique	C20 H30 O2	13.97	0.12
28	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	C10 H10 O4	14.367	0.03
29	Tyrosol	C8 H10 O2	14.429	0.12
30	Hexadecanoicacid	C16 H32 O2	14.516	0.08
Total identifié				99,97

Tableau IV.3 : Classes des composés des feuilles de *Myrtus communis*

Constituants	%
Acide phénolique	3.94
Flavonoïde	
• Flavonol	77.22
• Flavone	6.58
• Flavanol	0.03
• Flavanone	4.76
Totale	88.59
Terpène	0.25
Stilbène	0.07
Autre	0.21

La composition de l'huile essentielle a été analysée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Le chromatogramme, la nature chimique des composés, les pourcentages et les temps de rétention pour chaque composé étaient

présentés dans le (Tableau IV.3). L'étude analytique d'HE a suggéré la présence et l'identification de 15 composés (96,07 %) dont les mono terpènes (46,45 %), les alcools mono terpéniques (26,10 %), les oxydes terpéniques (22,87 %) et les sesquiterpènes (0,35 %). Les principaux composés étaient : 1,8-cinéole (27,01%), α -pinène (21,07%), acétate de myrtenyle (20,19%), limonène (13,70%), et à moindre pourcentage l'acétate de linalyle (0,31 %), myrténol (0,21 %) et humulène (0,05 %).

Tableau IV.4 : Composition d'HE des feuilles *Myrtus communis* par GC / SM

N°	Composés	RT (min)	%
Mono terpène			
1	α -pinène	14,940	21,070
2	β -pinène	15,220	0,410
3	Limonène	16,150	13,700
4	Linalool	17,900	3,840
5	α -Terpinol	18,480	4,730
6	Myrténol	20,660	0,210
7	Methyl eugénol	27,450	1,220
8	P-Cymène	28,610	0,150
Total			45,33
Oxydes terpénique			
1	1,8- cinéole	17,420	27,01
Total			27,01
Alcools monoterpéniques			
1	Acétate de géranyle	26,120	0,880
2	Acétate de linalyle	29,150	0,310
3	Acétate myrtenyle	23,350	20,19
Total			21,38
Sesquiterpènes			
	Humulène	30,170	0,050

Oxyde de caryophyllène	30,410	0,640
Total		0,69
Total identifiés		96.070%
Nombre identifiés	15	

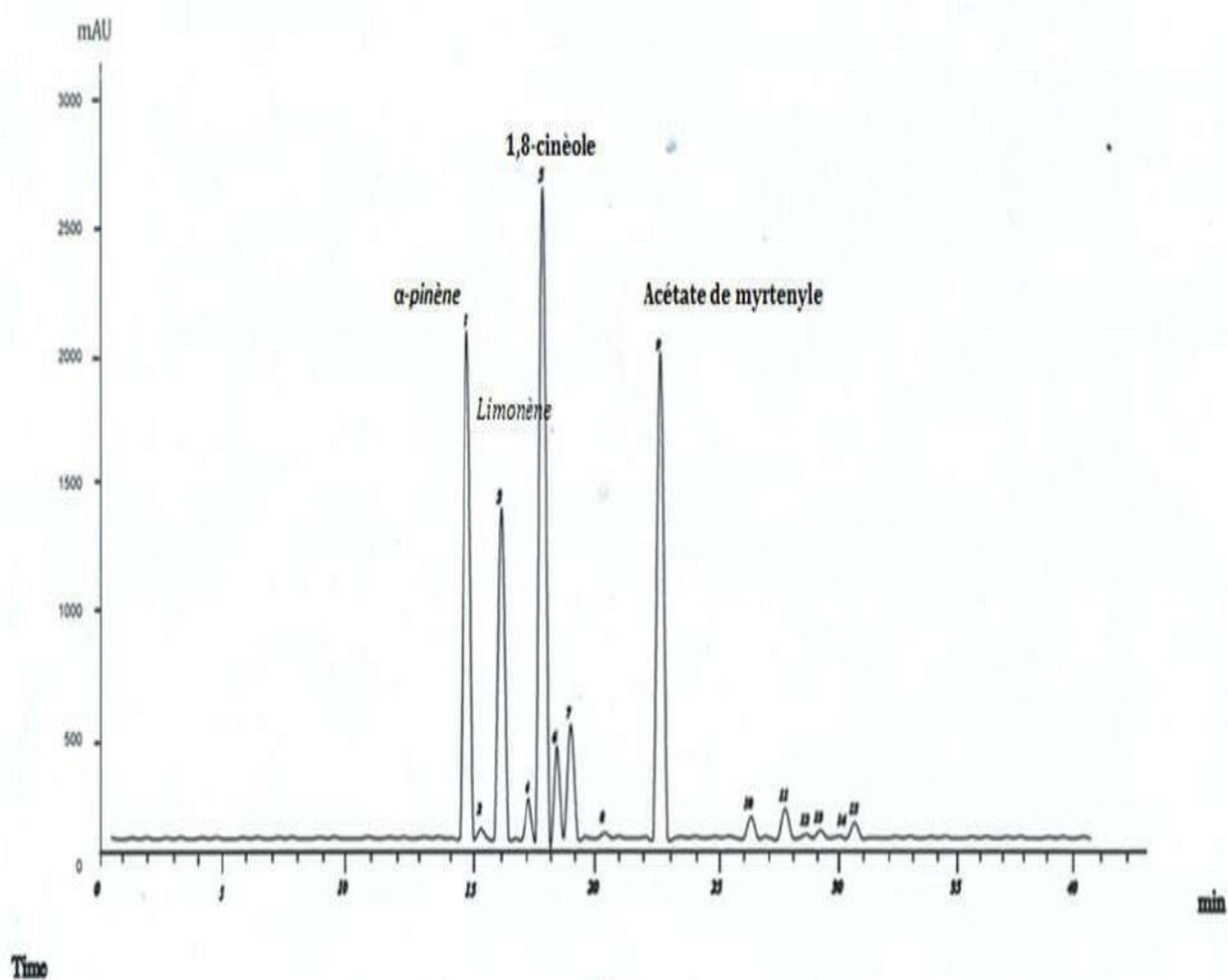


Figure IV.4 : Chromatogramme GC/SM de l'huile essentielle de *Myrtus communis*.

IV.5 DISCUSSION

Le bassin méditerranéen, incluant le territoire Algérien, est caractérisé par la présence de plantes aromatique et médicinale dont la famille de Myrte. Le genre Myrte ainsi que ses espèces sont beaucoup plus utilisables par la population Algérienne à des fins thérapeutiques. Ces herbes constituent une source de métabolites secondaires responsables de diverses vertus pharmacologiques. La disponibilité de ces molécules naturelles bioactives est potentiellement influencée par des facteurs environnementaux tels que la localisation géographique, la nature du sol, les parties de la plante utilisées et la saison de récolte (Beddou, 2015). Actuellement grâce au développement des méthodes d'analyse physico-chimique et biologique, le choix d'une meilleure méthode d'extraction des composés antioxydants est devenu crucial pour apprécier le rôle préventif et/ou curatif de ces plantes. Dans ce contexte, le choix d'une partie végétale et des techniques d'extraction et d'analyse appropriées constituait réellement un tournant décisif ou précurseur de cette présente étude et de sa démarche méthodologique expérimentale.

L'observation faite au niveau des feuilles de l'espèce MC a révélé la présence une seule structure endogène de l'appareille sécrétoire de l'huile essentielle (HE). Ce résultat est similaire à celui de (Taleb-Toudert, 2015). Le manque de poches sécrétoires est responsable d'un faible rendement en huile essentielle (HE) avoisinant les 0.15 %. Cette donnée est en désaccord avec le travail de (Anwar, et al., 2017) qui a rapporté un rendement de 0,59 %. La différence de rendement en HE pourrait être attribuée à plusieurs facteurs dont essentiellement la période de récolte, la situation géographique et l'environnement dans lequel se développe une plante influent considérablement sur la composition chimique de l'huile essentielle, aussi la durée de séchage et la technique d'extraction des huiles essentielles y sont impliquées.

L'obtention d'un faible rendement en huile essentielle incite à appliquer préférentiellement la technique de chromatographie en phase gazeux, CPG/SM qui est plus efficace pour l'étude de la composition chimique des HE extraites des feuilles de *Myrtus communis*. Les études comparatives des résultats obtenus de la composition chimique de l'HE de MC ont montré la présence importante des flavonoïdes comme α -pinène ; limonène ; 1,8 cinéol et acétate de myrtenyl (Ashnagar, et al, 2009 ; Messaoud et al, 2012; Zilkah et al 2014; Touaibia, 2014 ; Hasdemir et al, 2016; Salehifar et al, 2017; Anwar et al., 2017). Les résultats de cette étude convergent avec derniers.

Les résultats des tests qualitatifs, ou screening chimique, réalisés sur la poudre des feuilles de *Myrtus communis* (MC) ont permis de déterminer la présence de certains métabolites

secondaires (terpénoïde ; flavonoïde ; tanins ; quinone ; anthraquinone ; alcaloïde ; composés réducteur). Ces composés confèrent à cette plante des propriétés biologiques très importantes comme le tanin permet de stopper l'hémorragie et de lutter contre l'infection. Les flavonoïdes ont des propriétés anti-oxydante, antivirale, antibactérienne et tinctoriale les prédestinant à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques (Labiod, 2016). Des travaux antérieurs menés sur *Myrtus communis* sont en accord avec nos résultats (Serio et al, 2014; Bayan et al, 2017). Dans le même contexte, les tests quantitatif et qualitatif réalisés par la technique HPLC ont permis d'identifier 30 composants représentés par 88,6 % de flavonoïdes dont le génistéine était de 29,48 %, la méthylquercétine (16,56%), le kaempférol (13,26 %), la pinobanksine-3-acétate (9,18%) et l'acide caféique (3,53 %). Les résultats obtenus pour les différents travaux montrent que l'extrait des feuilles (MC) est formé essentiellement de génistéine, la méthylquercétine, le kaempférol, la pinobanksine-3-acétate et l'acide caféique (Tuberoso et al, 2010 ; Snoussi et al, 2011 ; Aleksic et al 2014; Messaoud et al, 2012 : Taamalli et al, 2013).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement (Tahar, S et al.,2015). La procédure de l'extraction des métabolites secondaires a été effectuée par deux méthodes (macération et infusion) afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des deux extraits des feuilles *Myrtus communis* (MC) à savoir l'extrait hydro-méthanolique (EHM) et l'extrait aqueux (EA). Une extraction alcoolique (méthanol) de MC effectuée par (Kanoun, 2011) a aboutit à un rendement de 25,03 % et l'extraction aqueuse menée par (Bayan et al.,2017) a conduit à un rendement de 29.66 %. Ces valeurs sont largement inférieures à celles de nos deux types d'extraits (EHM et EA) qui étaient respectivement de 31,4 % et 44,4 %. Ces différences entre les rendements pourraient être attribuées à plusieurs facteurs pouvant influencer la quantité des principes actifs comme le mode, le temps d'extraction, la température, la nature des solvants, la préparation de la matière végétale (broyage, granulométrie) etc..... (Telli et al., 2010; Ncube et al, 2008). Les activités anti-oxydantes des extraits (EHM et EA) sont dues essentiellement à la présence des composants bioactifs. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres telles que : la méthode de FRAP, ORAC et la méthode utilisant le radical DPPH (Yoshimura et al., 2008). Le radical de DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et direct en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. (Yoshimura et al., 2008). Selon les résultats enregistrés, l'extrait aqueux (EA) des feuilles de la plante MC a permis d'obtenir un bon pouvoir antioxydant ($IC_{50}=2,7\mu g/ml$), meilleur que celui exprimé

par l'extrait aqueux (EHM) (IC₅₀=14µg/ml). Par contre, certains auteurs ont démontré que l'extrait alcoolique de *Myrtus communis* a un pouvoir antioxydant plus élevé que celui de l'extrait aqueux chez d'autres plantes médicinales (Gerdelli et al., 2008 ; Bayan et al., 2017). D'autres travaux, ont été obtenus la valeur IC₅₀= 0,481 mg/ml de l'extrait méthanolique des feuilles *Myrtus communis*, qui par rapport à nos résultats, cette valeur est assez faible. Concernant l'activité antioxydante (AOX) de l'extrait (EA), aucun travail n'a été effectué sur ce type d'extrait.

Il s'est avéré que la comparaison de nos résultats avec ceux d'autres études était difficile pour plusieurs raisons entre autres les facteurs environnementaux qui pouvaient influencer sur la distribution qualitative et quantitative des composés phénoliques des deux types d'extraits étudiés et de leur impact sur l'ensemble de la composition. Parmi ces facteurs, il est plausible de citer notamment le facteur climatique (Pezhmanmehr et al., 2010), la période de récolte, le procédé de conservation (Bampouli et al., 2015), la méthode d'extraction et de dosage des métabolites secondaires et le choix du solvant organique. Tous ces facteurs cités pourraient d'une manière ou une autre influencer sur la composition des extraits des parties végétales d'une plante médicinale et par conséquent sur les teneurs en poly-phénols et en flavonoïdes totaux (Hayder et al., 2008).

A

- Aleksic, V., and P. Knezevic Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research* 169:240-254. 2014.
- Anwar, S., R.A. Crouch, N.A. Awadh Ali, M.A. Al-Fatimi, W.N. Setzer, and L. Wessjohann Hierarchical cluster analysis and chemical characterisation of *Myrtus communis* L. essential oil from Yemen region and its antimicrobial, antioxidant and anti-colorectal adenocarcinoma properties. *Natural product research* 31:2158-2163. 2017.
- Ashnagar, A., N.G. Naseri, and A. Bayemani Isolation and determination of the major chemical compounds present in essential oil of the leaves of *Myrtus* plant grown in Khuzestan Province of Iran. *Asian Journal of Chemistry* 21:4969. 2009.

B

- Bampouli, A., K. Kyriakopoulou, G. Papaefstathiou, V. Louli, N. Aligiannis, K. Magoulas, and M. Krokida Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering* 167:25-31. 2015.
- Bayan, Y., M. YILAR, and A. Onaran *Heracleum platytaenium* Boiss. ve *Myrtus communis* L. bitki uçucu yağlarının *Alternaria solani* Ell. and *G. Martin* ve *Monilia laxa* Aderh. and Ruhl.(Honey) üzerine antifungal aktivitesinin araştırılması. *Akademik Ziraat Dergisi* 6:11-16. 2017
- Beddou, F., C. Bekhechi, R. Ksouri, D.C. Sari, and F.A. Bekkara Potential assessment of *Rumex vesicarius* L. as a source of natural antioxidants and bioactive compounds. *Journal of food science and technology* 52:3549-3560. 2015.

G,H, K

- Gardeli, C., P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, and M. Komaitis Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry* 107:1120-1130. 2008.
- Hasdemir, B., H. Yaşa, H.Ç. Onar, and A.S. Yusufoglu Investigation of Antioxidant Activity of *M. comminus* L. from Turkey due to its Essential Oil Composition and Polyphenolic Content. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry* 3:427-438.2016.
- Hayder, N., I. Bouhlel, I. Skandrani, M. Kadri, R. Steiman, P. Guiraud, A.-M. Mariotte, K. Ghedira, M.-G. Dijoux-Franca, and L. Chekir-Ghedira In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro* 22:567-581. 2008.
- Kanoun, K. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L.(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). 2011.

L,M

- Labiod, R. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydant et activité fongicide. Université Badji Mokhtar-Annaba. p 78. 2016.
- Messaoud, C., A. Laabidi, and M. Boussaid *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities. *Journal of food science* 77:C941-C947. 2012.
- Ncube, N., A. Afolayan, and A. Okoh Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology* 7. 2008.

S T

- Salehifar, E., M. Abbasi, and R. Bahari-Kashani Effects of Myrtle (*Myrtus communis*) essential oil on growth performance, carcass characteristics, intestinal morphology, immune response and blood parameters in broiler chickens. *Journal of Livestock Science* 8:63-71. 2017.
- Serio, A., C. Chaves-López, M. Martuscelli, G. Mazzarrino, C. Di Mattia, and A. Paparella Application of Central Composite Design to evaluate the antilisterial activity of hydro-alcohol berry extract of *Myrtus communis* L. *LWT-Food Science and Technology* 58:116-123. 2014.
- Snoussi, A., M.M. Chaabouni, N. Bouzouita, and F. Kachouri Chemical composition and antioxidant activity of *Myrtus communis* L. floral buds essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 23:10-14. 2011.
- Taamalli, A., I. Iswaldi, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, and M. Zarrouk UPLC–QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochemical Analysis* 25:89-96. 2014.
- Tahar, S. B., Hadj-Mahammed, M., & Yousfi, M. (2015). Etude de l'Activité Antioxydante des Extraits Phénoliques de l'Atriplex Halimus L et de l'Haloxylon Scoparium Pomel du Sahara Septentrional. *Hawliyyāt al-'Ulūm wa-al-Tiknūlijyā*, 281(5389), 1-10.
- Taleb-Toudert, K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien): évaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). In. Université Mouloud MAMMERI. 2015.
- Telli, A., N. Mahboub, S. Boudjeh, O. Siboukeur, and F. Mouti-Mati Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) variété Ghars. *Annales des Sciences et Technologie* 2:107-114. 2010.
- Touaibia, M., and F. Chaouch composition de l'huile essentielle et des extraits alcooliques de l'espèce saharo-endémique *myrtus nivellei* Batt et Trab (myrtaceae). *Revue des Bioressources* 4. 2014.
- Tuberoso, C.I.G., A. Rosa, E. Bifulco, M.P. Melis, A. Atzeri, F.M. Pirisi, and M.A. Dessì Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry* 123:1242-1251. 2010.

P,Y et Z

- Pezhmanmehr, M., D. Dastan, S.N. Ebrahimi, and J. Hadian Essential oil constituents of leaves and fruits of *Myrtus communis* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 13:123-129. 2010.
- Yoshimura, M., Y. Amakura, M. Tokuhara, and T. Yoshida Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Journal of natural medicines* 62:366-368. 2008.
- Zilkah, S., and E.E. Goldschmidt Myrtle (*Myrtus communis* L.)—A native Mediterranean and cultured crop species. In: *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East*. Springer. pp 253-267. 2014.

IV.6 Etude physiologique

IV.6.1 Variation du poids corporel

Le suivi régulier, tous les cinq jours, de l'évolution du poids corporel (PC) des animaux durant la période d'expérimentation a permis de tracer une courbe représentative de l'évolution du PC (figure IV.5 , tableau IV.5), ainsi que d'évaluer le gain de poids pondéral durant cette période d'expérimentation figure IV.6.

Les résultats du poids corporel ont montré que les rats co-traités par le cadmium et l'extrait des feuilles de la plante (extrait hydro-méthanolique ou extrait aqueux) présentaient une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids corporel (PC) (figure II.1) ; en effet le (PC) passe de $188,76 \pm 4,93$ g à $219,05 \pm 0,19$ g chez le groupe témoin (GR1) et de $128,57 \pm 5,38$ à $181,97 \pm 3,05$ g et de $141,41 \pm 2,54$ à $180,03 \pm 1,06$ g chez les GR3 (Cd+EHM) et GR4 (Cd+EA) respectivement.

Concernant les rats qui recevaient seulement l'extrait des feuilles (EHM ou EA) groupes 5 et 6 à une dose 1g/kg/j pendant 60 jours, il a été observé une augmentation non significative du poids corporel des animaux. Le poids passait de $136,22 \pm 6,20$ à $170,80 \pm 4,55$ g pour le groupe 5 qu'il recevait EHM, et $162,77 \pm 5,6$ à $188,77 \pm 4,02$ g pour le groupe 6 qu'il recevait (EA).

En revanche, les animaux recevant le métal lourd (Cd) pendant 60 jours à une dose de 18 mg/kg/j ont affiché une diminution non significative du poids corporel. En effet, il passait de $195,03 \pm 2,72$ à $173,22 \pm 1,96$ g.

Les valeurs du gain de poids corporel variaient dans le même sens, car ce gain de poids qui consiste en la différence entre le poids finale et le poids initial (figure IV.6), était respectivement par l'ordre des groupes de $30,29 \pm 1,25$ g ; $12,81 \pm 1,32$ g ; $53,4 \pm 0,58$ g ; $38,59 \pm 1,45$; $34,58 \pm 2,23$ g ; $26 \pm 1,12$ g.

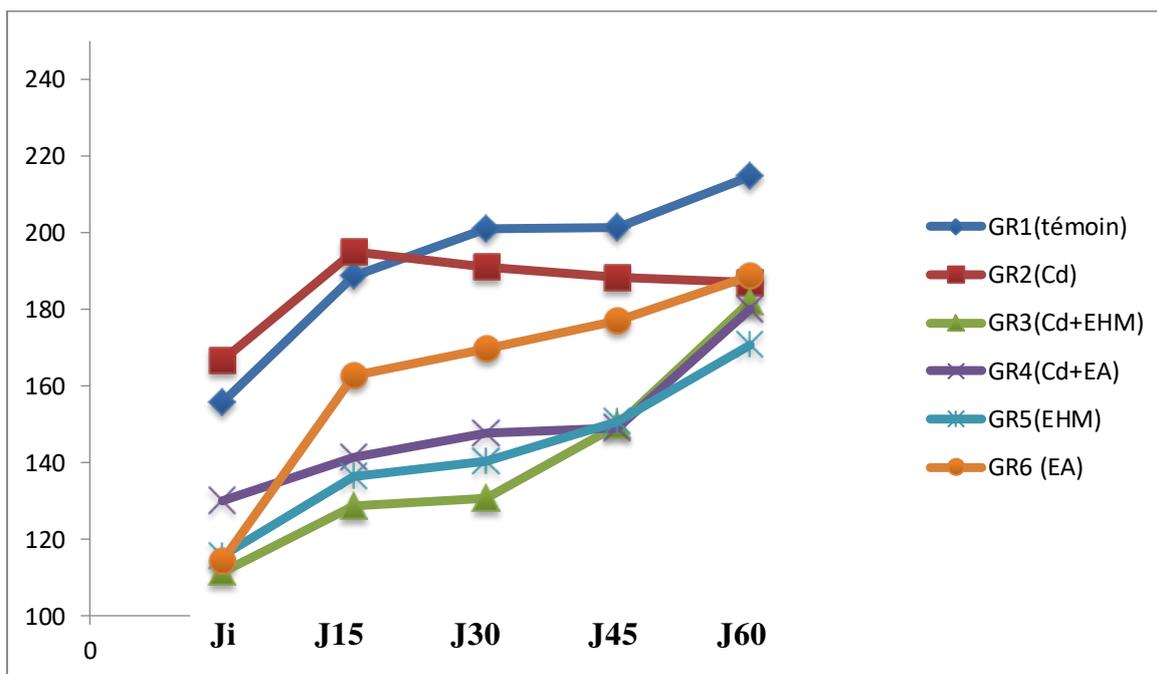


Figure IV.5 : Effet des traitements (Cd, EHM et EA) sur l'évolution du poids corporel des rats

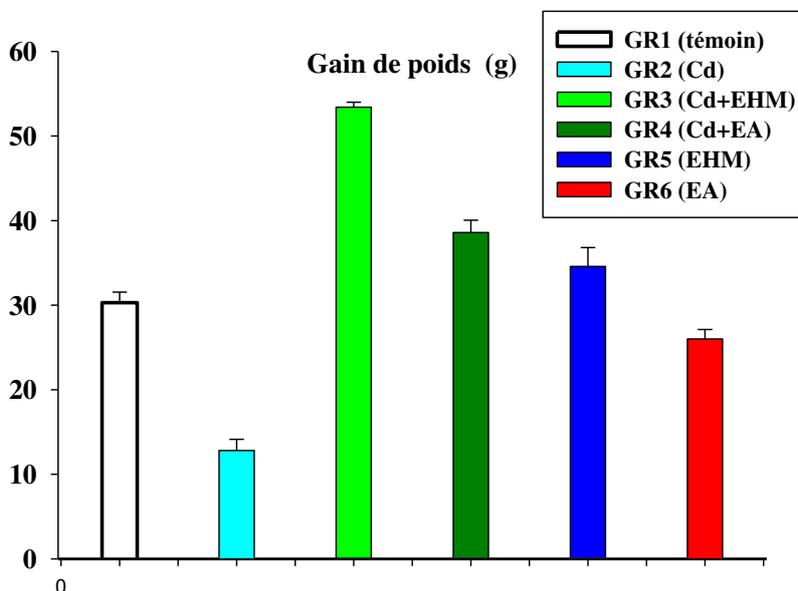


Figure IV.6 : Effet des traitements (Cd, EHM, et EA) sur l'évolution du gain de poids des rats

Tableau IV.5: Evolution du poids pondérale des rats, les résultats sont exprimées moyenne (g) ±ESM

	GR1 (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
J_i-J₁₅	188,76±4,93	195,03±2,72	128,57±5,38	141,41±2,54	136,22±6,20	162,77±5,6
J₁₅-J₃₀	200,89±3,08	191,88±3,47	130,70± 3,33	147,61±2,01	140,48±0,54	169,77 ±2,02
J₃₀-J₄₅	201,25±3,52	188,13±3,77	149,67±10,8	148,90 ±1,47	150,83±2,37	176,83 ±1,48
J₄₅-J₆₀	214,49±2,89	186,80±2,83	181,97±3,05	180 ±1,06	170,80±4,55	188,77±4,0 2

IV.6.2 Variation de poids des organes

Le tableau II.2 montre que l’administration du cadmium pendant 60 jours induisait une atrophie des organes tels que les reins, le foie, les testicules et la prostate. La diminution significative ($p < 0,05$) du poids des testicules et du foie par rapport aux témoins était illustrée par les résultats dans l’ordre suivant 1,24± 0,29g contre 3,16 ±0,10g et 6,28±1,39g contre 10,56±1,20g (GR2 contre GR1). Le traitement des rats avec les extraits (EHM ou EA) a permis de corriger cette atrophie, à l’exception du GR3 où il a été constaté une baisse de poids des organes (les reins et la prostate), ces résultats sont motionnés dans le tableau II.2.

Tableau IV.6 : Effets des traitements (Cd, EHM et EA) sur les poids des organes, les valeurs sont exprimées en moyenne (g) ±SEM, P* < 0,05

	Reins (g)	Foie (g)	Testicule (g)	Prostate (g)
GR 1 (témoin)	2,39± 0,18	10,56±1,20	3,16 ±0,10	1,50 ± 0,28
GR 2 (Cd)	1,83± 2,21	6,28 ±1,39*	1,24± 0,29 *	0,73 ±0,30
GR3 (Cd+EHM)	1,59 ±0,25	7,40 ±1,92	1,92 ±0,44	0,74± 0,29
GR4 (Cd+EA)	2,23 ±2,26	11,82±0,78	3,18 ±0,08	1,85± 0,25*
GR5 (EHM)	2,04 ±0,18	10,50±1,23	2,71± 0,33	1,08 ±0,18
GR 6 (EA)	2,22 ±0,19	10,62± 1	3,07± 0,14	1,72± 0,21

IV.6.3 Observation macroscopique

Aucune mortalité n'a été enregistrée durant la période d'expérimentation pendant laquelle les animaux ont été exposés par voie orale au cadmium à une dose 18mg/ kg /j. A part quelques troubles comportementaux à savoir une agressivité et d'autres anomalies ont été enregistrées à la fin de la période d'expérimentation, telles que :

- Une pâleur des yeux (figure IV.7)
- L'apparition de lésions dans la partie distale de la queue (figure IV.8).



Figure IV.7 : pâleur des yeux chez le rat traité avec Cd (18mg/kg)

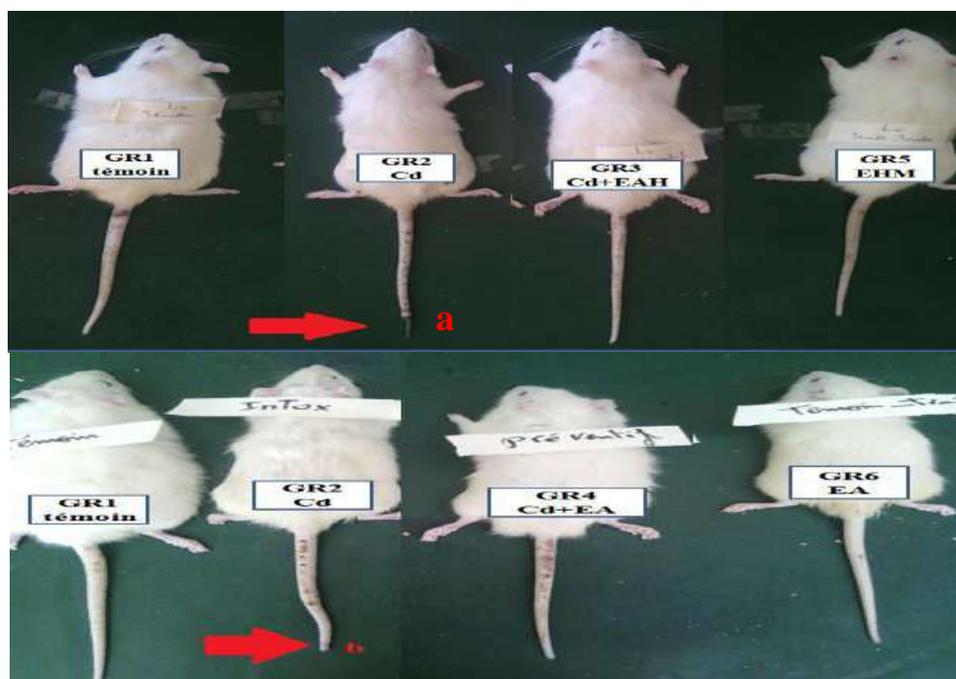


Figure IV.8: Lésions tissulaires de la partie caudale (queue)

a. Lésions de la partie distale de la queue b. Elimination de la partie distale de la queue

IV.7 Dosage biochimique

IV.7.1 Evaluation du taux de la glycémie

La figure IV.9 montre que l'administration quotidienne du cadmium (18mg/kg/j), par voie orale, a entraîné une augmentation significative de la glycémie ($1,26 \pm 0,01$ g/l) par rapport aux animaux témoins ($1,03 \pm 0,03$ g/l). Alors que l'utilisation de l'extrait EHM et EA avec le cadmium chez les rats des groupes (GR3 et GR4) ont permis d'obtenir des valeurs de glycémie normale comparativement aux témoins (GR1) dans l'ordre suivant ; $1,05 \pm 0,11$ et $1,05 \pm 0,03$ g/l versus $1,05 \pm 0,13$ g/l. L'extrait EA a causé une augmentation non significative de la glycémie chez les rats du groupe (GR6) par rapport aux témoins, alors que le co-traitement (Cd+EA) n'a pas déclenché une élévation de la glycémie chez (GR4) qui était proche de celle des témoins.

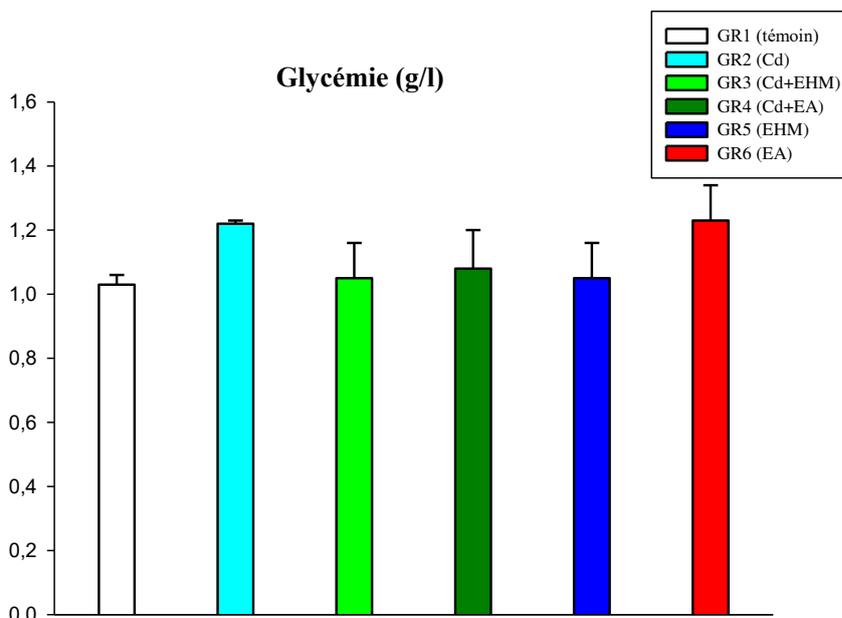


Figure II.9 : Variation de la glycémie chez les rats traités avec Cd (18mg/kg), EHM ou EA des feuilles *Myrtus communis*.

IV.7.2 Effets du Cadmium sur la fonction rénale et l'action protecteur des extraits

Le dosage des bio-marqueurs rénaux (urémie et créatinémie) à la fin de l'expérimentation (figure IV.10, figure IV.11) a montré une augmentation significative de l'urée chez les deux groupes les animaux traités par le cadmium (GR2), et le groupes (GR4) co-traités Cd+EA comparativement aux rats témoins. Par contre, Le co-traitement par l'extrait EHM chez les rats de groupe GR3 a montré de taux de l'urémie normale comme celle des témoins. Concernant la créatinémie, il a été enregistré chez tous les groupes traités par les

extraits (EHM ou EA) une diminution des taux de la créatinine par rapport aux rats exposés au Cd (GR2).

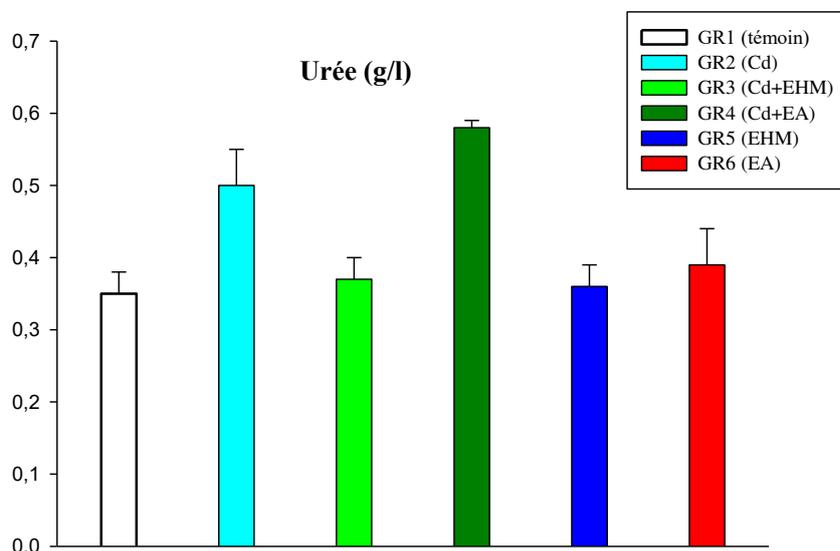


Figure IV.10 : Variation du niveau sérique de l'urée chez les rats exposés au Cd et traités par l'extrait (EHM ou EA) des feuilles *Myrtus communis*

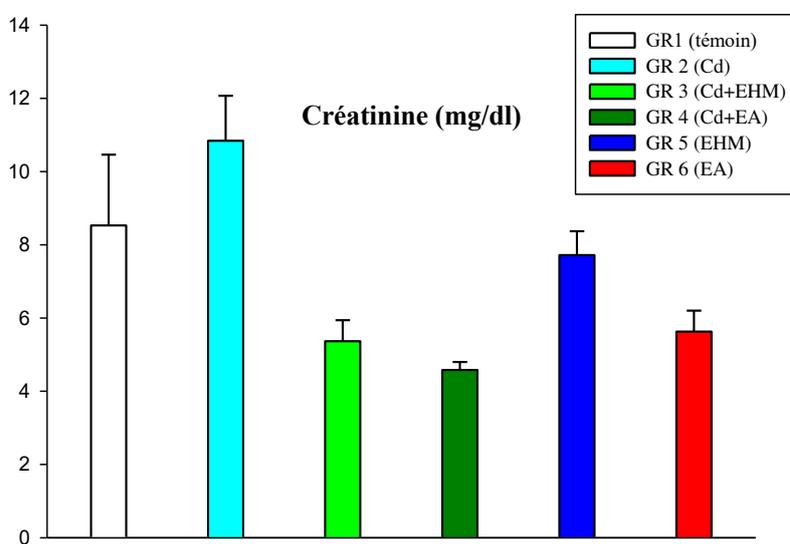


Figure IV.11 : Variation de taux sérique de la créatinine chez le groupe exposé au Cd (18mg/kg) et les groupes traités par l'extrait (EHM ou EA) des feuilles avec une dose (1g/kg).

IV.7.3 Effets du Cadmium sur la fonction hépatique et l'action hépato-protecteur des extraits

L'effet du Cd sur la fonction hépatique, avec ou sans les extraits, est illustré par les figures IV.12 et IV.13. Il a été constaté une élévation non significative du niveau sérique de (ASAT) chez les rats exposés au Cd ($27,21 \pm 2,85$ UI/L) versus les témoins ($17,78 \pm 2,00$ UI/L). Les deux groupes préalablement prétraités (GR3 et GR4) par l'extrait EHM, EA avaient enregistré une augmentation du niveau sérique de ASAT plus que le groupe exposé au Cd. L'administration de l'extrait seul (EHM ou EA) à dose 1g/kg a montré une augmentation de la valeur d'ASAT surtout chez le groupe traité par l'extrait aqueux.

Ce qui concerne l'autre marqueur ALAT, l'exposition au Cd durant 60 jours n'a abouti à aucun changement significatif par rapport au groupe témoin. Cependant, le co-traitement des animaux par l'extrait (Cd+EHM ou Cd+EA) a permis d'enregistrer une augmentation non significative des taux de l'enzyme comparativement aux témoins.

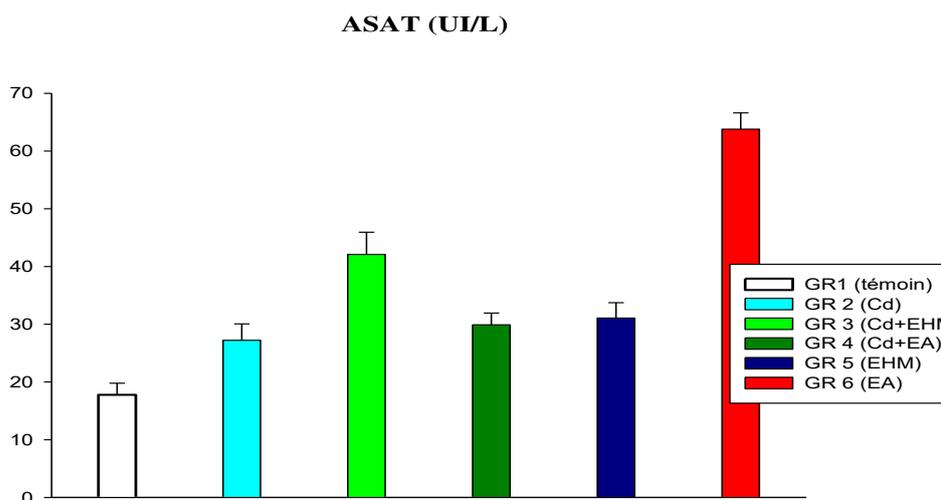


Figure IV.12: Variation du taux sérique de l'ASAT chez le groupe exposé au Cd (18mg/kg) et les groupes traités par l'extrait (EHM ou EA) des feuilles de *Myrtus communis* avec une dose (1g/kg).

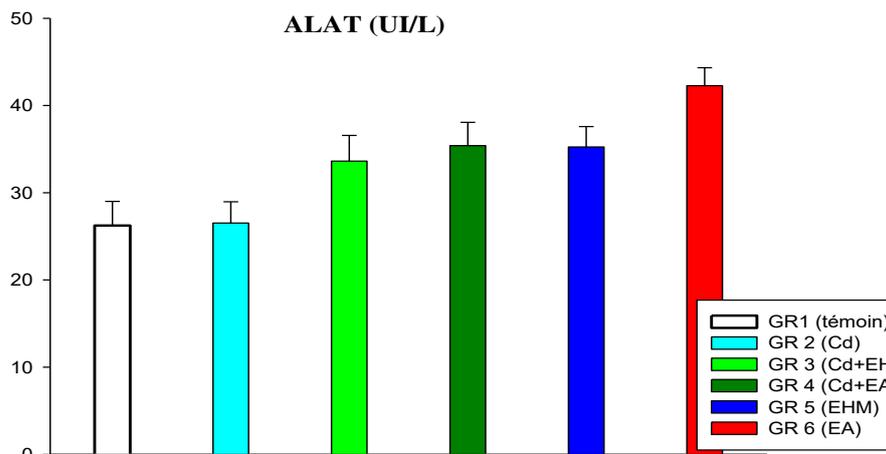


Figure IV.13: Variation de taux sérique de l’ALAT chez le groupe exposé au Cd (18mg/kg) et les groupes traités par l’extrait (EHM ou EA) des feuilles avec une dose (1g/kg).

Tableau IV.7: Variation des paramètres biochimiques chez tous les groupes des rats, chaque valeur représente moyenne \pm SEM, $P^* < 0,05$

	GR1 (témoin)	GR 2 (Cd)	GR 3 (Cd+EHM)	GR 4 (Cd+EA)	GR 5 (EHM)	GR 6 (EA)
Glycémie (g/l)	1,03 \pm 0,03	1,26 \pm 0,01*	1,05 \pm 0,03	1,08 \pm 0,12	1,05 \pm 0,11	1,23 \pm 0,11
Urée (g/l)	0,35 \pm 0,03	0,50 \pm 0,05*	0,37 \pm 0,03	0,58 \pm 0,01*	0,36 \pm 0,03	0,39 \pm 0,05
Créatinine (mg/dl)	8,53 \pm 1,93	10,84 \pm 1,23	5,37 \pm 0,57	4,58 \pm 0,22	7,72 \pm 0,65	5,63 \pm 0,57
ASAT(TGO) (UI/l)	17,78 \pm 2,00	27,21 \pm 2,85	42,10 \pm 3,85*	29,90 \pm 2,03	31,06 \pm 2,67	63,78 \pm 2,84*
ALAT(TGP) (UI/l)	26,24 \pm 2,77	26,53 \pm 2,43	33,62 \pm 2,95	35,40 \pm 2,67	35,24 \pm 2,35	42,28 \pm 2,06*

IV.7.4 Dosage sérique de la testostérone et l’antigène spécifique de la prostate (PSA)

Le tableau IV.8 représente une variation importante de taux de l’hormone sexuelle sérique (testostérone) chez les rats mâles traités avec le Cd comparativement aux rats témoins. La concentration sérique de cet androgène a baissé chez le groupe (Cd) d’une façon non significative par rapport aux rats témoins. Cependant les autres groupes traités par les extraits (EHM ou EA) ont enregistré des valeurs assez faibles comparativement aux témoins et à ceux exposés au Cd.

Concernant les résultats analytiques du marqueur tumoral d’antigène spécifique de la prostate (PSA) présentés dans le tableau, il a été signalé une concentration de PSA totale pratiquement proche de celle des animaux témoins et exposés au Cd. Cependant l’augmentation du PSA non lié (libre) dans le sérum des rats exposés au Cd était

remarquable par rapport aux témoins. Chez les autres lots, aucune différence des taux les marqueurs (PSA_L et PSA_T) n'a été mentionnée (<0,05 et <0,07ng/ml).

Tableau IV.8: Variations des taux de testostérone et le PSA chez les groupes expérimentaux

	GR1 (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
Testostérone (ng/ml)	3,57 ±2,23	1,49 ±0,27	0,18± 0,07	0,13± 0,00	0,85± 0,13	0,12±0 ,00
PSA (ng/ml)	PSA_T	0,48	0,45	<0,07	<0,05	<0,07
	PSA_L	<0 ,05	0,17	0,05	<0,05	0,06

IV.8 Effets du Cd sur les paramètres hématologiques et l'action protecteurs des extraits (tableau IV.9)

IV.8.1 Paramètres de la lignée érythrocytaire

Ces paramètres étaient déterminés simultanément parce qu'ils permettaient de mesurer les constantes érythrocytaires. Le tableau II.9 montre une diminution des GR, HB, HT et VGM de l'ordre 6,59±0,18 10⁶/mm³ ; 10,29 ±0,15 g/dl ; 32,38± 0,92% ; 49,14± 0,25 chez les animaux recevant 18 mg /kg /j (GR2) par rapport aux rats témoins (GR1). Par contre la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TGMH) était restée dans les normes normales. En revanche, le co-traitement des animaux par l'extrait EHM (GR3) a normalisé des paramètres au niveau GR, VGM et TGMH mais au même temps diminué le taux de HB et hématocrite de l'ordre 12,38± 0,30g/dl ; 37,2 ±0,13% par rapport au témoin. Et l'effet de co-traitement par l'extrait aqueux EA (GR4) sur les paramètres érythrocytaires n'a montré aucune modification significative au niveau du sang des rats par rapport au témoin. Dans le même contexte, le traitement par l'extrait (EHM ou EA) des feuilles de la plante *Myrtus communis* n'a montré aucune variation significative du taux des paramètres érythrocytaires chez les GR5 et GR6.

IV.8.2 Paramètres de la ligne leucocytaire (globule blanc GB, lymphocytaire LY)

La ligne leucocytaire joue un rôle important dans la défense de l'organisme humain contre toute attaque de corps étrangers. Le comptage des leucocytes se fait par le même appareil sur le même prélèvement.

Le tableau IV.9 montre une augmentation significative des basophiles, monocyte et éosinophile dans l'ordre suivant ; 604,8±2,18 mm³ ; 2358,72±3,87 mm³ ; 60,48±2,18

mm³ et non significative des GB de l'ordre de $11,080 \pm 0,5010^3/\text{mm}^3$ chez les animaux du GR2 ayant reçu le Cd par rapport aux témoins.

Le taux de leucocytes chez les rats co-traités par l'extrait (EHM ou EA) montrait une augmentation très remarquable de (GB, lymphocyte, monocyte, éosinophile) (tableau II.5 ci-dessous). Dans le même contexte, effet de traitement seul de l'extrait (EHM ou EA) sur les paramètres leucocytaires chez les rats de groupe (GR5 et GR6) n'a pas entraîné des variations au niveau des GB, lymphocyte mais ils ont provoqué une augmentation des autres types de leucocyte (neutrophile, monocyte, éosinophile).

Tableau IV.9: Variation du nombre des globules rouges, des globules blancs, du taux d'hémoglobine, d'hématocrite, du volume globulaire moyenne (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH), plaquettes et les leucocytaires chez les rats témoins, les traités par EHM ou EA, les contaminés au cadmium et les contaminés au cadmium et traités par EHM ou EA.

Numération formule sanguine (FNS)	Groupes de rats					
	GRI (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
Globules rouges 10 ⁶ /mm ³	8,9±0,14	6,59±0,18	7,67±0,24	9,16±0,17	7,66±0,27	8,6±0,43
Hémoglobine (g/dl)	16,47±0,17	10,29±0,15	12,38±0,30	16,14±0,25	13,78±0,18	15,58±0,19
Hématocrite (%)	50,66±0,75	32,38±0,92	37,2±0,13	48,8±0,10	42,39±0,33	47,6±0,65
VGM	56,94±0,94	49,14±0,25	48,49±0,45	53,28±0,82	55,37±0,76	55,32±0,32
TGMH	18,51±0,55	15,62±0,33	16,13±0,11	17,62±0,10	18±0,25	18,1±0,65
<i>Equilibre leucocytaire (Globules blancs) 10³/mm³</i>	GRI (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
Neutrophiles (mm ³)	9,350±0,72	11,080±0,50	11,92±4,68	11,260±8,01	7,920±0,72	7,700±0,82
Lymphocytes (mm ³)	1552,1±5	1512±2,6*	1013,2±3,52*	2905,08±2,31*	1378,08±5,4*	3056,9±5,60*
Monocytes (mm ³)	5516,5±1,8	5544±2*	7700,32±4,35*	6350,64±2,34*	5401,44±4,35*	4073,3±1,67*
Eosinophile (mm ³)	216±2,7	2358,72±3,87*	2801,2±4,6*	1820±2,51*	942,48±1*	331,1±1,9*
Basophile (mm ³)	56,1±2,92	60,48±2,18*	321,84±3,91*	112,6±0,07	174,24±2,02*	192,5±1,12
	56,1±1,45	604,8±2,30*	83,44±1,64*	67,56±1,01	23,76±1,02*	46,2±1,92

IV.9 Dosage du cadmium tissulaire

Le tableau IV.10 récapitule les variations de taux de cadmium tissulaire chez les animaux expérimentaux et les témoins. Il a été constaté la présence du Cd au niveau des tissus étudiés. L'administration chronique d'une solution du cadmium à la dose de 18mg/kg/j pendant 60 jours a induit une accumulation intra-tissulaire d'une manière considérable au niveau des tissus suivants ; reins, foie, testicules et prostate avec les niveaux respectifs 38.6 ± 0.52 ; 43.5 ± 0.02 ; 29.8 ± 0.20 et 13.39 ± 0.22 $\mu\text{g/g}$ chez le GR2.

Au revanche, le co-traitement des rats de GR3 et GR4 (Cd+EHM et Cd+EA) pendant 60 jours a enregistré une baisse remarquable de l'accumulation de métal au niveau des tissus étudié : hépatorénal, testicule et prostate comparativement au groupe témoin.

Alors que l'administration des extraits hydro-méthanolique (EHM) ou aqueux (EA) des feuilles de *Myrtus communis* (GR5 et GR6) est constaté une faible concertation de métal au niveau des tissus par rapport au témoin et intoxiqué

Tableau IV.10: Valeurs de taux du cadmium chez les rats traités par (Cd, EHM et EA), les résultats sont représentés à la moyenne $\mu\text{g/g} \pm \text{SEM}$

	GR1 (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
Reins	11,20±0,47	38,6± 0,52***	16,2 ±0,02**	18,6±0,04 **	9,47± 0,01*	9,71± 0,03*
Foie	17,28± 0,01	43,5± 0,02 ***	17,25± 0,01	19,3± 0,15	14,25±0,02 **	15,91±0,02
Testicule	10,27±0,05	29,8±0,20 ***	12,1±0,02*	14,4±0,19	9±0,18	9,60±0,08
Prostate	15,10±0,01	25,5±0,64	9,5±0,35	11,2±0,13	13,39±0,22	12,33±0,06
P***<0,001 ; P**<0,01; P*<0,05						

IV.10 Histologie

IV.10.1 Etude macroscopique

Cette étape consiste à observer l'aspect générale des organes de l'animal à l'œil nu suivi d'observation de chaque organe (la taille, la forme et couleur). Puis les fixer afin de faciliter la coupure puisque ils deviennent rigides grâce à fixateur, cela va permettre d'observer les anomalies intra-tissulaires.

L'examen macroscopique des tissus présentés dans le tableau IV.11 révélait que les rats traités par le cadmium (GR2) possédaient des organes de faible taille par rapport aux témoins (GR1). Des déformations anatomique et morphologique, comme les taches blanches au niveau du foie et les reins, ont été observées. Dans le même contexte, les testicules montraient un aspect jaunâtre associé à un profil nécrosé de la prostate.

Et les groupes traités par l'extrait hydro-méthanolique EHM, ou l'extrait aqueux EA, des feuilles du *Myrtus communis* ne montrait aucune anomalie intra-tissulaire mais il s'est révélé une faible variation de la taille des organes (les reins et les testicules).

Tableau IV.11: Etude macroscopique des tissus des rats

	GR1 (témoin)	GR2 (Cd)	GR3 (Cd+EHM)	GR4 (Cd+EA)	GR5 (EHM)	GR6 (EA)
Foie						
Taille(m m)	39	34	36	40	36	36
Anomalie	-	Zone blanchâtre	-	-	-	-
Reins						
Taille (mm)	12-12	10-10	11-12	12-15	10-12	12-10
Anomalie		zone blanchâtre				
Testicules						
Taille (mm)	12-12	07-07	12-13	12-10	12-13	12-13
Anomalie		Taches jaune				
Prostate						
Taille (mm)	14	05	12	12	11	12
Anomalie		Aspect Kystique				

IV.10.2 Etude microscopique**IV.10.2.1 Effets du traitement sur les tissus régulateurs de métabolisme****A) Tissu hépatique**

La figure IV.14 montre l'examen microscopique du tissu hépatique des rats témoins et traités par le cadmium (Cd), extrait aqueux (EA) et extrait hydro-méthanolique (EHM). Il s'est révélé que le foie du rat témoin possédait une architecture normale contenant des hépatocytes, des veine centro-lobulaire.

L'observation microscopique du foie des rats intoxiqués au cadmium GR2 (Cd) révélait une condensation nucléaire et une dilatation de la veine centro-lobulaire rempli de fibrine (vaisseau thrombosé) qui signifié début de nécrose.

Egalement les tissus hépatique des rats traités par l'extrait (Cd+EHM ou Cd+EA) GR3 et GR4 révélait un aspect tissulaire normal presque identique à celui des rats témoins (GR1). Par ailleurs, les rats ayant reçu seulement l'extrait EHM ou EA (GR5 et GR6), pendant 60jours ont révélé l'architecture des tissus normaux sauf la présence assez faible de stéatoses.

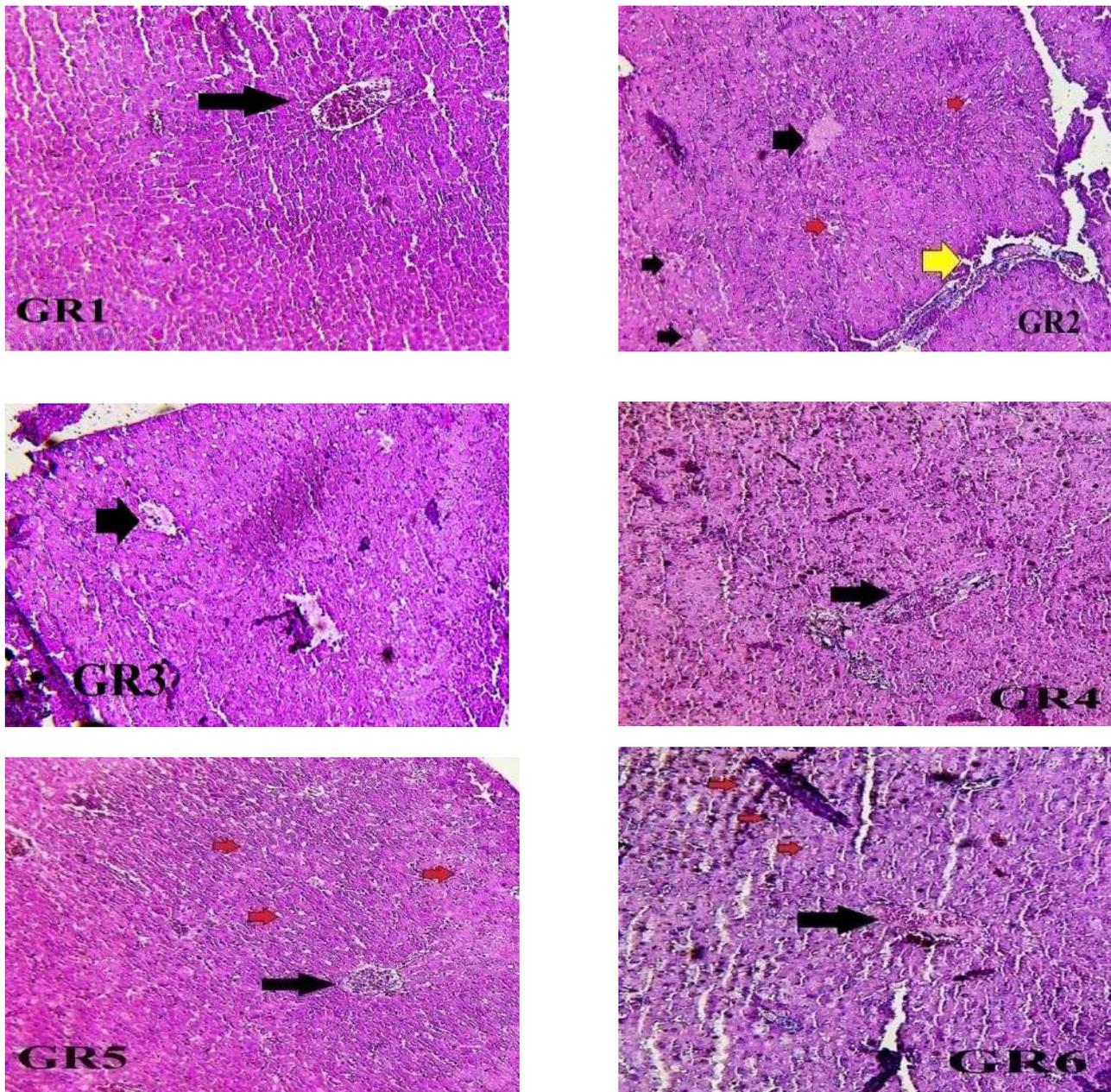


Figure IV.14: Observation microscopique des coupes histologiques transversales du foie des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).

GR1 (témoin): Architecture de tissu hépatique normale. **GR2** (Cd): Section du tissu hépatique des rats intoxiqués sont apparu une dilatation du veine centro-lobulaire (flèche jaune) accompagné des veines thrombosées (flèche noir) et les hépatocytes ont des condensations nucléaire et des stéatose partout (flèches rouge). **GR3** (Cd+EHM), **GR4** (Cd+EA): coupes histologique des tissu hépatique sont apparu normale. **GR5** et **GR6** (EHM, EA): coupe histologique du tissu hépatique apparaissant normal marquée par la présence quelques stéatoses (flèches rouge).

B) Tissu rénale

L'observation microscopique des tissus rénaux chez le rat témoin (GR1) révélait une architecture normale des glomérules et des tubules rénaux. Par contre, les coupes histologiques chez les rats intoxiqués (GR2) par le cadmium à une dose de 18mg/kg /j montraient des inflammations à proximité des veines dilatées marquées par des congestions vasculaires.

Les rats, traités par l'extrait hydro-alcoolique EHM ou aqueux EA (GR3, GR4, GR5, GR6), montraient presque la même architecture tissulaire rénale que celle des rats témoins.

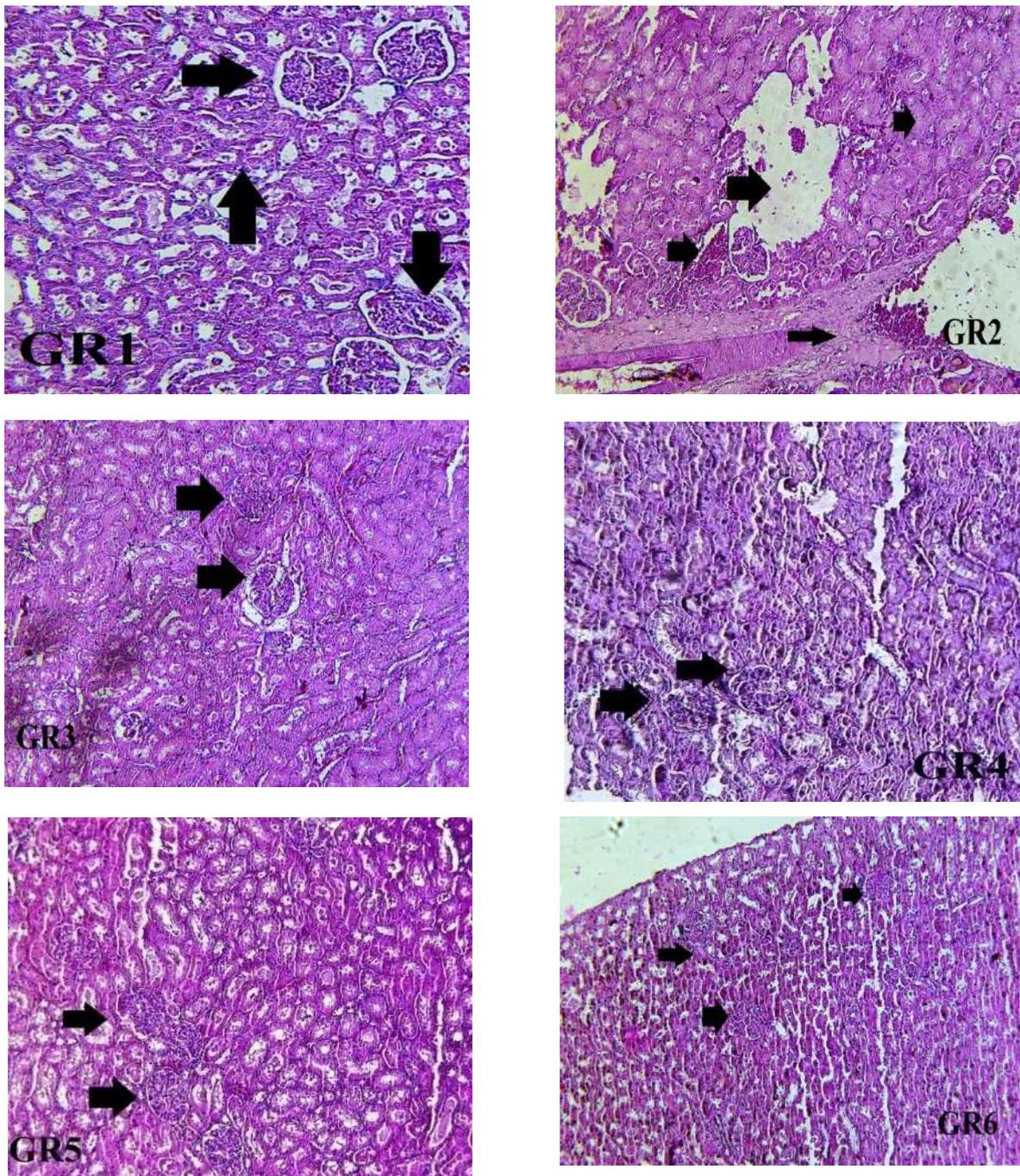


Figure IV.15: Observation microscopique des coupes histologique transversale du rein des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G (observées aux 40X).

GR 1 : architecture de tissu rénale est normale. **GR2 :** section histologique d'un tissu hépatique se sont apparu une dilatation vasculaire (flèche) avec une congestion vasculaire et inflammation. **GR 3, GR4, GR6:** architecture du tissu rénal normale (glomérules et tubules rénaux) flèche.

IV.9.2.2 Effets du traitement sur la voie génitale masculine**A) Tissu testiculaire**

L'étude histologique des testicules des rats montre dans la figure IV.16 qui a été observé au microscope optique après coloration classique (hématoxyline/éosine).

Les testicules des rats témoins (GR1) présentaient une architecture tissulaire normale. Les tubes séminifères étaient bien organisés avec la présence de spermatozoïdes matures dans leur lumière. Les tissus interstitiels composés par des cellules de leydig entouraient les tubes séminifères.

Par contre, les animaux qui recevaient le cadmium (GR2) montraient les structures des tubes séminifères désorganisées avec une absence totale de spermatozoïdes dans la lumière. et le néoplasie germinale intra-tubulaire était extensive, intéressant de nombreux tubes séminifères. Grandes cellules germinales atypique entourent le tube séminifère, et ce dernier, présent les travées vides (acellulaires) sont également apparues au niveau de l'épithélium séminal des tubes séminifères atrophies qu'ils expliquent d'une disparition des cellules de Sertoli et/ou des cellules germinales.

En effet le GR3 co-traité (Cd+EHM) montre une préservation de l'architecture et les structures des tubes séminifères sont bien déterminées avec la présence des spermatozoïdes dans leur lumière. Cette organisation tissulaire, ne présentant aucune anomalie cellulaire malgré que la présence du Cd.

Au revanche, le GR4 co-traité (Cd+EA) présentaient l'architecture subnormale avec la destruction des tissus interstitiels et les formes des tubes séminifères irréguliers.

Pour les rats traités par l'extrait seul montraient la différence importante au niveau l'architecture de tissu de testicule. Le GR5 traité par l'extrait (EHM) présentait d'un tissu normal avec une organisation cellulaire semblable à celle de tissu testicule des rats témoins GR1. Par contre, les rats (GR6) recevaient l'extrait (EA) montraient d'un tissu subnormal que celle de témoin GR1.

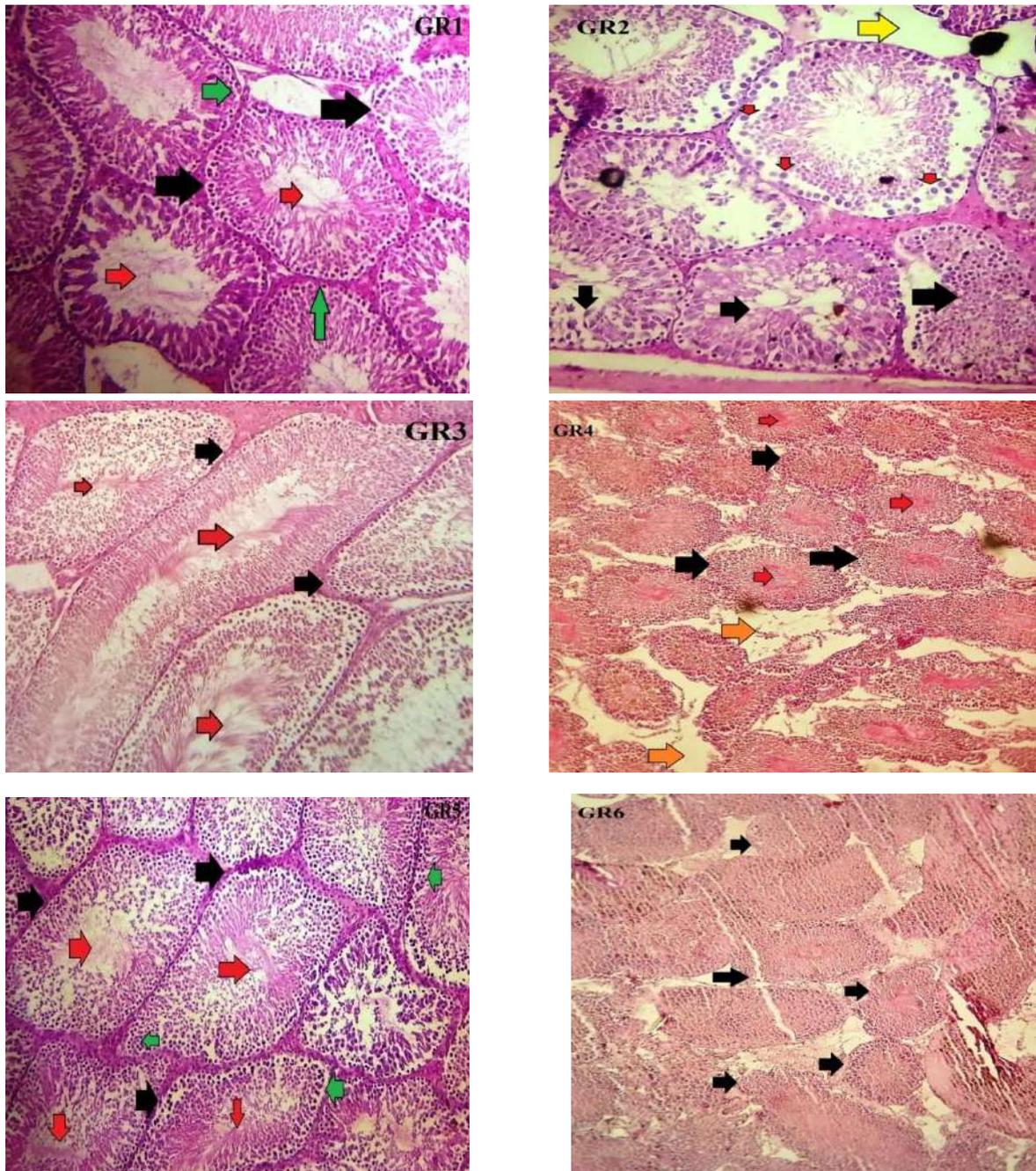


Figure IV.16 : Observation microscopique des coupes histologiques transversales du testicule des rats, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine (G 10X) .GR1 : architecture tissulaire normale. GR2 : tube séminifère irréguliers (flèche noir) liés à l'absence de spermatozoïde dans la lumière à cause des perturbations du processus de spermatogénèse, montre la néoplasie intra-tubulaire avec la présence des vacuoles lipidiques (flèche vert), grandes cellules germinale atypique (flèche rouge) et la destruction des tissus interstitiels (flèche jaune). GR3 et GR5:l'architecture de tissu testiculaire normale, les tubes séminifères sont bien formés (flèche noire), les cellules germinales sont bien organisés (flèche vert). GR4 et GR6: la structure des tissus de testicules est subnormale.

B) Tissu prostatique

L'étude histologique sous le microscope optique des tissus prostatiques a été présentée dans la figure IV.17. Dans le GR1 la prostate d'un rat témoin montre d'une structure glandulaire normale, contient une couche des cellules épithéliales se forme d'un réseau. Par contre, les glandes prostatiques chez le GR2 intoxiqué au cadmium démontrent des hyperplasies glandulaires, le nombre et la taille des glandulaires sont augmentés. Il est également observé des hyperplasies épithéliales, les couches d'épithéliale sont épaisses.

Les groupes co-traités G3 et G4 (Cd+EHM, Cd+ EA) respectivement, montrent les morphologies des glandulaires normaux comme celle de témoin. la même chose, les groupes traités par l'extrait GR5 et GR6 (EHM ,EA) apparaissent des aspects glandulaires bien déterminé comme celle de témoin.

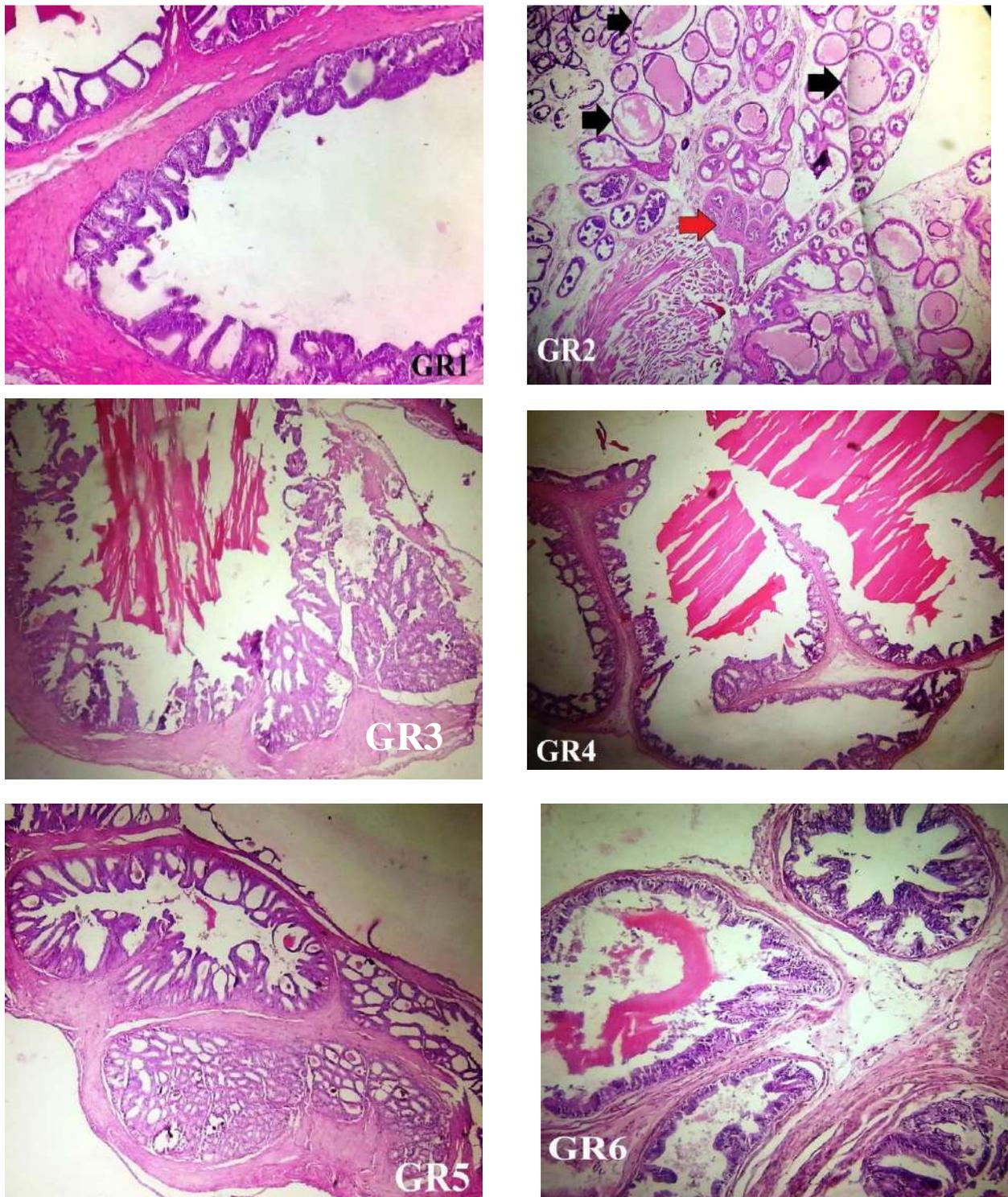


Figure IV.17 : Observation microscopique des coupes histologiques transversales de la prostate des rats, colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (G 10X) .GR1 : architecture tissulaire normale d'un gland prostatique. GR2 : hyperplasie glandulaire (flèche noire), hyperplasie épithéliale (flèche rouge). GR3, GR4, GR5 et GR6 : les structures glandulaire normaux.

IV.11 DISCUSSION

Le cadmium, en tant que métal lourd, a été identifié comme un facteur de risque potentiel induisant de nombreuses pathologies et dysfonctionnements vitaux du système métabolique qui est le premier site de contact avec le (Cd) et ainsi le système reproductif. Sa présence dans les tissus humains, animaux et même dans les tissus végétaux prouve qu'il est omniprésent dans l'environnement sous différentes formes. Le cadmium est présent dans les produits les plus fréquemment utilisés chez l'homme comme les produits céramiques, les piles, les batteries rechargeables et la consommation de tabac dont la fumée de cigarettes est très suspectée (Pari et Shagirtha, 2012).

La médecine conventionnelle utilise des drogues chimiques synthétiques afin de réduire les signes de toxicité chez des patients préalablement exposés au Cd. L'inconvénient de l'usage des médicaments, à long terme et à des doses élevées contre les méfaits du Cd, ne va que placer la santé du patient dans un état critique et morbide à cause d'une toxicité additionnelle. Les médicaments ont des effets secondaires et indésirables qui de crainte leur composition chimique pourra venir interagir avec les ions bivalents du métal Cadmium. Certes les médicaments ont un effet prophylactique même curatif mais la dose chimique de jour en jour ne saurait être tolérée par l'organisme vivant. Selon les recommandations de l'OMS, la médecine et la pharmacologie devront soulager le patient de ses douleurs chroniques tout en ayant recours au bon choix de type de thérapie. Cette problématique a incité la communauté scientifique à focaliser ses investigations dans la santé par le naturel ou tout simplement opter pour la phytothérapie ou la médecine traditionnelle qui a existé depuis des millénaires.

Le recours aux traitements préventif et curatif par l'usage des plantes médicinales aromatiques est devenu une nécessité vu l'importance pharmacologique de ces herbes. En outre, la recherche de nouvelles substances à activité biologique constitue une des plus grandes préoccupations scientifiques. De ce fait, plusieurs études antérieures ont été réalisées pour l'évaluation des composés bioactifs thérapeutiques extraites de plantes médicinales. Cette présente étude s'est consacrée à l'exploration d'éventuel effets protecteurs des extraits hydro-méthanolique (EHM) et aqueux (EA) des feuilles de *Myrtus communis* envers la toxicité du cadmium (Cd) chez un modèle animal expérimental.

Après une caractérisation poussée et diverses analyses chimiques des extraits des feuilles de *Myrtus communis*, qui ayant fait l'objet de cette étude, l'objectif était d'évaluer les effets de ces deux types d'extraits en se penchant sur l'étude de leurs propriétés antioxydantes contre la toxicité du cadmium induite chez des animaux (rats wistar).

Effets des traitements sur les paramètres physiologiques des rats

Notre étude a permis de distinguer en premier lieu et de façon expérimentale l'impact du cadmium sur la physiologie des animaux et leur croissance biologique par rapport à celles des animaux témoins. La diminution du poids des animaux est utilisée comme un indice de la détérioration de leur état de santé général. Les résultats obtenus ont montré que le Cd a induit nettement une diminution de la croissance des animaux s'illustrant ainsi par une diminution de poids des tissus cibles (Reins, foie, testicules et prostate) comparativement aux témoins.

Ces données permettent de suggérer que cet élément présente des effets néfastes sur la croissance et la santé animale. La diminution de poids des organes cibles est due à l'action du Cd sur l'organisation tissulaire induisant des lésions et une atrophie cellulaire. Par conséquent, le Cd est identifié comme un facteur de risque potentiel. Les résultats de cette présente étude rejoignent ceux de (Pari et Shgirtha, 2012 ; Prabu et *al*, 2012 ; Amamou et *al.*2015 ; Layachi et Kechrid., 2012).

En effet plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés pour expliquer cette diminution. Les ions divalents Cd⁺⁺ d'une part interagissent avec plusieurs éléments nutritifs (Layachi et Kechrid, 2012) qui affectent le métabolisme de l'os et des macromolécules (lipides et des protéines) et d'une d'autre part ils entraînent l'activation et/ou l'inhibition de nombreuses voies de signalisation qui contrôlent l'apoptose cellulaire et des modifications de la perméabilité des membranes biologiques qui sont à l'origine de stress oxydatif (Amamou et *al.*, 2015).

Par ailleurs, les résultats de cette étude sur l'évolution du poids corporel ont montré une augmentation normale du poids des animaux (GR3 et GR4), sous Cd, et traités soit par l'extrait (EHM) ou l'extrait (EA). Ce type de traitement a eu aussi un impact sur le poids des organes. Le traitement par l'extrait des feuilles de *Myrtus communis* a exercé des effets préventifs contre les effets toxiques du Cd. Cela suggère l'effet bénéfique des feuilles de cette plante aromatique sur la croissance des animaux et la stabilité positive de l'évolution de leur poids. Dans le même contexte, les animaux des GR5 et GR6 sous (EHM, EA) ont affiché un rythme de croissance corporel normal.

Effet des traitements sur les paramètres sériques et histologiques

D'après les résultats de cette étude, il s'est révélé une augmentation significative de la glycémie, l'urée et de la créatinine chez les animaux exposés au cadmium par rapport aux témoins qui restaient dans les limites physiologiques. Plusieurs études ont montré que l'exposition au cadmium peut causer des états hyperglycémiques chez les animaux expérimentaux (Tavabe et *al.*, 2019). Mais le mécanisme d'action du Cd sur la glycémie reste toujours mal connu. Les travaux de

recherche (Layachi et Kechrid, 2012 ; Amamou et al, 2015) ont montré également que l'administration de cet élément chimique, chez des animaux, pourrait induire une hyperglycémie ainsi qu'une augmentation de l'urémie et la créatinémie. Dans ce cas, le cadmium peut impliquer plusieurs suggestions à savoir ; l'inhibition de la production de l'insuline par les cellules β , le blocage des récepteurs tyrosine kinase dont il en résulte une incapacité de métaboliser des hydrates de carbone. L'état d'hyperglycémie est un signe de stress oxydatif induit par ce métal qui est responsable d'une multitude de dysfonctionnements métaboliques (Ben Amara et al., 2019). Ce désordre métabolique, due à une hyperglycémie, est souvent responsable de certaines complications chez les animaux d'expérimentation comme la gangrène du queue.

En revanche, les extraits (EHM ou EA) des feuilles de *Myrtus communis* chez les animaux sous cadmium ont apparemment pu stabiliser la glycémie. En parallèle, le traitement du GR5 seulement avec l'extrait EHM pendant 60 jours révélait une normo glycémie contrairement au GR6 traité avec l'extrait EA qui a développé une hyperglycémie. Ces données sont en accord avec plusieurs études réalisées par (Sumbul et al, 2011 ; Malekpour et al, 2012 ; Johari et al, 2014 ; Talebianpoor et al, 2019) qui ont évalué l'impact des extraits hydroalcooliques des feuilles du myrte chez des animaux présentant une hyperglycémie et ont pu obtenir un effet hypoglycémique meilleur que celui obtenu par l'extrait aqueux. Les études indiquaient qu'en médecine populaire l'extrait des feuilles de *Myrtus comminus* pourrait être recommandé dans le traitement du diabète.

Dans le même contexte, il est à noter que les principaux constituants polaires de l'extrait des feuilles de *M. communis* sont les flavonoïdes et les glycosides. Alors, il est possible que ces molécules puissent être responsables de l'activité hypoglycémique. La fraction polaire est responsable de l'effet hypoglycémique et la fraction neutre est responsable de la régénération des îlots de langerhans (Guergouri, 2018). Plusieurs hypothèses ont été avancées sur le mécanisme d'action de l'extrait des feuilles de Myrte sur la glycémie. Les substances actives des feuilles de myrte pourraient agir rapidement par une glycolyse accrue, une glycogénèse et une glycogénolyse réduite. Il se peut que cet extrait pourrait entraîner la réduction de l'absorption intestinale du glucose tout en inhibant l'enzyme glycosidase (Masunda et al, 2014). Ou encore, cet extrait induisait une diminution du taux des lipides plasmatiques ou augmentait la production et la sécrétion de l'insuline (Fararh et al, 2004; Kanter et al, 2003; Kaleem et al, 2006).

Concernant la fonction rénale, les résultats obtenus ont montré une augmentation des taux plasmatiques de l'urée et de la créatinine, considérés comme de biomarqueurs du dysfonctionnement du système rénal et des lésions tissulaires générées par ce métal. Ces résultats

sont en accord avec d'autres études (Layachi et Kechrid, 2012 ; Amamou et al., 2015). En outre, il a été enregistré par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) une importante accumulation de cadmium au niveau des reins chez les rats exposés. Ce résultat est en accord avec d'autres recherches dans lesquelles le dommage rénal a été occasionné chez les travailleurs exposés au cadmium, également chez les fumeurs et les animaux d'expérience (Anses, 2012). Après absorption, le cadmium se trouve dans la circulation sanguine et forme des complexes avec les protéines transporteurs comme l'albumine, qui une fois il arrive au niveau du tissu hépatique il induit la synthèse des métalloprotéines ou des métallothionéine (MT). Les complexes Cd-MT formés resteraient stockés dans le foie puis ensuite ils seraient dirigés vers les reins afin de neutraliser les effets toxiques du Cd. Presque la moitié des complexes Cd-MT (50 %) sont excrétés et l'autre moitié (50 %) sont réabsorbés par endocytose où ils sont dégradés par des lysosomes pour libérer le cadmium qui interagit avec d'autres composants cellulaires et les endommager (Waalkes, 2003). L'augmentation des biomarqueurs est corrélée à une augmentation du catabolisme des protéines chez les animaux (Amamou et al., 2015). Le Cd, au niveau des reins, a désordonné la filtration glomérulaire et l'excrétion (Djeffal, 2014). Pour approfondir et renforcer l'étude biochimique de notre projet, il a été réalisé une étude histologique des reins chez des rats expérimentaux. Les résultats de l'étude histologique ont montré que l'action toxique du cadmium était très sévère au niveau du tissu rénal. Il a été constaté une dégénérescence tissulaire, des dilatations veineuses et une inflammation remarquable. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ramesh et al., 2019, qui ont montré une atrophie glomérulaire et des altérations irréversibles de la fonction rénale.

Le traitement des animaux, exposés au Cd, avec l'extrait EHM ont enregistré des taux normaux des biomarqueurs (urée et créatinine). En revanche, les animaux de GR4 (Cd + EA) ont montré une perturbation des niveaux sériques de l'urée (en augmentation) et la créatinine (en diminution). Pour apporter un soutien analytique aux résultats des dosages biochimiques, il a été entamé une étude histologique des reins. Les coupes des tissus rénaux, observées au microscope optique, ne montraient aucune lésion chez les animaux (Cd + EHM) et (Cd + EA), cela peut suggérer que les composés bioactifs de l'extrait des feuilles de *M. communis* pourraient protéger, par le biais des systèmes cellulaires de défense anti-oxydatifs, le tissu rénal contre le stress oxydatif généré par le cadmium en éliminant les espèces réactifs oxygénés ou les radicaux libres (Amamou, et al., 2015). En outre, afin d'évaluer la capacité d'accumulation du cadmium au niveau du tissu rénal en présence des molécules des métabolites secondaires (EHM ou EA), l'évolution du taux de cadmium tissulaire a été suivie par le procédé d'analyse de spectrophotométrie d'absorption atomique

électrothermique (SAAE). Les résultats ont révélé une diminution de l'accumulation du Cd. Cette méthode analytique a permis de déduire que le contenu de l'extrait (EHM) a ralenti l'introduction du cadmium dans les cellules rénales plus mieux que l'extrait aqueux (EA). Ces résultats pourront être en rapport avec la présence importante de composants phénolique dans l'extrait EHM qui sont moins abondants dans l'extrait EA. Ces composés phyto-thérapeutiques pourraient avoir une fonction de chélation du Cd.

Concernant les derniers groupes d'animaux traités seulement avec l'extrait des feuilles de la plante *Myrtus communis* (EHM, EA), il a été constaté des taux sériques d'urée et de créatinine presque normaux. Ces mêmes groupes présentaient également une moindre accumulation du cadmium par rapport aux témoins. Cela pourrait expliquer le rôle de piégeage des extraits des feuilles EHM et EA envers le métal cadmium et ainsi d'inhiber son introduction dans les cellules. Les examens histologiques des reins des animaux (GR5, GR6) ont montré que les extraits n'ont causé aucune lésion tissulaire.

La fonction hépatique a également fait l'objet de cette étude. Des taux sériques d'ALAT (TGP) et d'ASAT (TGO) étaient inférieurs à 30UI/L suite à une exposition des animaux au Cd durant une période d'expérimentation de 60 jours. L'accumulation hépatique du Cd a affiché une concertation importante par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux des études de laboratoire (Anses, 2012). D'autres études ont montré l'absence d'effet délétère au niveau du tissu hépatique (Arroyo et al, 2012). Le cadmium s'accumule dans le foie au même titre que les reins, qui les deux sont considérés comme des organes cibles du Cd. La résistance du tissu hépatique aux effets toxiques du cadmium pourrait être liée à la capacité du foie à synthétiser des métallothionines (MT) qui forment des complexes métallo protéiques avec cadmium. Ce processus de complication entraîne une diminution de la concentration du Cd libre (Arroyo et al., 2012). Une étude japonaise réalisée sur des femmes âgées de 19 à 78 ans consommant des aliments avec de teneurs en Cd plus ou moins importantes. La quantité alimentaire de Cd ingérée était de 24,7µg/j. Les résultats de cette étude n'ont pas montré d'altération ou de lésions du tissu hépatique (Lee et al., 2018 ; Li et al., 2020). L'étude histologique du foie chez les animaux du GR2 n'a révélé aucune lésion sévère ni de nécrose ou des signes de tumorigénèse induite par le cadmium excepté des dilatations de la veine centro-lobulaire, des vaisseaux thrombosés et condensations nucléaires dans la plupart des hépatocytes accompagnés de stéatose.

Par ailleurs, les animaux des GR3 et GR4 sous (Cd + EHM) ou (Cd + EA) révélaient une augmentation importante du taux des enzymes transaminases (ASAT et ALAT) comparativement

aux animaux témoins normaux (GR1) et témoins expérimentaux (GR2). Pour comprendre ces perturbations enzymatiques au niveau du tissu hépatique, il a été réalisé une analyse par SAAE afin de mesurer le taux du cadmium tissulaire. Les résultats montraient une faible concentration du Cd dans le tissu hépatique. Cela explique la préservation de l'organisation tissulaire normale due aux (MT) et l'extrait des feuilles qui ont ralenti l'accumulation du cadmium chez les GR3 et GR4. Mais l'élévation du taux des enzymes transaminases reste incompréhensible. Cette constatation a incité d'utiliser d'autres groupes qui sont les GR5 et GR6 traités seulement avec les extraits respectifs EHM et EA. Les résultats montraient une diminution importante du taux de cadmium tissulaire, une augmentation des taux sériques des transaminases (ASAT et ALAT) et l'apparition d'une stéatose hépatique. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Kumar et *al.*, 2011) qui ont traité des rats avec l'extrait aqueux des feuilles *Myrtus communis* pendant 10 jours. Les résultats de l'étude menée par (Kumar et *al.*, 2011) ont révélé une augmentation des (ASAT et ALAT) associée à une élévation des lipides totaux hépatiques signe de l'apparition d'une stéatose. Autre étude réalisée par (Ben Hsouna et *al.*, 2019) a abouti à un résultat similaire montrant l'effet du traitement de l'huile essentielle du myrte sur l'architecture tissulaire hépatique chez des rats pendant 15 jours. Dans cette même étude, il y a eu une augmentation des niveaux sériques des LDL-Cholestérol chez des animaux traités avec le tétrachlorure de carbone (CCl₄) et l'huile essentielle de *Myrtus communis*, par contre il a été observé l'apparition d'une stéatose hépatique chez le groupe traité seulement avec l'huile essentielle. D'après ces résultats, le foie est considéré comme l'un des principaux organes impliqués dans le métabolisme des médicaments et des molécules toxiques. C'est le premier organe cible, la plupart des xénobiotiques pénètrent dans le tractus gastro-intestinal à travers la veine porte et arrivent jusqu'au foie où ils sont métabolisés (Sahreen et *al.*, 2011). Le cadmium peut induire des lésions sévères et des nécroses suite à une toxicité chronique de 12 mois et plus. L'absence de nécroses hépatiques, dans notre étude, ne pourrait être expliquée que par la courte durée d'exposition des rats au Cadmium. D'une autre part, les extraits des feuilles de la plante de *Myrtus communis* ont eu un retentissement sur les profils lipidique et enzymatique au niveau du tissu hépatique dont le mode d'action reste mal connu.

Les effets toxiques du Cd ne se limitent pas uniquement aux tissus hépatorénaux, mais peuvent s'étendre jusqu'au tissu sanguin et perturber le fonctionnement des organes. Le système hématopoïétique est un tissu liquide et le plus sensible aux xénobiotiques. L'étude des paramètres hématologiques a toujours servi comme un indicateur précoce de la toxicité des polluants sur des tissus cibles (Diaby et *al.*, 2016). Cependant, nos résultats révélaient la diminution du nombre des globules rouges, du taux d'hémoglobine, d'hématocrite et du VGM (volume globulaire moyen)

chez les rats exposés au chlorure de cadmium $CdCl_2$, qui se traduisaient par une pâleur des yeux (conjonctive oculaire) et un début d'installation d'une anémie. Ces résultats concordent avec ceux des travaux des auteurs (Horiguchi, 2007 ; Layachi, et Kechrid, 2012 ; Amamou *et al.*, 2015; Kehili, *et al.*, 2018). La diminution de ces paramètres sanguins pourrait être interprétée comme suit ; soit le cadmium a altéré la fonction des enzymes clés responsables de la synthèse de l'hème, un composant essentiel de l'hémoglobine, et a induit une réduction de la durée de vie des hématies (Anses, 2012), soit les ions de cadmium divalent (Cd^{2+}) rentrent en compétition avec le fer au niveau de l'enzyme férrochélatase pour passer ensuite dans la circulation sanguine où il est fixé au niveau de la membrane d'érythrocytes. Cd serait distribué au niveau de différents tissus à savoir ; le foie, les reins, la rate et la moelle osseuse. Cette accumulation tissulaire du Cd entraînerait une perturbation du système hématopoïétique (Diaby *et al.*, 2016). L'analyse de la présence du Cd dans les tissus par spectrophotométrie d'absorption atomique électronique a soutenu les résultats des analyses biochimique et hématologique. SAAE a suggéré une accumulation considérable du Cd dans les tissus cibles chez les animaux exposés à cet élément chimique.

Au niveau de la lignée leucocytaire, les résultats de cette étude montraient des anomalies quantitatives telles qu'une augmentation du nombre des basophiles et une diminution du nombre des lymphocytes. Aucune variation concernant le nombre de neutrophiles et de monocytes a été signalée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Borane, 2013; Gabol *et al.*, 2014; Diaby *et al.*, 2016 ; Giri *et al.*, 2016).

En effet, l'étude hématologique menée sur les rats des GR3 et GR4 ayant reçu respectivement (Cd+EHM) et (Cd+EA) a fait remarquer une augmentation significative du nombre de leucocytes par rapport aux témoins. Dans ce cas, il est vraisemblable que l'extrait des feuilles du myrte pourrait stimuler la réaction d'hypersensibilité grâce aux substances bioactives qu'il contenait. Ces composés thérapeutiques pourraient être responsables de la régénération des leucocytes et en même atténuer l'inflammation due à la toxicité du cadmium.

Deux études expérimentales ont été réalisées pour évaluer l'effet immunostimulant des feuilles de *Myrtus communis* (Nada, 2011 ; Tae et *al.*, 2017). Les résultats de ces études indiquaient une augmentation du nombre de leucocytes suite à une consommation des feuilles de *Myrtus communis*. Cette élévation pourrait être due à un effet immunomodulateur positif attribué aux composés bioactifs comme les flavonoïdes qui contrôlent le degré des réactions inflammatoires déclenchées par le système immunitaire.

En parallèle, il a été enregistré chez les animaux du GR3 (Cd + EHM) et GR4 (Cd + EA) un taux normal des globules rouges comme celui des témoins excepté une diminution non significative du taux d'hémoglobine et d'hématocrite associée à une augmentation de plaquettes d'une façon significative comparativement aux témoins. Dans ces conditions, il est probable que :

- Le Cd pourrait avoir un effet antagoniste ou dévie le rôle antioxydant des composés bioactifs induisant ainsi le ralentissement de l'absorption du fer non héminique au niveau de la lumière du tractus gastro-intestinal (Amamou et *al.*, 2015).
- Le myrte, d'une manière générale, renferme des tanins qui pourraient inhiber l'absorption intestinale du fer. La formation d'un complexe tanins-fer rendra l'absorption des ions de fer dans la lumière du tractus gastro-intestinal (Bureau, 2013).

La relation cause – effet entre l'extrait EHM et l'augmentation du taux des plaquettes sanguin reste mal connue. Les groupes GR5 et GR6, traités uniquement avec les extraits des feuilles de *M. communis* (EHM, EA), n'ont montré aucun effet sur les paramètres sanguins.

Au niveau du tractus urogénital male (testicule et prostate), l'exposition chronique au cadmium a pu induire des actions délétères sur la structure et la fonction des tissus reproducteurs. Les résultats de cette étude montraient que le cadmium a induit une diminution du poids et de la taille des testicules et de la prostate par rapport aux témoins. De même, il a été constaté une diminution des niveaux sériques de l'hormone testostérone et une élévation du marqueur d'antigène spécifique de la prostate libre (PSA_L). En outre, l'analyse du taux de cadmium tissulaire par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) a révélé une accumulation du Cd au niveau des testicules et de la prostate. Ces résultats sont explicites envers l'affinité du Cd pour les organes reproducteurs cibles et cela a été illustré par des modifications physiologiques et des perturbations hormonales aboutissant à une réduction de la fertilité chez les rats. Des études antérieures démontraient que le cadmium produisait des lésions testiculaire et prostatique associées à une perte progressive de la fertilité chez des rats mâles (ATSDA, 2008 ; EURAR, 2008). Une autre étude a été effectuée sur 341 patients de sexe male issus de couples stériles, montrait une association de l'augmentation du taux de Cd dans le liquide séminal à l'infertilité masculine essentiellement parmi les patients fumeurs (Layachi et *al.*, 2012). Les auteurs suggèrent que le Cd pourrait avoir un effet toxique sur la prostate et les vésicules séminales qui à l'origine d'une mauvaise qualité du sperme (Ren et *al.*, 2012). Une étude histologique des testicules et prostate a été conduite chez les animaux des différents groupes. Les résultats des examens microscopiques du tissu testiculaire des rats, préalablement exposés au Cd, ont montré un large espace interstitiel (ou inter tubulaire), une dégénérescence des tubes séminifères

renfermant des vacuoles lipidiques à leur extrémité, une absence presque totale des spermatozoïdes, un nombre réduit de cellules germinales et un arrêt plus ou moins apparent de la spermatogénèse. De même, le tissu prostatique présentait des hyperplasies glandulaires et épithéliales. Ces mêmes lésions tissulaires (nécrose des tissus interstitiels, une perturbation de la spermatogénèse, une réduction du nombre des cellules germinales) ont été retrouvées dans d'autres travaux antérieurs (Mouro et *al* , 2019). De même, les polluants environnementaux altèrent la quantité et la qualité des spermatozoïdes durant la phase de la spermiogénèse en donnant lieu à des spermatozoïdes immobiles parfois avec absence de flagelles (Konan, 2019).

Les lésions tissulaires et les anomalies fonctionnelles des testicules pourraient être interprétées par la diminution des taux sériques de l'hormone testostérone sécrétée. Ce désordre endocrinologique est soit expliqué par l'effet toxique du cadmium qui a réduit le nombre de récepteurs de l'hormone LH (Luteinizing Hormone) au niveau des cellules de Leydig soit c'est dû à la dérégulation de la fonction des protéines StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) et leur interaction avec les cellules de Leydig ralentissant ainsi la production de testostérone (Konan, 2019). Concernant les pathologies prostatiques, des études épidémiologiques de grande envergure indiquaient une élévation de la fréquence du cancer de la prostate chez des travailleurs exposés au Cd durant une période de plus d'une vingtaine d'années (Verougstraete et *al*, 2003). La recherche fondamentale était d'un apport estimable et a fourni des résultats très intéressants sur l'animal. Le métal lourd Cadmium et ses sels dérivés ont été classés comme des substances cancérigènes chez l'homme (Carrière, 2009). Les risques de toxicité du Cd sur la santé humaine ont été prouvés quelques soient le niveau et la durée d'exposition. Le Cd a été donc classé comme cancérigène de type 1 depuis 1993 (United Nations, WHO, IARC, 1993).

Par ailleurs, le traitement des animaux de GR3 et GR4, avec les extraits EHM et EA des feuilles de *Myrtus comminus*, a révélé une diminution des niveaux plasmatiques du PSA et de la testostérone par rapport aux animaux témoins après une période d'expérimentation de 60 jours. Le recours au dosage tissulaire du Cd (Testicules et prostate) par la technique SAA a montré un faible taux d'accumulation du cadmium par rapport aux témoins. L'étude histologique des testicules et la prostate, optant pour des examens macroscopique et microscopique, chez le groupe d'animaux (Cd + EHM) n'a enregistré aucune altération sévère ou modification morphologique. En revanche, le groupe d'animaux (Cd + EA) présentait une rétraction des tubes séminifères avec une architecture tissulaire subnormale.

La glande prostatique apparemment ne présentait pas de modifications structurales notables ou des lésions palpables chez les groupes de rats traités par les extraits (EHM ou EA) des feuilles *Myrtus communis*.

Les études antérieures ne s'étaient pas parvenues à expliquer le mécanisme d'action cellulaire des différents composés bioactifs des extraits des feuilles de *Myrtus communis* au niveau de l'appareil urogénital male (testicules et prostate) chez un modèle animal expérimental (Thieury,2017). Dans d'autres études *in vitro* récentes menées par (Oukaci, 2017), il a été suggéré l'effet spermicide temporaire de l'huile essentielle des feuilles du *Myrtus communis* à partir d'une dose de 1 mg/mL sur la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes. Des études *in vivo* réalisées sur des animaux (rats et souris) avaient accredité la thèse de la contraception naturelle induisant une réduction de la testostérone et la perte de la libido (Debry, 2012). D'après le concept, la nature de notre étude et les objectifs qu'elle a fixés, il est présagé d'indiquer que l'extrait des feuilles de *Myrtus communis* pourrait constituer un réservoir de principes actifs ou de métabolites secondaires tentant de perturber les étapes de la spermatogénèse comme par exemple empêcher le contact entre les cellules germinales (Small, 1979) et pourrait être considéré comme contraceptif masculin. Par ailleurs, l'utilisation des huiles essentielles ou des extraits des feuilles de myrte à fortes doses pourrait être responsable de l'apparition d'anomalies organisationnelles au niveau des parties centrale et périphérique du tissu testiculaire.

A

- Amamou, F., S. Nemmiche, R. kaouthar Meziane, A. Didi, S.M. Yazit, and D. Chabane-Sari Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 78:177-184. 2015.
- Anses, A. Valeur toxicologique de référence pour le cadmium et ses composés. 2012.
- Arroyo, V., K. Flores, L. Ortiz, L. Gómez-Quiroz, and M. Gutiérrez-Ruiz Liver and cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol S* 5. 2012.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft toxicological profile for cadmium. Atlanta, GA: ATSDR; 2008.

B

- Ben Amara, S., and K. Soltani L'effet de *Crataegus laevigata* sur la toxicité du cadmium chez les rates Wistar albinos. 2019.
- Borane, V.R. Protective role of ascorbic acid on the cadmium induced changes in hematology of the freshwater fish, *Channa orientalis* (Schneider). *Adv. Appl. Sci. Res* 4:305-308. 2013.
- Bureau, L. Thé, les interactions nutritionnelles avec le fer. *Phytothérapie* 11:100-105. 2013.

C, D et E

- Carrière, P. Caractérisation du transport transépithélial de cadmium dans les cellules intestinales humaines TC7 cultivées sur filtres. 2009.
- Debry, J.-M. La contraception masculine «verte»: mythe ou réalité? *Basic and Clinical Andrology* 22:152-161. 2012.
- Djeffal, A. Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate «méthomyl» chez le rat Wistar: Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. In. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 225p. 2014.
- Diaby, V., A.F. Yapo, A.M. Adon, H.F. Yapi, A.J. Djama, and M. Dosso Biotoxicité hématologique du sulfate de cadmium chez les rats Wistar. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 10:1765-1772. 2016.
- European Union Risk Assessment Report (EURAR).(accès 6 juin 2008).
http://ecb.jrc.it/documents/ExistingChemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/cdmeta_lreport303.pdf

F, G et H

- Fararh, K., Y. Atoji, Y. Shimizu, T. Shiina, H. Nikami, and T. Takewaki Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in veterinary science* 77:123-129. 2004.

- Gabol, K., M.Z. Khan, M.U.A. Khan, P. Khan, F. Fatima, S. Siddiqui, T. Jabeen, N. Baig, M.A. Iqbal, and M.U.A. Hashmi Induced effects of lead, chromium and cadmium on gallus domesticus. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences* 8:3035-3042. 2014.
- Giri, S.S., S.S. Sen, J.W. Jun, V. Sukumaran, and S.C. Park Immunotoxicological effects of cadmium on *Labeo rohita*, with emphasis on the expression of HSP genes. *Fish & shellfish immunology* 54:164-171. 2016.
- Guergouri, F.Z. Etude de l'effet des extraits de *Nigella sativa* sur la toxicité Hépatique induite par le CCl₄ chez le rat wistar. In. 2018.
- Horiguchi, H. Anemia induced by cadmium intoxication. *Nihon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene* 62:888-904. 2007.
- Hsouna, A.B., S. Dhibi, W. Dhifi, W. Mnif, and N. Hfaiedh Chemical composition and hepatoprotective effect of essential oil from *Myrtus communis* L. flowers against CCL 4-induced acute hepatotoxicity in rats. *RSC advances* 9:3777-3787. 2019.

J, K

- Johari, H., M. Nozari, M. Moghtari, Z. Zamani, and M. Yazdani The effect of *Myrtus communis* extract on liver enzymes and blood biochemical factors in diabetic adult male rats. *Zahedan J Res Med Sci* 16:12-17. 2014.
- Kaleem, M., M. Asif, Q. Ahmed, and B. Bano Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore medical journal* 47:670. 2006.
- Kanter, M., I. Meral, Z. Yener, H. Ozbek, and H. Demir Partial regeneration/proliferation of the β -cells in the Islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Tohoku journal of experimental medicine* 201:213-219. 2003.
- Kehili, N., S. Saka, and O. Aouacheri L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie* 16:194-203. 2018.
- Kumar, R., P. Phaneendra, S. Bodhanapu, O. Rahiman, K. Niyas, and T. Tamizmani Antioxidant and hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Myrtus communis* (Myrtle) Linn. leaves. *Pharmacologyonline* 1:1083-1090. 2011.
- Layachi, N., and Z. Kechrid Combined protective effect of vitamins C and E on cadmium induced oxidative liver injury in rats. *African Journal of Biotechnology* 11:16013-16020. 2012.
- Lee, H.H., V.N. Owens, S. Park, J. Kim, and C.O. Hong Adsorption and precipitation of cadmium affected by chemical form and addition rate of phosphate in soils having different levels of cadmium. *Chemosphere* 206:369-375. 2018.
- Li, Y., Y.-s. Huang, B. He, R. Liu, G. Qu, Y. Yin, J. Shi, L. Hu, and G. Jiang Cadmium-binding proteins in human blood plasma. *Ecotoxicology and environmental safety* 188:109896. 2020.
- Malekpour A, Dehghani S, Zahedi S, Eskandari F. Effects of the hydro-ethanol extract of *myrtuscommunis* L. On blood glucose level and histopathological changes in alloxan-induced diabetic rats. *Middle-East J Sci Res.* 2012;12(4): 522, 2012.

- Masunda, T., M. Mbala, S. Kayembe, B. Longoma, K. Ngbolua, D. Tshibangu, and P. Mpiana. Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild.(Arecaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8:2441-2451. 2014.
- Mouro, V.G., A.L. Martins, J. Silva, T.P. Menezes, M.L. Gomes, J.A. Oliveira, F.C. Melo, and S.L. Matta. Subacute testicular toxicity to cadmium exposure Intraperitoneally and orally. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019. 2019.
- Nada M Al-Bashir. in vivo efficacy of myrtus communis aqueous leaves extract against metacestode of echinococcus granulosus. *Iraqi Journal of Biotechnology* 10:126-139. 2011.

P, R et S

- Pari, L., and K. Shagirtha. Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Experimental and toxicologic pathology* 64:513-520. 2012.
- Prabu, S.M., M. Muthumani, and K. Shagirtha. Protective effect of Piper betle leaf extract against cadmium-induced oxidative stress and hepatic dysfunction in rats. *Saudi journal of biological sciences* 19:229-239. 2012.
- Ramesh, G., D. Madhuri, and M.L.A.G. Reddy. Histopathological and ultrastructural changes of liver and kidney induced by lead and cadmium alone and combined exposure in male wistar rats. 2019.
- Ren, X.-m., G.-g. Wang, D.-q. Xu, K. Luo, Y.-x. Liu, Y.-h. Zhong, and Y.-q. Cai. The protection of selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. *Food and chemical toxicology* 50:3521-3529. 2012.
- Sahreen S, M. R. Khan and R. A. Khan, *BMC Complementary Altern. Med.*, 2011, 11(1), 48–53.
- Small WE, Fertility control sought from plants in worldwide effort. *Am Pharm* 19:23–4. 1979
- Sumbul, S., M.A. Ahmad, M. Asif, and M. Akhtar. *Myrtus communis* Linn.-A review. 2011.

T, V et W

- Tae, H.M., A. Hajimoradloo, S.H. Hoseinifar, and H. Ahmadvand. The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) supplementations on growth performance and some innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Aquatic Biology* 5:252-259. 2017.
- Talebianpoor, M.S., M.S. Talebianpoor, M. Mansourian, and T. Vafaiee-Nejad. Antidiabetic activity of hydroalcoholic extract of *Myrtus communis* (myrtle) fruits in streptozotocin-induced and dexamethasone-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research* 11:115. 2019.

Référence

- Tavabe, K.R., B.P. Abkenar, G. Rafiee, and M. Frinsko Effects of chronic lead and cadmium exposure on the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in laboratory conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 221:21-28. 2019.
- Thieury, Charlotte. Les anticancéreux dans la biodiversité végétale mondiale et en Nouvelle-Calédonie. 2017. Thèse de doctorat.
- Verougstraete V, Lison D et Hotz P - Cadmium, lung and prostate cancer : a systematic review of recent epidemiological data. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*; 6(3) : 227-255. .2003
- Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533:107-120. 2003.

CONCLUSION GENERALE

Tout ce qu'est impossible reste à accomplir

Jules verne

Conclusion

Le monde contemporain est largement exposé aux risques de contamination de l'environnement (l'eau, l'air et le sol) par les polluants métalliques et organiques. L'homme, par ses activités, est considéré comme le maillon fort responsable des phénomènes de pollution. Les activités humaines dans les secteurs urbain, industriel et agricole tout en manipulant de manière incontrôlée les métaux lourds, à savoir le cadmium, avaient enclenché des changements physiologiques au sein des systèmes métaboliques des êtres vivants (la plante, l'animale, le micro-organisme et l'homme).

Le cadmium, en tant que métal lourd toxique, est considéré comme agent cancérigène classe II. L'intérêt de l'étude de sa toxicité émane de son utilisation technologique vaste et son omniprésence dans notre environnement. L'exposition chronique de l'homme au Cadmium pourrait constituer un risque potentiel de toxicité. Ce métal est présent dans l'eau de boisson, les aliments, l'air et le sol. L'organisme vivant animal pourrait être contaminé par voie orale et accumulant le cadmium dans ses différents tissus et il n'est que très faiblement excrété.

L'objectif général de notre projet était d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes par lesquels le Cd induit des effets toxiques, essentiellement les mécanismes impliqués dans la protection des cellules contre la toxicité, en utilisant des extraits des feuilles de la plante *Myrtus communis* à savoir les extraits hydro-alcoolique(EHM) et aqueux (EA), qui constituent en plus d'une source un réservoir important de composés antioxydants naturels.

La première étape de ce projet a concerné :

- La préparation des extraits à partir des feuilles de *Myrtus communis* par macération alcoolique (EHM) et décoction (EA) a fourni respectivement des rendements intéressants de 33,5 et 44,4 %.
- L'étude qualitative des extraits a permis une caractérisation phytochimique qui révélant la présence de métabolites secondaires (terpenoïdes ; flavonoïdes ; tanins ;quinones ;anthraquinones ;alcaloïdes et composés réducteurs).
- L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des deux extraits EHM et EA par le piégeage du radical libre DPPH a révélé un pouvoir antioxydant pour l'extrait EHM (IC50=0.014 mg/ml) plus important que celui de l'extrait EA (IC50=0,45mg/ml).
- L'étude quantitative, par analyses CPG et HPLC, a permis d'étudier la composition des extraits et d'identifier les différents constituants phénoliques présents. L'analyse de l'huile essentielle des feuilles du myrte, par CPG, a permis d'identifier les principaux

composés à savoir ; 1,8-cinèole (27,01%), α -pinène (21,07%), acétate de myrtényle (20,19%), limonène (13,70%). L'analyse de l'extrait alcoolique par HPLC a permis d'identifier les composés majeurs qui étaient ; génistéine (29,48 %), méthylquercétine (16,56 %), kaempférol (13,26 %) et pinobanksine-3-acétate (9,18 %).

La deuxième étape de ce même projet s'était concentrée sur :

Une étude *in vivo* dont les résultats montraient que suite à une exposition chronique des animaux au cadmium (dose = 18 mg / kg), différentes anomalies ont été constatées comme la perturbation du fonctionnement des systèmes enzymatiques de détoxification, une désorganisation tissulaire altérant le métabolisme et l'excrétion, altérations des fonctions des tissus de la reproduction (prostate et testicules) se traduisant par des niveaux sériques hors normes de la testostérone et du PSA, une perturbation des paramètres biochimique, hématologique. Ces résultats pourraient être résumés comme suit:

- ➔ La toxicité du Cd a induit une variation pondérale englobant une diminution des poids des tissus cibles qui ont fait l'objet de cette étude. Ce résultat était marqué par le développement de lésions caudale et oculaire. Le traitement des animaux, préalablement exposés au Cd, avec des extraits des feuilles de *Myrtus communisa* permis de réduire les effets toxiques de Cd sur le statut biologique de l'animal.
- Une variation des paramètres biochimiques à cause de la toxicité de Cd. Une hyperglycémie, une élévation sérique de l'urée, créatinine et des transaminases (ASAT). Le traitement, par l'extrait alcoolique des feuilles de *M. communis* (EHM), a permis de restaurer plus ou moins les valeurs de la glycémie, l'urée et créatinine proches de celles des animaux témoins normaux. Par ailleurs, l'extrait EHM n'a pu réduire les niveaux sanguins élevés d'ASAT et ALAT. L'extrait (EA) a permis de restaurer une glycémie moins élevée, de même pour les autres variables à savoir la créatinine, ASAT et ALAT mais il a entraîné une diminution de l'urée.
- L'étude hématologique a révélé une diminution des globules rouges, d'hémoglobine avec une augmentation des globules blancs chez les animaux exposés au Cd comparativement aux témoins. Rappelant que le retour de ces paramètres à la normale était possible avec l'utilisation des extraits EHM et EA. Le traitement par l'extrait (EHM ou EA), après une intoxication au Cd, a entraîné une augmentation du taux de leucocytes et a rendu normales les taux de globules rouges, hémoglobine et hématocrite.
- Pour une meilleure appréciation de la toxicité du Cd, ce métal a été dosé au niveau des tissus par SAA. Cette étude a suggéré une accumulation de Cd dans les tissus hépatorénale,

testiculaire et prostatique. Par contre, l'utilisation de l'extrait EHM ou EA a éliminé partiellement le Cd accumulé dans ces tissus.

- L'étude histologique a révélé que la toxicité du Cd s'est manifestée par des atteintes tissulaires. En effet l'examen histologique a révélé la présence au niveau du tissu hépatique des congestions de veines centro-lobulaires dilatées, des hépatocytes irréguliers avec une condensation nucléaire. Les tissus rénaux montraient un début de nécrose des glomérules avec une dilatation tubulaire et une inflammation occupant le tissu rénal. Les testicules et la prostate montraient une architecture tissulaire et cellulaire méconnaissables. Notons que ces anomalies ont régressé chez les animaux traités par l'extrait EHM ou EA.
- L'administration de l'extrait (EHM ou EA) par voie orale à la dose 1g/kg pendant 60 jours a montré que les animaux retrouvaient leur l'état physiologique plus ou moins normal, une glycémie et des taux d'urée et de créatinine rééquilibrés. Par ailleurs d'autres indices ont été développés comme une élévation de taux ASAT et ALAT, une diminution du taux de testostérone, stéatose hépatique, des irrégularités des tubes séminifères associées à une chute du nombre des spermatozoïdes chez le groupe d'animaux traité par l'extrait EA.

Après cela, il est à conclure que les effets toxiques du Cd ont été atténués plus par l'extrait EHM que par l'extrait EA des feuilles *Myrtus communis* (MC).

De nombreuses perspectives pourraient être dégagées de cette présente étude et qui seront préconisées pour de prochaines études sur la toxicité de cadmium:

- Dosage des niveaux sériques du Cd,
- Détermination du statut rédox,
- Evaluation des effets préventifs des différentes parties de la plante (graines, fruits, tige) chez un modèle animal expérimental exposé à des doses ascendantes de Cd sous diverses voies d'administration pendant des durées d'expérimentation variables (aigue, chronique),
- Etude histologique sur d'autres organes (tube digestif, voies pulmonaires et cerveau),
- Déterminer à partir de quelles doses, les extraits de la plante pourront présenter une toxicité,
- Evaluation des Effets cumulatifs de toxicité du Cd et de la plante *M. communis*,
- Exploration à partir de quelles doses précises, Cd et l'extrait de la plante pourront agir en synergie et augmentant ainsi le degré de toxicité ou agir en antagonistes et réduire la toxicité du métal.

ANNEXE



Annexe 02 : Rats dans les cages dans l'animalerie de la faculté Ain hdjar, Saida



Annexe 03: Hémogramme modèle Bimex diagnostique BD 380



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

**INFORME SOBRE LA IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS VEGETALES
RECOLECTADAS POR EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAIDA (ARGELIA)**

El día 3 de mayo de 2017, se solicita la identificación de muestras secas:

Metodología:

Se procede a una identificación preliminar de la muestra a partir de los caracteres macromorfológicos.

Seguidamente se procede a una identificación macroscópica de la muestra, mediante la utilización de una lupa binocular y las claves de identificación al uso. Por tratarse de especies de amplia área de distribución, no ha sido necesario utilizar guías específicas del norte de África.

Resultados:

La identificación de las muestras ha sido:

Foeniculum vulgare Mill. (hojas y frutos)

Petroselinum crispum (Mill.) Fuss (hojas y frutos)

Myrtus communis L. (tallos y frutos)

Lo que firmo a petición del solicitante.

Murcia a 3 de mayo de 2017

Fdo. Pedro Sánchez Gómez

Licenciado en Ciencias Biológicas (Especialidad Botánica), Doctor en Ciencias Biológicas (Botánica), Profesor Titular e Investigador de la Universidad de Murcia