

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT  
en Sciences  
Option : Biochimie appliquée

### THEME

Exploration de l'impact des extraits naturels d'origine  
végétale « *Juniperus phoenicea* » sur la toxicité induite par  
le tétrachlorure de carbone chez le rat

Présentée par : LAOUAR Amel

Directeur de thèse : M. CHEFROUR Azzedine

Professeur, Université de Souk ahras

CO- Directeur de thèse : M. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université de Annaba

#### Membres de Jury:

Président : Mme. BOUMENDJEL Amel

Professeur, Université de Annaba

Examineurs : Mme. BENNADJA Salima

Professeur, Université de Annaba

Mme HAMAIDIA Kaouther

MCA, Université de Souk ahras

M. DJERROU Zouhir

MCA, Université de Skikda

## Remerciements

**Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant, pour m'avoir donné la santé, la patience et la force pour réaliser ce travail.**

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Mr CHEFROUR Azzedine, Professeur à l'université de Souk Ahras, pour m'avoir encadré et accueilli au sein du laboratoire de botanique à la faculté de médecine de l'université Badji Mokhtar - Annaba, en me faisant bénéficier de son expérience, ses orientations et ses encouragements.

J'exprime aussi ma reconnaissance et mes remerciements à mon co-directeur de thèse, Mr MESSARAH Mahfoud, Professeur à l'université Badji Mokhtar - Annaba, pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie très vivement Mme BOUMENDJEL Amel, Professeur à l'université Badji Mokhtar – Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

J'adresse mes vifs remerciements à Mme BENNADJA Salima, Professeur à l'université Badji Mokhtar - Annaba et Mme HAMAIDIA Kaouther, Maitre de conférences- A à l'université de Souk Ahras, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Je remercie Mr DJERROU Zouhir, Maitre de conférences – A à l'université de Skikda, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également au Docteur Amoura, chef de service d'anatomie pathologique à l'hôpital d'El Bouni pour l'interprétation des coupes histologiques.

J'exprime aussi ma reconnaissance et mes remerciements à Mr Boukhari Abbas, Professeur à l'université Badji Mokhtar - Annaba, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au département de chimie à l'université Badji Mokhtar - Annaba.

Je tiens à remercier pareillement Mr TICHATI Lazher, Ingénieur au laboratoire de biochimie et microbiologie appliquée et Mr REZGUI Nacer, doctorant au département de chimie, à l'université Badji Mokhtar - Annaba, pour leur aide et soutien.

Je ne peux présenter ce travail sans exprimer mes remerciements à tous les enseignants du département de Biochimie de l'université Badji Mokhtar – Annaba, mes amis et mes collègues, en particulier Fahima, leila, Asma, Amel, Soulef, Lilia, Hichem, Wided, ainsi que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Enfin, je tiens à exprimer ma vive gratitude et mes vifs remerciements à mes parents, mes frères Badreddine et Mohamed Amine, mon mari Adel, mes beaux-parents et mes belles sœurs, pour leur soutien et encouragements et pour m'avoir supportée jusqu'à la fin de la rédaction de cette thèse.

Résumés

**Résumé**

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des baies de *Juniperus phoenicea* ainsi que l'effet protecteur de l'extrait aqueux de cette dernière contre le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) chez les rats males de la souche Wistar. L'extraction des composés phénoliques de cette plante a été réalisée par le méthanol à 85% pour obtenir l'extrait brut (EBr) contenant les phénols totaux. Alors que l'extraction des flavonoïdes a été réalisée par l'utilisation des solvants organiques à savoir: l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins a été effectué par des méthodes utilisant le réactif de Folin-Ciocalcu, trichlorure d'aluminium et la vanilline respectivement. Les résultats obtenus montrent la richesse des extraits de *Juniperus phoenicea* en polyphénols, tanins et en flavonoïdes. Les activités antioxydantes de tous les extraits de *Juniperus phoenicea*, réalisées par la méthode de réduction du radical libre DPPH, sont inférieures à celle de l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 0,26mg/ml). L'EBr, l'EAc et l'EA sont les plus actifs, avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2,13, 3,38 et 3,71mg/ml respectivement.

L'étude biologique *in vivo*, effectuée sur 24 rats répartis en quatre lots de six individus chacun: rats normaux sains; rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> à une dose de 1ml/kg de pc (v/v dans l'huile d'olive) par voie intrapéritonéale; rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> et traités par l'EAJP à une dose de 250 mg/kg de pc; rats normaux sains ayant reçus l'EAJP (250 mg/kg pc). Le résultat a montré que le CCl<sub>4</sub> a provoqué des altérations graves au niveau des biomarqueurs hépatiques (ASAT, ALAT, PAL, LDH, protéines totales, albumine et la bilirubine totale), rénales (créatinine, urée et acide urique), hématologiques (globules blancs, globules rouges, hématocrite, VGM, hémoglobine et plaquettes) et métaboliques (glucose).

D'autre part, ces altérations ont été confirmées par l'augmentation du taux de MDA, la diminution du taux de GSH réduit et des activités enzymatiques de la GPx et la GST au niveau du foie et des reins ainsi que l'étude histologique de ces derniers. Cependant, nos résultats révèlent que le traitement des rats par l'EAJP pendant 12 jours a amélioré ces perturbations et par conséquent a atténué l'intensité du stress oxydatif induit par le CCl<sub>4</sub>.

**Mots-clés** : Stress oxydatif, Phytothérapie, *Juniperus phoenicea*, Antioxydant, polyphénols, CCl<sub>4</sub>.

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of *Juniperus phoenicea* berries extracts and the protective effect of the aqueous extract of *Juniperus phoenicea* berries against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. The extraction of the phenolic compounds from this plant was carried out with methanol (85%) to obtain the crude extract (EBr) containing the total phenols. While flavonoids were extracted successively with : diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol.

The amount of phenolics content, total flavonoids and total condensed tannins were determined by folin ciocalteu , aluminium chloride and vanillin methods, respectively. The results showed that *Juniperus phoenicea* extracts contained high level of total phenolic compounds, tannins and flavonoids. The antioxidant activities of *Juniperus phoenicea* extracts evaluated by (DPPH) radical scavenging method, are lower than that of ascorbic acid (IC<sub>50</sub> = 0,26 mg / ml). EBr, EAc and EA are the most active, with IC<sub>50</sub> values were 2,13, 3,38 and 3,71 mg/ml, respectively.

The *in vivo* biological study was carried out on 24 rats, were divided in to four groups where each group consisted of six animals: Animals served as normal control; animals received intraperitoneal administration of CCl<sub>4</sub> (1ml/kg bw, 1/1 in olive oil); rats received CCl<sub>4</sub> were also treated with AEJP at a dose of 250 mg/kg bw; rats received AEJP alone (250 mg/kg bw). The result showed that CCl<sub>4</sub> provoked severe alterations in hepatic biomarkers (ASAT, ALT, PAL, LDH, total protein, albumin and total bilirubin), renal (creatinine, urea and uric acid), hematological (white blood cells, red blood cells, hematocrit, VGM, hemoglobin and platelets) and metabolic (glucose).

On the other hand, these alterations were confirmed by the increase in the level of MDA, the reduction of the reduced GSH level and the activities of the GPx and GST in both hepatic and renal tissues as well as the histological study of these latter. However, our results revealed that the treatment of the rats by the EAJP for 12 days improved these disturbances and consequently reduced the intensity of oxidative stress induced by the CCl<sub>4</sub>.

**Keywords:** Oxidative stress, Phytotherapy, Total phenols, Antioxidant, *Juniperus phoenicea*, CCl<sub>4</sub>.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم القدرة المضادة للأكسدة لثمرة العرعار (*Juniperus phoenicea*) والتأثير الوقائي للمستخلص المائي لهذه النبتة في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي الناتج عن تأثير  $CCl_4$  عند جرذان ذكور من سلالة Wistar. إستخلاص المركبات الفينولية لهذه النبتة تم بواسطة الميثانول بنسبة 85% للحصول على المستخلص الخام الذي يحتوي على الفينولات الكلية في حين أن إستخلاص الفلافونويدات قد تم باستعمال المحاليل العضوية وهي إثيرثنائي الإيثيل، خل الإثيل والبيتانول. تم تقييم كمية الفينولات الكلية، الفلافونويدات و الدباغ باستعمال الكاشف (Folin-Ciocalcu)، ثلاثي كلور الألمنيوم و إختبار الفانيلين على التوالي.

أظهرت النتائج المتحصل عليها ثراء مستخلصات العرعار بالفينولات الكلية، الفلافونويدات والدباغ. تقييم القدرة المضادة للأكسدة تم عن طريق إختبار الجذر الحر (DPPH). أظهرت النتائج أن كل المستخلصات النباتية لثمرة العرعار أقل فعالية مقارنة بحمض الأسكوربيك ( $IC_{50} = 0,26$  ملغ/مل). المستخلص الخام (EBr) ومستخلص خلات الإيثيل (EAc) و المستخلص المائي (EA) هم الأكثر فعالية حيث تتراوح قيمة  $IC_{50}$  بين 2,13، 3، 38 و 3,71 ملغ/مل على التوالي.

شملت الدراسة الحيوية (*in vivo*) 24 فأرا موزعة على أربع مجموعات و كل مجموعة تحتوي على ستة جرذان: عادية سليمة، جرذان مسممة بجرعة 1مل/كغ ( $CCl_4$ ) متناولة عن طريق الحقن في الصفاق، جرذان مسممة برابع الكلوريد الكربوني و المعالجة بالمستخلص المائي لثمرة العرعار بجرعة 250 ملغ/كغ وأخرى سليمة معالجة بالمستخلص المائي لثمرة العرعار بجرعة 250 ملغ/كغ.

أظهرت النتائج أن ( $CCl_4$ ) تسبب في تأثيرات سلبية على مستوى الوظائف الكبدية (زيادة نشاط الانزيمات الناقلة للأمين، الفوسفاتاز القلوي و نازعة هيدروجين اللاكتات، زيادة تركيز البيليروبين الكلي و نقصان تركيز كل من الألبومين و البروتين في المصل)، الوظيفة الكلوية (زيادة في اليوريا، الكرياتينين و حمض اليوريك في المصل) و بعض المؤشرات الدموية (كريات الدم البيضاء و الحمراء، الهيموغلوبين...) و حتى الاستقلابية (الغلوكوز).

من جهة أخرى، تم تأكيد هذه النتائج من خلال إرتفاع مؤشر الأكسدة الليبيدية (MDA)، و نقصان كمية الجلوتاثيون المرجع و إنخفاض النشاط الإنزيمي (GPx et GST) في الكبد و الكلى و الدراسة النسيجية لهذه الأعضاء.

فيما أظهرت النتائج أن علاج الجرذان بالمستخلص المائي لثمرة العرعار لمدة 12 يوم أدى الى تحسين هذه الاضطرابات و بالتالي التخفيف من حدة الأكسدة الناجمة عن  $CCl_4$  و التعزيز من النظام الدفاعي المضاد للأكسدة.

الكلمات الدالة : الإجهاد التأكسدي، مضاد للأكسدة، المركبات الفينولية، *Juniperus phoenicea*،  $CCl_4$ .

**Table des matières**

**Introduction** .....01

**Etude bibliographique**

**Chapitre I : Stress oxydatif**

I. 1. Stress oxydatif .....04

I. 2. Radicaux libres .....05

    I. 2. 1. Définition .....05

    I. 2. 2. Sources de radicaux libres.....06

I. 3. Systèmes de défense antioxydants .....08

    I.3.1. Système de défense enzymatique .....08

    I. 3.2. Système de défense non enzymatique.....10

I. 4. Stress oxydant et les dégâts cellulaires .....12

    I. 4. 1. Oxydation des lipides.....13

    I. 4. 2. Oxydation des protéines.....14

    I. 4. 3. Oxydation des acides nucléiques.....14

I. 5. Pathologies liées au stress oxydant.....15

**Chapitre II : Toxicité et tétrachlorure de carbone**

II.1. Définition .....16

    II.1.1. Substance toxique.....16

    II.1.2. Toxicité.....16

    II.1.3. Xénobiotique.....16

II.2. Biotransformation des xénobiotiques .....17

    II.2.1. Réactions de la phase I .....17

    II.2.2. Réactions de la phase II .....18

II.3. Elimination des xénobiotiques.....18

    II.3.1. Excrétion rénale.....18

II.3.2. Elimination fécale.....	19
II.3.3. Elimination pulmonaire.....	20
II.3.4. Autres voies d'élimination.....	21
II.4. Solvants chlorés.....	21
II.4.1. Définition.....	21
II.4.2. Toxicité des solvants chlorés.....	22
II.5. Tétrachlorure de carbone .....	23
II.5.1. Définition .....	23
II.5.2. Propriétés physico-chimiques.....	23
II.5.3. Propriétés cinétiques principales.....	23
II.5.4. Mode d'action de tétrachlorure de carbone .....	24
II.5.5. Principales sources d'exposition .....	26
II.5.6. Toxicité Chez l'homme .....	26
II.5.7. Utilisations.....	27
II.5.8. Conduite à tenir en cas d'urgence .....	27

### **Chapitre III : Phytothérapie et *Juniperus phoenicea***

III.1. La phytothérapie.....	28
III.2. Récolte et conservation des plantes médicinales.....	29
III.2.1. Récolte.....	29
III.2.2. Séchage.....	29
III.2.3. Conservation.....	29
III.3. Formes d'utilisation des plantes médicinales.....	30
III.3.1. Infusion.....	30
III.3.2. Décoction.....	30
III.3.3. Macération.....	30
III.4. Substances actives des plantes médicinales.....	31
III.5. Présentation de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	37
III.5.1. Classification botanique de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	38
III.5.2. Distribution géographique.....	38
III.5.3. Caractères généraux.....	39
III.5.4. Utilisations.....	41

**Partie pratique****Matériels et méthodes**

I. Etude phytochimique.....	42
I.1. Matériel végétal.....	42
I.2. Extractions des composés phénoliques.....	43
I.2.1. Préparation de l'extrait brut.....	43
I.2.2. Extraction des flavonoïdes .....	44
I.2.3. Extraction des tanins.....	44
I.2.4. Préparation de l'extrait aqueux de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	46
I.2.5. Détermination du rendement d'extraction.....	46
I.3. Dosage des composés phénoliques.....	47
I.3.1. Dosage des polyphénols.....	47
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	47
I.3.3. Dosage des tannins condensés.....	47
I.4. Evaluation de l'activité antiradicalaire .....	48
I.4.1. Principe .....	48
I.4.2. Mode opératoire.....	49
II. Etude biologique.....	49
II.1. Animaux et conditions d'hébergement .....	49
II.2. Mode de traitement.....	50
II.3. Sacrifice et prélèvements des organes .....	50
II.3.1. Prélèvement sanguin.....	50
II.3.2. Dissection et prélèvement des organes.....	51
II.4. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques.....	53
II.4.1. Aspartate aminotransférase (ASAT/ TGO).....	53
II.4.2. Alanine aminotransférase (ALAT/ TGP).....	53
II.4.3. Phosphatase alcaline.....	53
II.4.4. Lactate déshydrogénase .....	54
II.4.5. Protéines totales.....	54
II.4.6. Albumine.....	54
II.4.7. Bilirubine totale.....	54
II.4.8. Créatinine.....	54

II.4.9. Urée.....	55
II.4.10. Acide urique.....	55
II.4.11. Glucose.....	55
II.5. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	56
II.5.1. Préparation de l'homogénat.....	56
II.5.2. Dosage des protéines.....	56
II.5.3. Dosage du glutathion (GSH).....	56
II.5.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	57
II.5.5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx).....	58
II.5.6. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-Transférase (GST).....	59
II.6. Etude histologique.....	60
II.7. Exploration statistique.....	61

## **Résultats et interprétation**

I. Etude phytochimique .....	63
I.1. Rendement des extraits.....	63
I.2. Teneurs des composés phénoliques.....	63
I.3. Etude de l'activité antioxydante.....	65
II. Etude biologique.....	68
II.1. Etude pondérale.....	68
II.1.1. Variation du poids corporel.....	68
II.1.2. Variation du poids relatif de certains organes.....	68
II.2. Paramètres hématologiques.....	70
II. 3. Paramètres biochimiques sanguins.....	75
II.3.1. Bilan hépatique .....	75
II.3.2. Bilan rénal.....	77
II.3.3. Bilan énergétique.....	77
II. 4. Paramètres du stress oxydant.....	83
II.4.1. Glutathion réduit (GSH).....	83
II.4.2. Malondialdéhyde (MDA).....	83
II.4.3. Glutathion peroxydase (GPx).....	84
II.4.4. Glutathion - S- transférase (GST).....	84
II.5. Etude histologique.....	90

II.5.1. Etude histologique du foie.....90  
II.5.2. Etude histologique des reins.....90

**Discussion**

**I.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de *Juniperus phoenicea*.....93  
**II.** Etude de l'effet protecteur de *Juniperus phoenicea* contre la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone chez les rats : Effets sur la croissance pondérale, la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, l'histopathologie de certains organes ainsi que le profil du stress oxydant .....97

**Conclusion et perspectives**.....107  
**Références bibliographiques**.....109  
**Annexes**.....127

## Liste des abréviations

- AGPI** : Acides gras polyinsaturés
- AGNE** : Acide gras non estérifié
- AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium
- ALAT**: Alanine transaminase
- ASAT**: Aspartate transaminase
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BBC** : Bleu de Coomassie
- BSA** : Sérum albumine bovine
- CDNB** : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
- CCMH** : Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine
- CCl<sub>4</sub>** : Tétrachlorure de carbone
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DNTB** : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
- DPPH** : 2,2-diphényle-1- picrylhydrazyle
- EA** : Extrait aqueux
- EAc** : Extrait d'acétate d'éthyle
- EAG** : Equivalent acide gallique
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- EBr** : Extrait brut
- EBu** : Extrait butanolique
- EEt** : Extrait éther diéthylique
- ET** : Extrait tannique
- EPQ** : Extrait phase aqueuse restante
- EC** : Equivalent catéchine
- EQ** : Equivalent quercétine
- ERO** : Espèces réactives oxygénées
- EQ** : Equivalent quercétine
- EAJP** : Extrait aqueux de *Juniperus phoenicea*
- Fe<sup>2+</sup>** : Ions ferreux
- GPx** : Glutathion peroxydase

## Liste des abréviations

**GSH** : Glutathion réduit  
**GSSG** : Glutathion oxydé  
**GST** : Glutathion S-transférase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50 %  
**HCl** : Acide chlorhydrique  
**HOCl** : Acide hypochlorique  
**LDH** : Lactate déshydrogénase  
**MDA** : Malondialdéhyde  
**NaNO<sub>2</sub>** : Nitrite de sodium  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium  
**NO•** : Monoxyde d'azote  
**OH•** : Radical hydroxyle  
**O<sub>2</sub>•-** : Radical superoxyde (anion superoxyde)  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**ONOO** : Peroxynitrite  
**PAL** : Phosphatase alcaline  
**PS** : Poids de la matière sèche  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**TBA** : Acide thiobarbiturique  
**TCA** : Trichloroacétique  
**VGM** : Volume globulaire moyen

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques.....	<b>5</b>
<b>Tableau 2.</b> Principaux solvants chlorés.....	<b>22</b>
<b>Tableau 3.</b> Distribution de tétrachlorure de carbone dans les différents milieux .....	<b>26</b>
<b>Tableau 4.</b> Composition de l'alimentation pour 1 Kg d'aliment (ONAB) .....	<b>50</b>
<b>Tableau 5.</b> Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>64</b>
<b>Tableau 6.</b> Valeurs de l'activité antiradicalaire (%) des extraits des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> et de l'antioxydant standard (acide ascorbique).....	<b>65</b>
<b>Tableau 7.</b> Variation de poids corporel (g) et de poids relatif (g/100g de poids corporel) du foie, reins, testicules et cœur chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>69</b>
<b>Tableau 8.</b> Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>71</b>
<b>Tableau 9.</b> Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>78</b>
<b>Tableau 10.</b> Variation de glutathion (GSH), malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg protéine), glutathion peroxydase (GPx) ( $\mu\text{molGSH/mg}$ protéine) et de glutathion transférase (GST) (nmol GST/min/mg protéine) dans les organes (foie, reins, testicules et cœur) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>85</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défense antioxydant lors du stress oxydant.....	<b>04</b>
<b>Figure 2.</b> Principales sources de radicaux libres .....	<b>06</b>
<b>Figure 3.</b> Antioxydants intracellulaires.....	<b>08</b>
<b>Figure 4.</b> Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	<b>09</b>
<b>Figure 5.</b> Structure chimique de la vitamine E.....	<b>10</b>
<b>Figure 6.</b> Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH).....	<b>11</b>
<b>Figure 7.</b> Structure de la vitamine C.....	<b>12</b>
<b>Figure 8.</b> Différentes cibles des espèces réactives de l’oxygène.....	<b>13</b>
<b>Figure 9.</b> Transformation d’une liaison C-H en dérivé hydroxyle en présence de mono-oxygénases à cytochrome P450.....	<b>17</b>
<b>Figure 10.</b> Processus intervenant dans l’élimination urinaire.....	<b>19</b>
<b>Figure 11.</b> Processus intervenant dans l’élimination fécale.....	<b>20</b>
<b>Figure 12.</b> Métabolisme du tétrachlorure de carbone.....	<b>25</b>
<b>Figure 13.</b> Différentes familles de polyphénols * Polymères de flavonoïdes = proanthocyanidines, anthocyanogènes ou procyanidols.....	<b>32</b>
<b>Figure 14.</b> Principales classes de flavonoïdes.....	<b>33</b>
<b>Figure 15.</b> Structure chimique des tanins condensés.....	<b>34</b>
<b>Figure 16.</b> Structure chimique des éléments des tanins hydrolysables.....	<b>35</b>
<b>Figure 17.</b> Structure de base de Coumarine.....	<b>35</b>
<b>Figure 18.</b> Arbrisseau de <i>Juniperus phoenicea</i> dans la région d’El Aouinet.....	<b>38</b>
<b>Figure 19.</b> Feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>39</b>
<b>Figure 20.</b> Fleures de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>40</b>
<b>Figure 21.</b> Fruits de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>40</b>
<b>Figure 22.</b> Carte géographique de la région d’El Aouinet montrant la station de récolte.....	<b>42</b>
<b>Figure 23.</b> Protocole de préparation de l’extrait brut.....	<b>43</b>
<b>Figure 24.</b> Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	<b>45</b>
<b>Figure 25.</b> Protocole d’extraction des tanins.....	<b>46</b>

<b>Figure 26.</b> Réduction du radical DPPH•.....	<b>48</b>
<b>Figure 27.</b> Schéma récapitulatif de l'expérimentation.....	<b>52</b>
<b>Figure 28.</b> Représentation des rendements des différents extraits des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>63</b>
<b>Figure 29.</b> Activité antiradicalaire (%) des extraits des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH.....	<b>66</b>
<b>Figure 30.</b> Représentation de la concentration IC <sub>50</sub> des différents extraits des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> et de l'antioxydant standard (acide ascorbique).....	<b>67</b>
<b>Figure 31.</b> Variation de poids corporel en (g) des rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>69</b>
<b>Figure 32.</b> Variation du poids relatif de certains organes (foie, reins, cœur et testicules) en (g/100 g de pc) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>70</b>
<b>Figure 33.</b> Variation des globules blancs (x10 <sup>3</sup> /μl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>72</b>
<b>Figure 34.</b> Variation des plaquettes (x10 <sup>3</sup> /μl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>72</b>
<b>Figure 35.</b> Variation des globules rouges (x10 <sup>6</sup> /μl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>73</b>
<b>Figure 36.</b> Variation du Taux d'hémoglobine (g/dl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>73</b>
<b>Figure 37.</b> Variation du Taux d'hématocrite (%) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>74</b>
<b>Figure 38.</b> Variation de VGM (fl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>74</b>
<b>Figure 39.</b> Variation de CCMH (g/dl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>75</b>
<b>Figure 40.</b> Variation de la concentration plasmatique en protéines totales, albumine (g/l) et bilirubine totale (mg/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>79</b>
<b>Figure 41.</b> Variation de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO) et de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) (UI/L) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>80</b>
<b>Figure 42.</b> Variation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) et du lactate déshydrogénase (LDH) (UI/L) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>81</b>

<b>Figure 43.</b> Variation de la concentration plasmatique en urée (g /l), créatinine et acide urique (mg/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>82</b>
<b>Figure 44.</b> Variation de la concentration plasmatique glucose (g/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>83</b>
<b>Figure 45.</b> Variation de la teneur cellulaire en glutathion (GSH) (nmol/mg protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>86</b>
<b>Figure 46.</b> Variation de la teneur cellulaire en malondialdéhyde (n mole/mg de protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>87</b>
<b>Figure 47.</b> Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu$ mol GSH/mg de protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>88</b>
<b>Figure 48.</b> Variation de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (nmol GST/min/mg protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.....	<b>89</b>
<b>Figure 49.</b> Coupes histologiques du tissu hépatique coloré à l'Hématoxyline-Eosine/ Grossissement 400X : (A) Foie d'un rat témoin (lot T) ; (B) Foie d'un rat intoxiqué par le CCl <sub>4</sub> (lot TC) ; (C) Foie d'un rat intoxiqué par le CCl <sub>4</sub> et traité par l'EAJP (lot CJP) ; Foie d'un rat traité par l'EAJP (lot JP).....	<b>91</b>
<b>Figure 50.</b> Coupes histologiques du tissu rénal coloré à l'Hématoxyline-Eosine/ Grossissement 100X : (A) Rein d'un rat témoin (lot T) ; (B) Rein d'un rat intoxiqué par le CCl <sub>4</sub> (lot TC) ; (C) Rein d'un rat intoxiqué par le CCl <sub>4</sub> et traité par l'EAJP (lot CJP) ; Rein d'un rat traité par l'EAJP (lot JP).....	<b>92</b>

# Introduction générale

### Introduction générale

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du «stress oxydant». Plusieurs recherches ont mis en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO) (**Attia et al., 2012**). Ces dernières sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Yurt et Celik, 2011**). Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées (**Bidie et al., 2011**).

Le stress oxydant peut être induit par plusieurs facteurs tels que la pollution, le tabagisme, le vieillissement et le stress psychologique mais surtout l'intoxication par des xénobiotiques (**Boelsterli, 2007; Lodovici et Bigagli, 2011; Verschuere et al., 2012; Aschbacher et al., 2013; Siriwardena, 2014**). Parmi ces xénobiotiques on peut citer les dérivés halogénés qui constituent la classe des composés organiques dont les applications sont diverses dans les domaines agricole, industriel, médical et domestique (**Boust, 2011**). Le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) est un composé halogéné qui a été largement utilisé comme solvant dans plusieurs industries, il peut également induire un stress oxydatif chez les animaux de laboratoire (**Zimmerman, 1999; Ranjbar et al., 2014**). Bien que la plupart des données publiées sur la toxicité du CCl<sub>4</sub> portent sur les lésions hépatiques, des études récentes montrent que le foie n'est pas le seul organe cible pour le CCl<sub>4</sub>, mais aussi d'autres organes tels que les reins, les poumons, le cœur et les testicules peuvent être cités comme des cibles bioaccumulateurs de ce xénobiotique, ce qui mène vers une implication toxique signalée au niveau de ces organes (**Rai, 2012; Wassan et Arrack, 2014; Sahreen et al., 2014**). Pour faire face à ces intoxications, plusieurs travaux ont avancé des études sur l'exploration des effets protecteurs de nombreuses molécules antioxydantes contre les dommages induits par diverses substances toxiques en particulier le CCl<sub>4</sub> (**Joseph et al., 2015; Wu et al., 2017**).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Les antioxydants jouent un rôle important pour la santé, puisqu'ils sont capables de réduire ou de neutraliser les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Des recherches scientifiques dans diverses

spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plantes médicinales (**Popovici et al., 2009; Bourgou et al., 2016**).

Parmi les substances naturelles issues des végétaux, on retrouve les composés phénoliques, appartenant à la classe des composés dits de métabolisme secondaire, manifestent un spectre de propriétés pharmacologiques telles que: antibactériennes, anti-allergiques, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes et cardioprotectives et vasodilatatoires (**Ladoh Yemeda et al., 2014**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation de la croissance cellulaire, la rhizogenèse et l'interaction des plantes avec l'environnement biotique et abiotique. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (**Macheix et al., 2005; Boizot et Charpentier, 2006**).

En Afrique, les plantes médicinales sont largement utilisées pour la prévention et le traitement de diverses maladies (**Sangare et al., 2012**). La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques (**Boulaacheb et al., 2007**). *Juniperus phoenicea* est une plante de la famille des Cupressacées. Elle est très utilisée en médecine traditionnelle Algérienne dans le traitement du diabète, des affections broncho-pulmonaires, des maladies du foie et des voies biliaires (**Alejandro et al., 2004**). Cependant, nous disposons de peu de travaux scientifiques ayant validé ces propriétés.

De même, Malgré l'importance des polyphénols sur la santé, très peu d'études ont été effectuées sur les teneurs en composés phénoliques de *Juniperus phoenicea*, d'où l'objectif de cette étude qui consiste, en premier lieu, un screening phytochimique sur la plante en question, et évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des baies de *Juniperus phoenicea*, puis l'étude de l'effet protecteur de l'extrait aqueux de cette plante contre un polluant à savoir, le tétrachlorure de carbone sur des rats intoxiqués par ce dernier.

Pour ce faire, on a élaboré un plan de recherche s'articule sur trois parties :

La première partie est une synthèse bibliographique, où ont été abordées des notions sur le stress oxydatif, des généralités sur la toxicité et l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie, ainsi que des données sur l'espèce choisie «*Juniperus phoenicea*».

La deuxième partie a été consacrée à l'extraction, la caractérisation et l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de *Juniperus phoenicea*.

La troisième partie a été consacrée à l'étude expérimentale *in vivo* en explorant les effets protecteurs de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* contre la toxicité du tétrachlorure de carbone, au niveau des fonctions vitales étudiées (hématologique, hépatique et rénale) par :

- La détermination de quelques paramètres de croissance.
- Le dosage des paramètres biochimiques et hématologiques.
- L'évaluation des paramètres de stress oxydant par la détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.
- L'étude histologique de deux organes à savoir le foie et les reins.

# Etude bibliographique

Chapitre I : Stress oxydatif

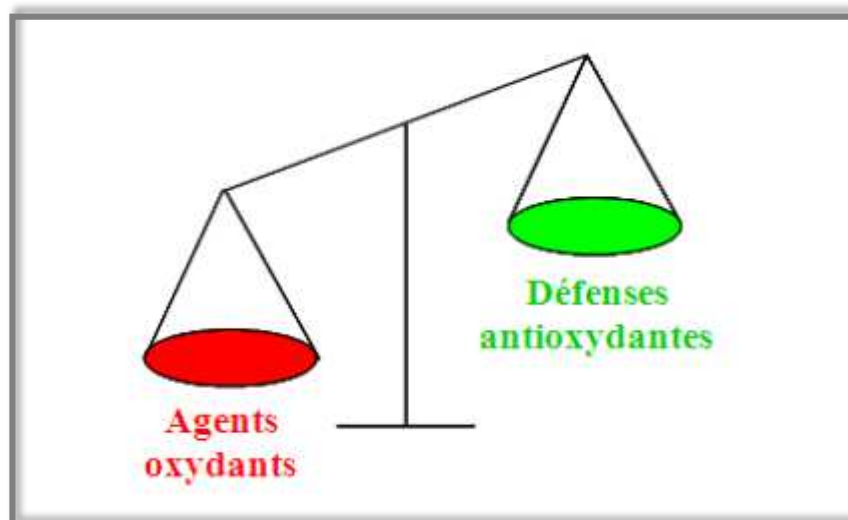
Chapitre II : Toxicité et tétrachlorure de carbone

Chapitre III : Phytothérapie et *Juniperus phoenicea*

### I. 1. Stress oxydatif

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou des accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie qui fournit 90 % de l'énergie nécessaire (**Rolfe et Brown, 1997**). Dans cet organite intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (Adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique. Cependant 2 à 3 % de l'oxygène n'est pas réduit en eau, il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivés de l'oxygène très réactives (**Auberval, 2010**).

A l'état physiologique on peut considérer qu'il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes anti-oxydants. Cependant, dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des anti-oxydants (figure 1), ou encore par une association des deux phénomènes. On parle alors de stress oxydant (**Baudin, 2006**). Celui-ci est à l'origine de nombreux effets tant au niveau moléculaire que cellulaire. Par exemple, il provoque des dommages vis-à-vis des principales cibles moléculaires biologiques (lipides, protéines, acides nucléiques). Il est souvent toxique pour les cellules, entraînant leur nécrose (**Delattre et al., 2003**).



**Figure 1.** Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défense antioxydant lors du stress oxydant (**Auberval, 2010**).

## I. 2. Radicaux libres

### I. 2. 1. Définition

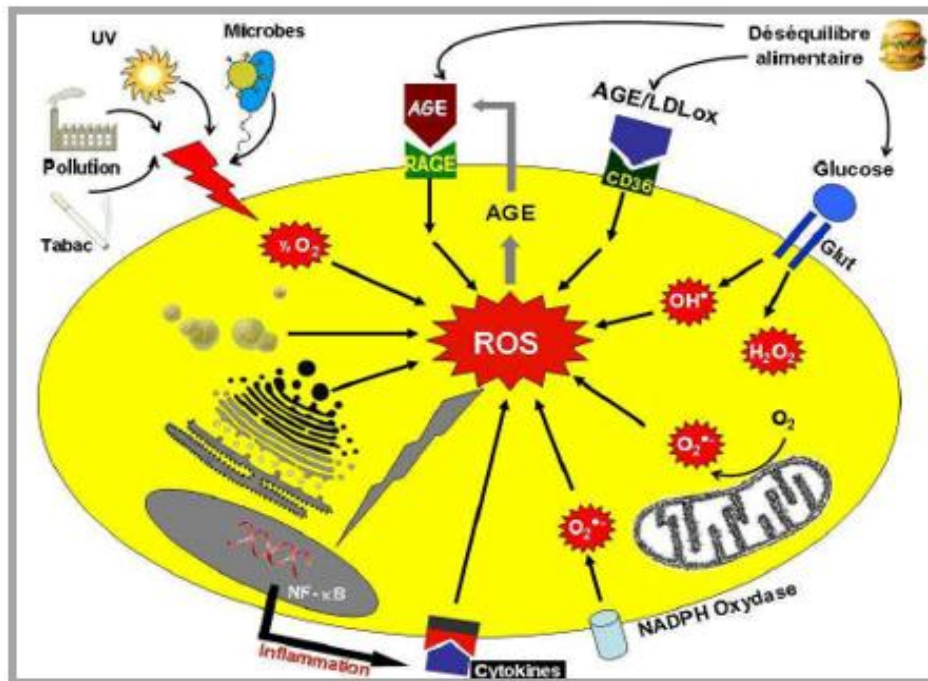
Un radical libre est une molécule ou un atome qui possède un ou plusieurs électrons non appariés ou célibataires au niveau de ses orbitales externes. Il réagit spontanément avec d'autres atomes ou molécules pour former un nouveau radical provoquant ainsi une réaction en chaîne qui n'est interrompue que lorsque deux radicaux libres réagissent entre eux. Les radicaux libres sont des espèces instables, très réactives, et qui possède un temps de demi-vie extrêmement court :  $10^{-9}$ .  $10^{-6}$  sec (**Delattre et al., 2003**). On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires (tableau 1). Ces molécules, qui sont soit des radicaux libres (possédant un électron non apparié), soit des espèces non radicalaires, ont en commun un caractère oxydant et une réactivité chimique élevée (**Roberfroid et al., 2008**).

**Tableau 1** : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques (**Yzidorczyk, 2011**).

Radicaux libres		Espèces non-radicalaires	
ERO	ERN	ERO	ERN
$O_2^{\bullet -}$ : anion superoxide	$\bullet NO$ : monoxyde d'azote	$ONOO^-$ : anion peroxydinitrite	$ONOO^-$ : anion peroxydinitrite
$\bullet H_2O$ : radical hydroperoxyl	$\bullet NO_2$ : dioxyde d'azote	$OONO^-$ : anion peroxydinitrate	$OONO^-$ : anion peroxydinitrate
$\bullet OH$ : hydroxyl	$\bullet NO_3$ : nitrate	$H_2O_2$ : peroxide d'hydrogène	$ONOOH$ : acide peroxydinitreux
$RO\bullet$ : radical alkoxy		$O_2$ : oxygène singulet	$ROONO$ : alkyl peroxydinitrate
$ROO\bullet$ : radical alkoperoxy		$O_3$ : ozone	$HNO_2$ : acide nitreux
$ROOH\bullet$ : radical hydroxyperoxyl		$HOCl$ : acide hypochloreux	$NO^+$ : cation nitrosyl
		$ROOH$ : peroxides organiques	$NO^-$ : anion nitrosyl

### I. 2. 2. Sources de radicaux libres

Les sources de production des radicaux libres sont multiples (figure 2), parmi lesquels les systèmes endogènes (Favier, 2006). Ces derniers se situent essentiellement au niveau des chaînes mitochondriales des cellules aérobies de l'organisme (Hébuterne *et al.*, 2009).

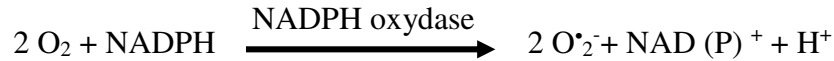


**Figure 2.** Principales sources de radicaux libres (Rondeau, 2009).

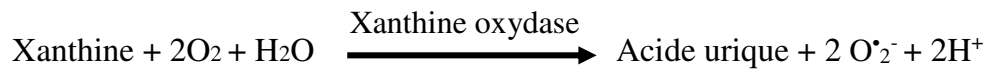
Les radicaux libres peuvent également être formés au niveau du réticulum endoplasmique via le transport d'électrons NADPH-dépendant du cytochrome P450 (Thiebault et Sprumont, 1997).

Les peroxysomes sont aussi une importante source de production d' $H_2O_2$  cellulaire (Bauchart et picard, 2010). Ces organites sont particulièrement nombreux dans les cellules du foie et des reins, où ils contribuent très activement à la détoxification (Brooker, 2000 ; Marieb et Hoehn, 2014). Toutefois, l' $H_2O_2$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats (Maurice, 2012). Selon la réaction de Fenton, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) et de fer permet la production de radical hydroxyle ( $OH\bullet$ ) (Lacolley, 2007).

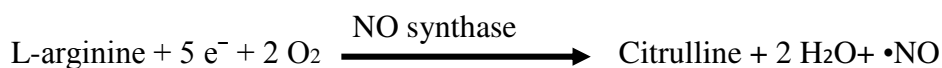
D'autres enzymes peuvent réduire  $O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$ . En particulier la NADPH oxydase, activée par le processus phagocytaire des cellules (polynucléaires, neutrophiles, monocytes/macrophages) en réponse à une agression bactérienne ou virale (**Moussard, 2006 ; Revuz, 2009 ; Clos, 2012**).



Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique (**Moussard, 2006 ; Lacolley *et al.*, 2007**).



De même, la voie de synthèse des prostaglandines catalysée par la lipoxigénase et la cyclo-oxygénase, implique la production de radicaux libres (**Jadot, 1994 ; Moussard, 2006**). D'autres enzymes, appelées NO synthases (constitutive et inductible) conduit à la formation, à partir de l'acide aminé L- arginine de  $\bullet NO$  (**Demoly et Bousquet, 2002 ; Cano *et al.*, 2006**). Le monoxyde d'azote est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes. Il est capable de réagir avec  $O_2^{\cdot-}$  pour donner le peroxyde nitrite  $ONOO^-$ , oxydant puissant vis-à-vis de nombreuses molécules biologiques (**Delattre *et al.*, 2003**).



Une autre source de radicaux libres est liée à l'auto-oxydation de certaines molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones. Le produit direct de ces auto- oxydations est souvent l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  (**Garait, 2006**).

Les principaux producteurs exogènes de radicaux libres sont les rayonnements ionisants qui proviennent en grande partie de la radioactivité naturelle d'origine tellurique mais aussi les rayonnements de plus faible énergie, tels que les ultraviolets ou même la lumière visible. L'ozone lui-même est un oxydant puissant également producteur de radicaux libres toxiques (**Thivolet et Claudy, 1999**).

### I. 3. Systèmes de défense antioxydants

Face à la production physiologique de ERO, l'organisme dispose de systèmes de protection (systèmes de défense antioxydants) permettant de maintenir les radicaux libres à faible concentration (Lacolley, 2007). Le terme antioxydant désigne toute substance qui est présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation du substrat (Auberval, 2010). Les systèmes de défense antioxydants sont de deux types : enzymatiques ou non enzymatiques (figure 3). L'équilibre existant entre la production de ERO et les défenses antioxydantes permettent de préserver l'intégrité de la cellule (Lacolley, 2007).

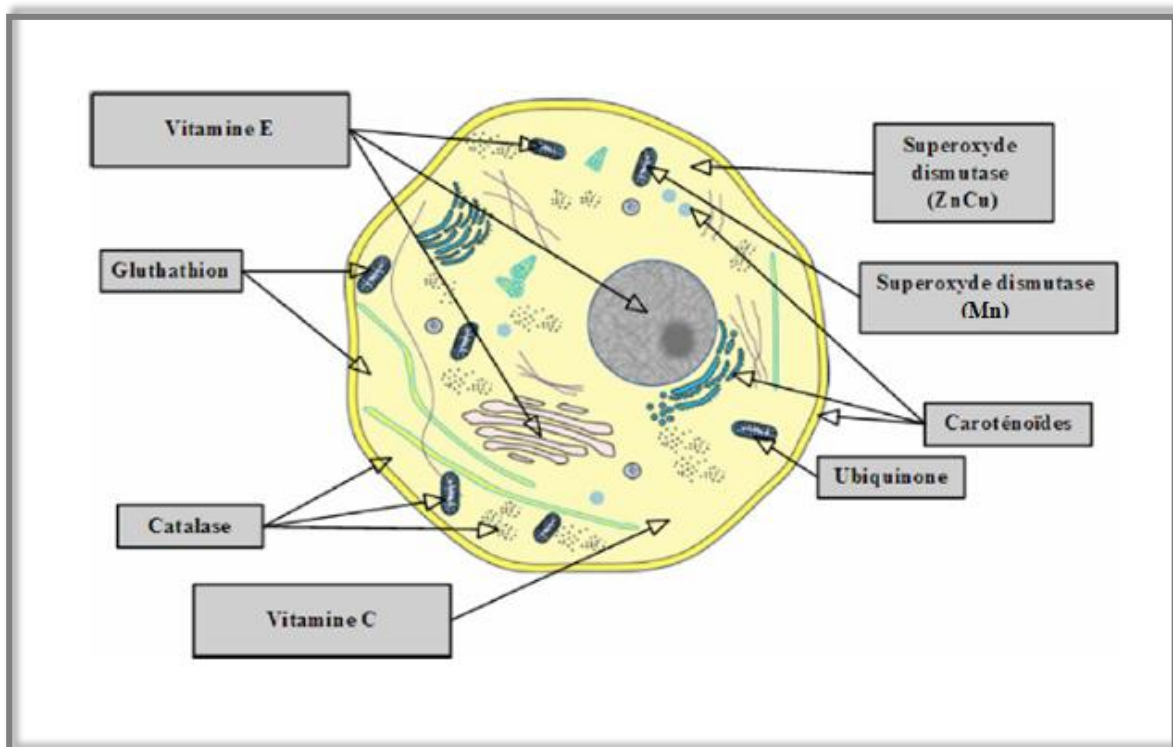


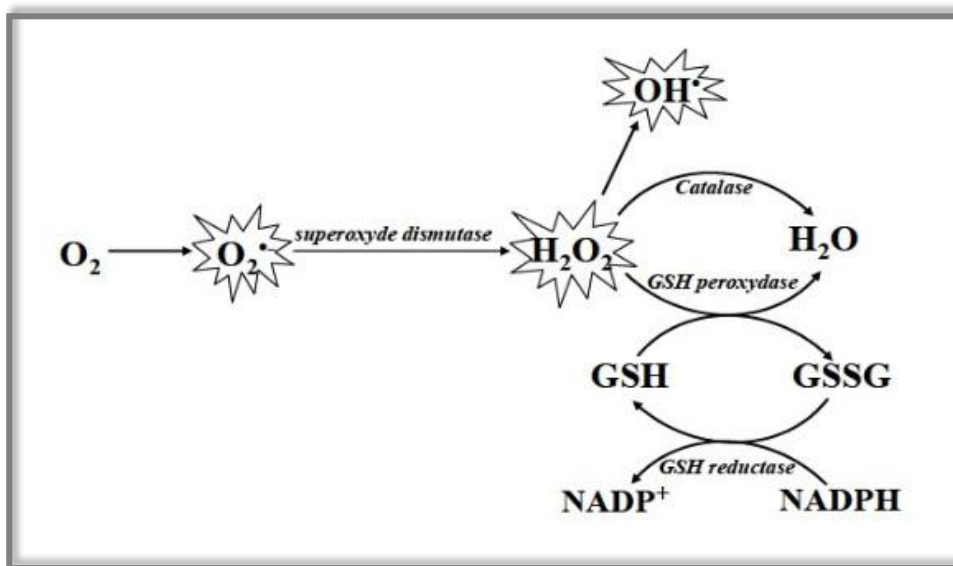
Figure 3. Antioxydants intracellulaires (Amzal, 2010).

#### I.3.1 Système de défense enzymatique

##### ❖ Superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène :  $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ , empêchant ainsi la

coexistence de ces deux espèces radicalaires, et par conséquent, la génération du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss. Il existe trois types de superoxydes dismutases ayant une localisation différente : une SOD cytoplasmique dimérique à cuivre et zinc, une SOD extracellulaire tétramérique à cuivre et zinc et une SOD mitochondriale tétramérique à manganèse. L'action de la SOD doit être couplée à celles d'enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène, comme une catalase ou une glutathion peroxydase, afin d'éviter l'augmentation des concentrations en  $H_2O_2$  qui peut induire la formation de radical hydroxyle en présence de fer par la réaction de Fenton (figure 4) (Lacolley, 2007).



**Figure 4.** Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Garait, 2006).

#### ❖ Catalases

Les catalases sont des enzymes qui permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau :  $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ . Ces enzymes comportent quatre sous-unités protéiques, chacune contenant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes sont essentiellement présentes dans les peroxysomes et dans les hématies (Delattre *et al.*, 2003 ; Lacolley, 2007).

#### ❖ Glutathion peroxydases (GPx)

Les glutathions peroxydases (GPx) sont des enzymes tétramériques à sélénium cytoplasmiques et mitochondriales, qui peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, en

utilisant les capacités réductrices du couple glutathion/ glutathion disulfide (GSH/GSSG) :  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$  (**Russo-Marie, 1998 ; Lacolley, 2007**). Les GPx permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne en réduisant les peroxydes instables en acides gras hydroxylés. Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion réductase en présence de NADPH selon la réaction suivante :  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}$  (**Russo-Marie, 1998**). Ce dernier pouvant être lui-même régénéré par l'intermédiaire d'un couplage métabolique avec la voie des pentoses phosphates.

### I. 3.2. Système de défense non enzymatique

Divers piègeurs de radicaux libres non enzymatiques peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres. Ces composés sont facilement oxydables, relativement stables et conduisent à des dismutations permettant l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne. Ce système de protection peut être à la fois membranaire (vitamine E, A), cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C, acide urique) (**Lacolley, 2007**).

#### ❖ Vitamine E

La vitamine E, représente en majorité par l' $\alpha$ -tocophérol (figure 5) est un composé antioxydant puissant, notamment du fait de son caractère lipophile, qui lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire. En échangeant un électron libre, le tocophérol se transforme en radical tocophéroxyde, peu réactif de par sa structure cyclique. Le radical tocophéroxyde peut être régénéré par l'ascorbate, qui devient alors radicalaire. Lors d'un stress oxydatif, ces deux vitamines agissent conjointement en formant une chaîne de détoxification des radicaux libres (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**).

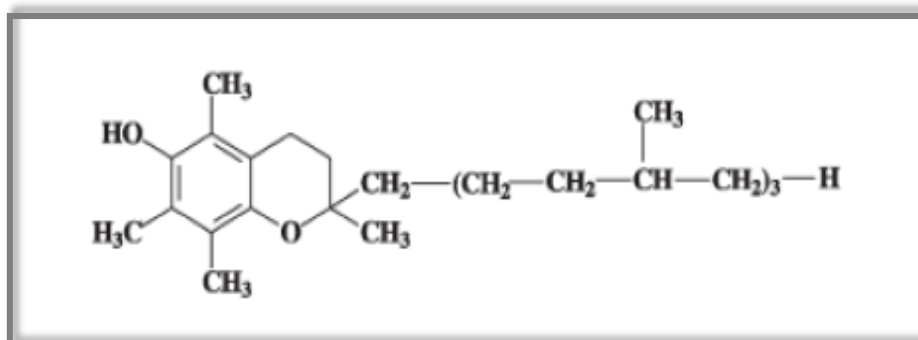
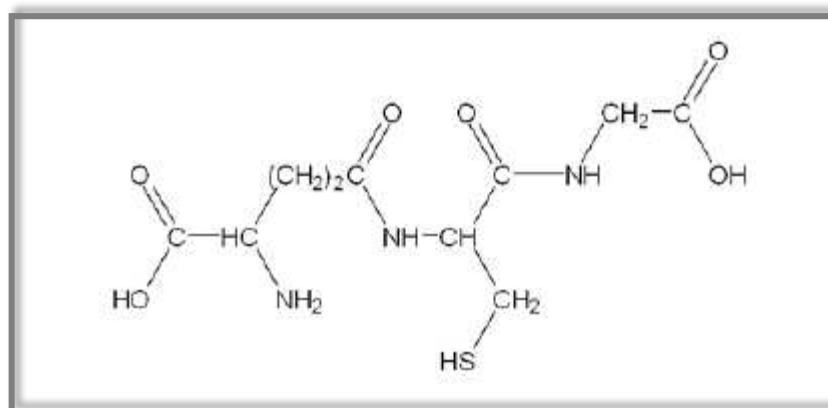


Figure 5. Structure chimique de la vitamine E (**Auberval, 2010**).

### ❖ Glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-glutamyl cystéinyl glucine (figure 6) (Beaudeau et Durand, 2011). C'est le thiol intracellulaire le plus abondant (Auberval, 2010), présent en concentrations millimolaires (Dubois, 2015) dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous sa forme réduite (GSH), soit sous sa forme oxydée (GSSG) (Poisson, 2013). Les formes GSH (réduite) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges d'électrons à l'intérieur de celle-ci (Auberval, 2010). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'  $H_2O_2$  est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé est augmenté (Garait, 2006 ; Beaudeau et Durand, 2011). Le glutathion est considéré comme le principal antioxydant non enzymatique intracellulaire. Sa capacité antioxydante réside dans la présence d'un groupement thiol ( $-SH$ ) présent sur la cystéine réduite. Le groupement thiol permet au glutathion d'intervenir dans de nombreuses réactions de réduction (Dubois, 2015). Il participe à l'élimination du  $H_2O_2$  et des LOOH, agit également comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase. Il permet aussi le maintien de certains composés sous leur forme réduite comme les vitamines C et E (Lacolley, 2007).



**Figure 6.** Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH) (Auberval, 2010).

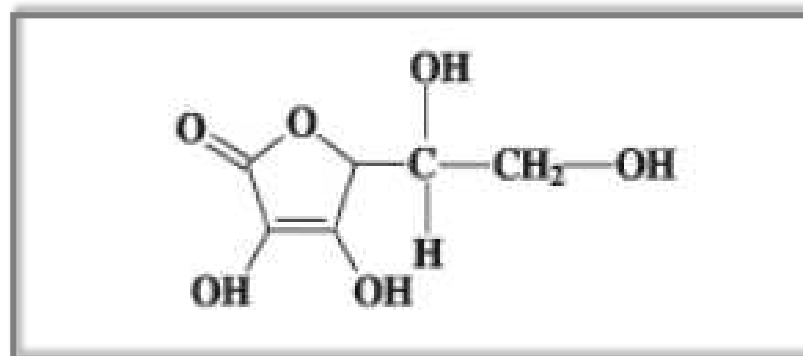
### ❖ Acide urique

L'acide urique est le produit final inerte du métabolisme des purines. Un excès de sa synthèse ou un défaut de son élimination urinaire conduit à l'hyperuricémie, qui est liée à

l'apparition de plusieurs pathologies telles que le diabète, l'hypertension et la goutte (**Sekli-belaidi, 2011**). L'acide urique possède une fonction de piègeur important vis-à-vis de certains composés très réactifs, comme l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et hydroxydes, ainsi que de l'acide hypochloreux produit par la myéloperoxydase (**Lacolley, 2007**). Il représente en effet 60 % de la capacité anti-oxydante plasmatique (**Poisson, 2013**).

#### ❖ Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'anti-oxydant naturel le plus efficace dans le plasma humain (figure 7). Grâce au faible potentiel redox du couple ascorbate/radical ascorbyle, la vitamine C est capable de céder un électron à pratiquement tous les radicaux libres pouvant intervenir dans un système biologique, comme les radicaux superoxydes, hydroxydes et peroxydes (**Lacolley, 2007**). Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (**Garait, 2006**). La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques dont  $Fe^{3+}$  pour le réduire en  $Fe^{2+}$  qui pourra ensuite catalyser différentes réactions dont celle de Fenton :  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH\cdot + Fe^{3+} + OH^-$  générant ainsi de nouvelles ERO (**Poisson, 2013**).

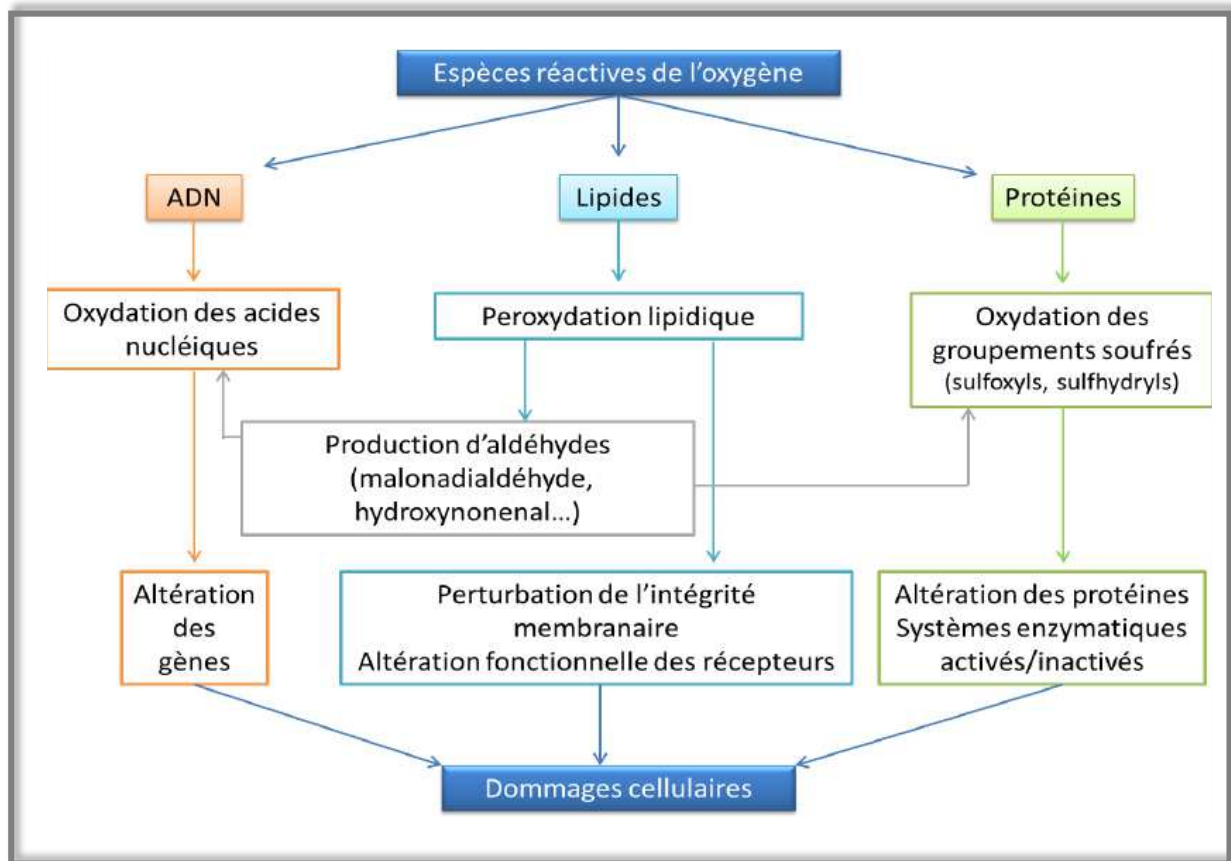


**Figure 7.** Structure de la vitamine C (**Auberval, 2010**).

#### I. 4. Le stress oxydant et les dégâts cellulaires

Lorsque la production des espèces radicalaires n'est pas adéquatement contrôlée par les mécanismes de protection ou de défense existants, il s'en suit un état de stress oxydant. Des molécules biologiques importantes pour le fonctionnement cellulaire constituent des cibles privilégiées des radicaux libres, en particulier les acides gras insaturés (constituants des

phospholipides membranaires), les groupes thiols, les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques (figure 8) (Rilauwerys, 2007).



**Figure 8.** Différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (Poisson, 2013).

#### I. 4. 1. Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), qu'ils soient sous forme non estérifiée (AGNE) ou estérifiée (phospholipides, esters, cholestérol, triglycérides), sont la cible lipidique majeure des radicaux libres. La peroxydation lipidique désigne la détérioration oxydative des acides gras polyinsaturés (Delattre *et al.*, 2003). Ce processus est maintenu par la génération continue d'hydroperoxydes dont  $R^{\bullet}$  est le radical libre initiateur de la réaction. L'attaque initiale s'effectue sur le groupement méthylène séparant deux doubles liaisons de l'acide gras. Le radical lipidique ainsi formé subira une série de réactions en chaîne dont la première est une réaction avec l'oxygène moléculaire. Une altération des membranes microsomiques, mitochondriales et lysosomiales en résulte, entraînant finalement la mort cellulaire

(**Rilauwerys, 2007**). La peroxydation lipidique fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (**Garait, 2006**). Parmi les produits formés lors de ce processus, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2- nonéanal (4- HNE) (**Rilauwerys, 2007**). Ces derniers ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique. La réaction en chaîne peut être interrompue par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**).

#### **I. 4. 2. Oxydation des protéines**

La production de radicaux libres peut mener à l'oxydation des protéines et en particulier à l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés, à la formation de ponts entre les protéines, ou à la fragmentation des protéines par l'oxydation des liaisons peptidiques. Beaucoup d'enzymes possèdent des groupements thiols au niveau de leur site catalytique et l'attaque de groupements thiols par les espèces radicalaires inactive ces enzymes (**Rilauwerys, 2007**). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les métaux de transition comme le  $Fe^{2+}$  ou le  $Cu^{2+}$ . En présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou d'hydroperoxydes (ROOH), il y'a une décomposition de ces derniers et une production de différents types de radicaux libres ( $OH\bullet$ ,  $ROO\bullet$ ). Ceux-ci réagissent préférentiellement avec l'acide aminé qui avait fixé le métal de transition (**Delattre et al., 2003**). L'oxydation des protéines est impliquée dans plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, le syndrome de détresse respiratoire, la dystrophie musculaire, l'ischémie-reperfusion cardiaque et le vieillissement (**Habbout, 2012**).

#### **I. 4. 3. Oxydation des acides nucléiques**

Les acides ribo et désoxyribonucléiques (ARN, ADN) représentent des cibles privilégiées pour les radicaux libres. Il a été constaté que l'ADN d'une cellule peut être le siège de 10000 attaques radicalaires par jour (**Delattre et al., 2003**), dont l'une des conséquences est la formation de 8-hydroxydeoxyguanosine (8OH-dG). Cette dernière résulte de l'attaque de la guanosine par le radical  $OH\bullet$ . Dans l'ADN nucléaire, on estime qu'une guanosine sur 130 000 est oxydée sous la forme de 8-OH-dG qui peut notamment être dosée dans l'urine et constitue un biomarqueur de lésion antioxydante de l'ADN. Lorsque les modifications des

bases nucléiques sont mal réparées, elles peuvent donner lieu à la formation des mutations qui participeront éventuellement à un processus de cancérogénèse (**Rilauwerys, 2007**).

### **I. 5. Les pathologies liées au stress oxydant**

Des travaux récents ont mis en évidence que le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant le cancer (**Lehucher-Michel, 2001**), les maladies neurodégénératives (**Chemouny, 2012**) et l'athérosclérose (**Garnier, 2005 ; Baudin, 2006**). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué dans l'installation des dysfonctionnements importants au niveau du système cardiovasculaire, le vieillissement et l'obésité (**Soares, 2005**). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida, le choc septique, le diabète, la maladie de parkinson ou l'insuffisance rénale (**Favier, 2006**). Il a été démontré que certains composés bioactifs possèdent des propriétés antioxydantes permettant de lutter contre diverses maladies. Cet effet protecteur est dû essentiellement à l'activité antioxydante de ces composés qui neutralisent les radicaux libres. L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants visera à prévenir la survenue de ces maladies (**Henanei et al. 2015**). Il semble donc important de tester l'effet thérapeutique des molécules antioxydantes naturelles ou de synthèse qui peuvent agir dans la prévention des maladies dégénératives à la condition d'être apportées très tôt avant l'apparition de mécanismes induits irréversibles, et à doses modérées car la production basale de radicaux libres est indispensable à de nombreuses fonctions et ne doit pas être supprimée (**Favier, 2006**).

## II.1. Définition

### II.1.1. Substance toxique

Une substance toxique se dit d'une substance lorsque, après pénétration dans l'organisme, par quelque voie que ce soit, à une dose relativement élevée en une fois ou en plusieurs fois très rapprochées ou par petites doses longtemps répétées, elle provoque, dans l'immédiat ou après une phase de latence plus ou moins prolongée, de façon passagère ou durable, des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme pouvant aller jusqu'à leur suppression complète et par la suite entraîner la mort (**Gazengel et Orecchioni, 2013**).

### II.1.2. Toxicité

La toxicité est la capacité intrinsèque d'un agent chimique à avoir un effet nocif sur un organisme. Il existe deux grands types de toxicité: la toxicité aiguë et la toxicité chronique (**Aiache et al., 2008**).

#### ❖ Toxicité aiguë

La toxicité aiguë résulte de l'absorption d'une dose élevée de toxique en une seule fois. Les prises peuvent être multiples mais rapprochées sur 24 heures. La probabilité d'apparition de la toxicité aiguë sera d'autant plus grande que la dose sera élevée. Elle se manifeste lors d'un surdosage accidentel ou volontaire et entraîne des troubles immédiats (**Stora, 2013**).

#### ❖ Toxicité chronique

La toxicité chronique se manifeste à retardement à la suite de l'administration répétée et prolongée dans le temps d'une substance active. C'est la conséquence d'une accumulation de cette substance dans l'organisme jusqu'à atteindre une valeur critique (**Aiache et al., 2008**).

### II.1.3. Xénobiotique

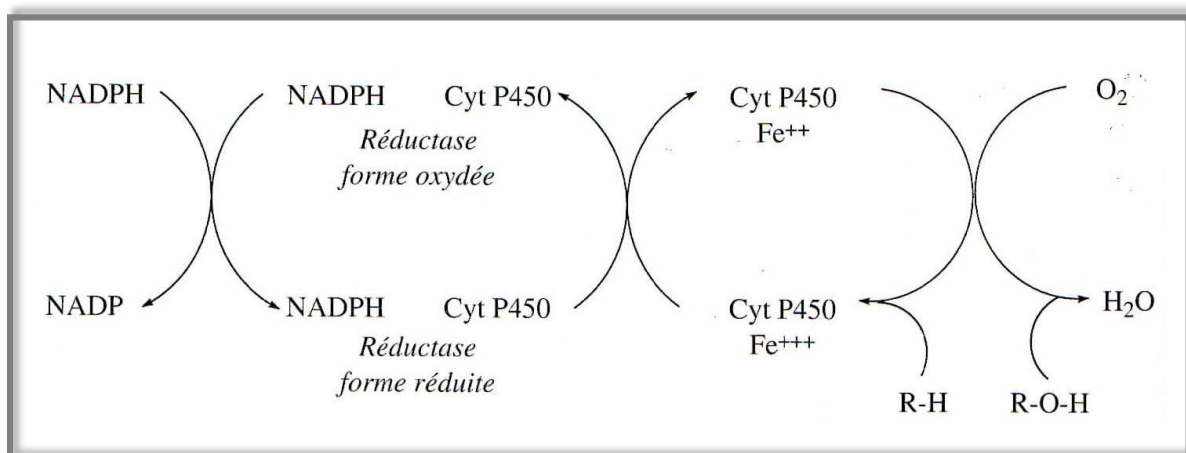
Un xénobiotique est une substance étrangère, c'est-à-dire extérieure à l'organisme, par opposition aux composants endogènes. Les toxiques sont des xénobiotiques susceptibles d'exercer des effets délétères sur les organismes vivants et leur environnement (**Gazengel et Orecchioni, 2013**). Les xénobiotiques comprennent : les médicaments, les produits chimiques industriels, les poisons naturels et les polluants environnementaux (**Dufresne, 2000**).

## II.2. Biotransformation des xénobiotiques

La biotransformation est un processus qui mène à la transformation métabolique de composés étrangers (xénobiotique) dans l'organisme. Ce processus est souvent appelé métabolisme des xénobiotiques. En règle général, le métabolisme convertit les xénobiotiques liposolubles en métabolites hydrosolubles, de poids moléculaire plus élevé et facile à éliminer. Le foie est le principal site de la biotransformation. Tous les xénobiotiques absorbés au niveau intestinal sont transportés vers le foie. Les xénobiotiques inhalés parviennent au foie par la circulation générale. Seule une fraction de la dose est alors métabolisée avant d'atteindre les autres organes.

### II.2.1. Réactions de la phase I

Constitue la première étape du métabolisme d'un xénobiotique, indique généralement que le composé est oxydé. L'oxydation crée habituellement un composé plus hydrosoluble et facilite les réactions ultérieures. Les enzymes du cytochrome P450 constituent un groupe d'enzymes oxydant préférentiellement les xénobiotiques lors des réactions de la phase I (figure 9). Ces dernières sont des enzymes microsomales surtout présentes dans le foie mais aussi dans d'autres tissus comme l'intestin. D'autres enzymes peuvent également intervenir, notamment les flavines mono-oxygénases, les alcools déshydrogénases, les estérases et les monoamine-oxydases...) (Dufresne, 2000 ; Rilauwerys *et al.*, 2007).



**Figure 9.** Transformation d'une liaison C-H en dérivé hydroxyle en présence de mono-oxygénases à cytochrome P450 (Viala et Botta, 2005).

### II.2.2. Réactions de la phase II

Représentent la seconde étape dans le métabolisme des xénobiotiques, signifie que le composé oxydé est conjugué à une molécule endogène. Cette réaction se caractérise par une augmentation de l'hydrosolubilité. Les transférases constituent un groupe d'enzymes catalysant les réactions de la phase II. Elles conjuguent les xénobiotiques avec des composés endogènes tels que le glutathion, les acides aminés, l'acide glucuronique ou le sulfate. De nombreux métabolites conjugués sont fortement excrétés par la voie rénale (**Dufresne, 2000**).

### II.3. Elimination des xénobiotiques

Après leur absorption, leur distribution dans l'organisme et leurs biotransformations, les xénobiotiques ou de leurs métabolites peuvent être excrétés de multiples façons. La principale voie est l'excrétion rénale. L'élimination avec les fèces, l'excrétion par les poumons ou par d'autres voies peuvent aussi intervenir.

#### II.3.1. Excrétion rénale

Le rein est un organe spécialisé dans l'excrétion de nombreux toxiques et métabolites hydrosolubles permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Chaque rein possède environ un million de néphrons capables d'assurer cette excrétion. L'excrétion rénale est un mécanisme très complexe comprenant trois processus (figure 10) :

- **Filtration glomérulaire**

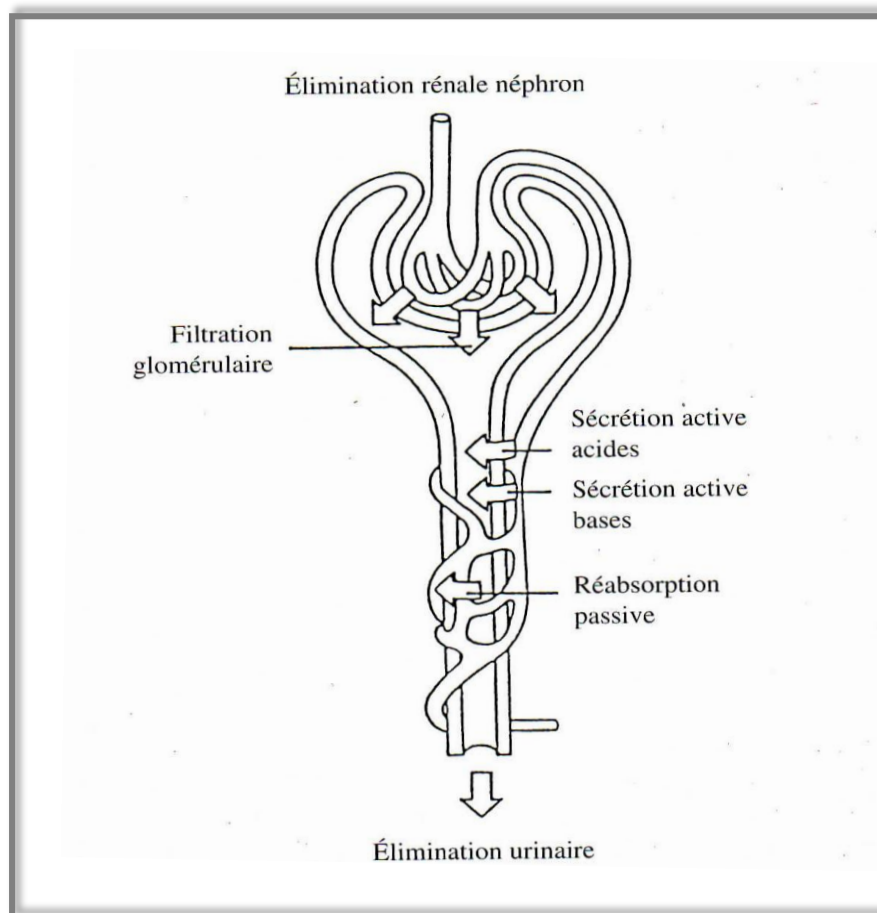
Le diamètre des pores des capillaires du glomérule est suffisamment large (70nm) pour autoriser la filtration passive des molécules de masse molaire inférieure à 60000. Ce sont les formes libres qui filtrent au travers du glomérule. Après filtration dans le tubule, les composés polaires (hydrosolubles) sont excrétés dans l'urine.

- **Réabsorption tubulaire**

Certains composés relativement liposolubles et présentant un caractère acide peuvent se trouver sous forme non-ionisée dans les tubules rénaux en raison du pH acide de l'urine. Ces composés sont alors partiellement réabsorbés après filtration glomérulaire. Cette propriété est utilisée dans certains surdosages en cas d'intoxication par ces produits, en alcalinisant les urines afin d'intensifier leur excrétion rénale (**Viala et Botta, 2005**).

- **Sécrétion tubulaire**

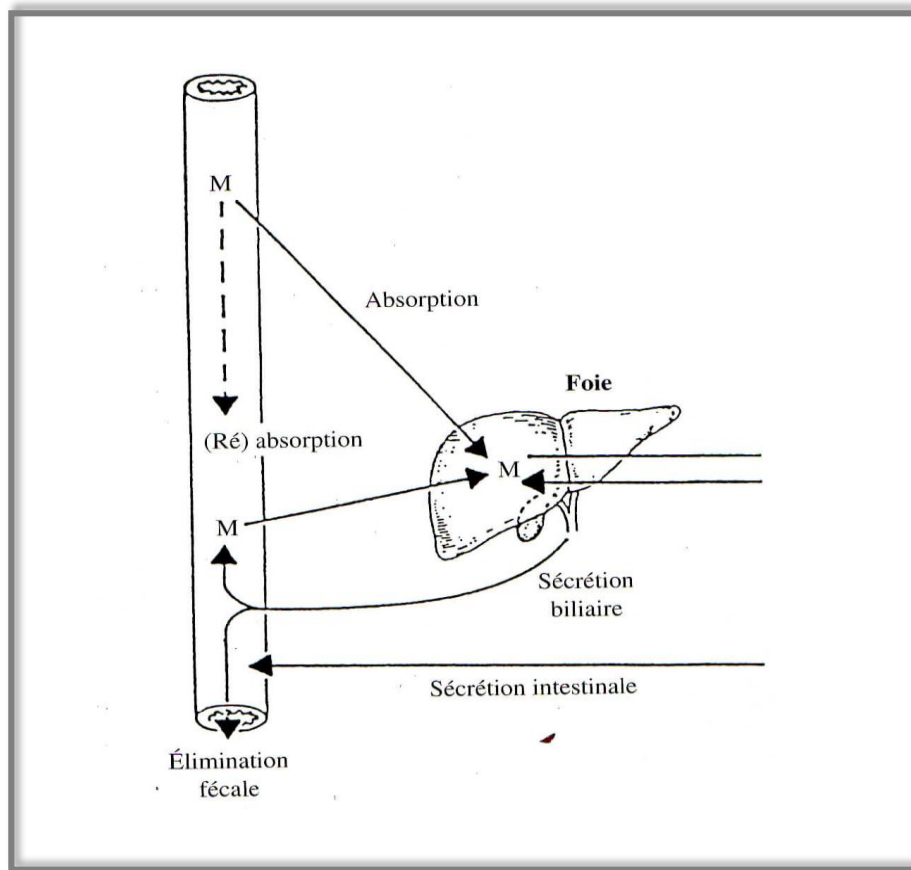
La sécrétion tubulaire s'effectue le long des tubules rénaux et des tubules rénaux collecteurs par diffusion passive ou transport actif. Les substances sécrétées sont notamment les ions hydrogène ( $H^+$ ), potassium ( $K^+$ ) et ammonium ( $NH_4^+$ ), l'urée, la créatinine (déchet de la créatine produit par myocytes) et certains médicaments, dont la pénicilline (**Tortora et Derrickson, 2017**).



**Figure 10.** Processus intervenant dans l'élimination urinaire (**Viala et Botta, 2005**).

### II.3.2. Élimination fécale

Elle concerne les xénobiotiques qui ne sont pas absorbés au niveau des voies digestives. De même ceux qui sont transférés directement du sang vers la lumière intestinale, suivant un gradient de concentration ou par exfoliation des cellules muqueuses de l'intestin ; et surtout les xénobiotiques qui sont excrétés par voie biliaire (figure 11), après métabolisme ou simple passage de l'hépatocyte (**Kintz, 1998**).



**Figure 11.** Processus intervenant dans l'élimination fécale (Viala et Botta, 2005).

### II.3.3. Elimination pulmonaire

Elle concerne les gaz et les liquides très volatils en impliquant un mécanisme de diffusion passive. L'élimination est inversement proportionnelle à la vitesse d'absorption (Viala et Botta, 2005), plus le coefficient de partition air/sang est faible, plus le gaz sera absorbé, mais moins facilement il sera excrété par voie respiratoire, et inversement (Kintz, 1998). Les composés très liposolubles, qui font l'objet d'un stockage dans le tissu adipeux, peuvent être excrétés pendant de longues périodes après l'exposition; c'est le cas notamment d'anesthésiques halogénés comme l'halothane ou le méthoxyflurane, que l'on retrouve dans l'air expiré plusieurs semaines après une anesthésie (Viala et Botta, 2005). Un certain nombre de solvants organiques et autres volatils sont largement excrétés par voie pulmonaire : acétone, acide cyanhydrique, alcools, benzène, chloroforme, essence, éthers, fluothane, oxyde de carbone, tétrachlorure de carbone, trichloroéthylène, xylènes, etc (Kintz, 1998).

### II.3.4. Autres voies d'élimination

L'élimination par la salive et la sueur sont des voies mineures d'excrétion, qui se fait par diffusion passive. Les substances excrétées dans la salive telles que l'éthanol, plomb, mercure, arsenic, alcaloïdes, cocaïne et médicaments psychotropes sont réingérées pour atteindre le tractus gastro-intestinal, où elles peuvent être réabsorbées ou éliminées par les fèces (**Dufresne, 2000; Viala et Botta, 2005**). On peut également retrouver dans la sueur de nombreux produits non ionisés tels que : alcool éthylique, acétone, phénols, sulfure de carbone et hydrocarbures chlorés (**Dufresne, 2000**). Certains d'entre eux peuvent être responsables de dermites (**Viala et Botta, 2005**).

De nombreux métaux, solvants organiques et certains pesticides organochlorés sont excrétés dans le lait maternel (**Dufresne, 2000**). L'excrétion lactée ne constitue qu'une voie accessoire d'élimination pour la femme, mais peut constituer un danger pour le nouveau-né. Elle peut s'effectuer par filtration intercellulaire, diffusion passive transmembranaire ou transport actif par l'intermédiaire des vésicules de sécrétion (**Guerre et al., 2000**). L'excrétion au niveau des phanères des xénobiotiques minéraux et organiques est considérée comme un processus de stockage plutôt que d'élimination (**Viala et Botta, 2005**).

## II.4. Solvants chlorés

### II.4.1. Définition

Les solvants chlorés sont des dérivés halogénés des carbures aliphatiques, soit des dérivés saturés ou des dérivés insaturés (**Ramade, 2011**). Ils présentent un grand intérêt dans l'industrie du froid, des extincteurs d'incendie et des solvants. Ils ont connu un développement spectaculaire dans le domaine du dégraissage grâce à leur inflammabilité (**Jean, 2012**). La consommation des solvants chlorés est en diminution, suite à des réglementations visant à préserver l'environnement et la santé. Ses composés font partie des composés organiques volatils et sont impliqués dans la destruction de la couche d'ozone stratosphérique et contribueraient également à l'effet de serre (**Trachte, 2012**). Les eaux souterraines contaminées aux solvants chlorés posent de sérieux problèmes à la santé humaine et à l'environnement, puisque leurs intermédiaires de dégradation sont souvent très toxiques, voir cancérogènes (**Quevauviller, 2010**). Le tableau 2 regroupe les principaux solvants chlorés.

**Tableau 2.** Principaux solvants chlorés (Viala et Botta, 2005).

Solvants	Formule	Température d'ébullition	Emplois
Chlorure de méthyle	CH <sub>3</sub> Cl	-24°C	Industrie du froid
Dichlorométhane	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40,1°C	Solvant
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	61°C	Synthèse - Solvant
Tétrachlorure de carbone	CCl <sub>4</sub>	76°C	Synthèse des fréons
1,1,1-Trichloréthane	CCl <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	73,8°C	Solvant
1,1,1-Trichloréthylène	CCl <sub>2</sub> =CHCl	86,7 °C	Solvant Détachant
Tétrachloréthylène (ou Perchloréthylène)	CCl <sub>2</sub> =CCl <sub>2</sub>	121,2 °C	Solvant

#### II.4.2. Toxicité des solvants chlorés

La voie de pénétration dans l'organisme est principalement la voie respiratoire, à un moindre degré la voie cutanée et accidentellement la voie digestive. Ils sont alors soit éliminés sous forme inchangée par voie respiratoire, soit fixés dans les tissus ou métabolisés par le foie puis éliminés dans les selles, les urines ou l'air expiré. Les solvants ont une affinité pour les organes riches en graisse.

##### ❖ Toxicité aiguë

La plupart des solvants chlorés sont nocifs et irritants. À forte dose, leur inhalation ou leur ingestion provoquent une dépression du système nerveux central avec des atteintes pulmonaires, rénales et hépatiques (Dananché et Févotte, 2009). Certains provoquent des troubles de l'excitabilité du cœur pouvant aller jusqu'à la défaillance cardiaque. Le contact avec la peau ou la muqueuse oculaire se manifeste par une action irritante et desséchante.

##### ❖ Toxicité chronique

Elle se manifeste par des atteintes du système nerveux dont les symptômes sont des céphalées, des troubles de la mémoire et des asthénies. Ces effets peuvent durer longtemps et

la récupération des facultés, quand elle est possible, est lente. D'autres organes peuvent être également atteints tels que : la peau, le système nerveux, le cœur, le foie et le rein (**Viala et Botta, 2005**). Cependant, ces effets sur la santé sont à différencier en fonction du type de solvant. Certains ont notamment été classés comme pouvant être cancérigènes (**Dananché et Févotte, 2009**).

## **II.5. Tétrachlorure de carbone**

### **II.5.1. Définition**

Le tétrachlorure de carbone est un alcane polyhalogéné de formule brut:  $\text{CCl}_4$ . A pression et température ambiante, c'est un liquide incolore, très volatil dont les vapeurs sont nocives pour les êtres vivants et dangereux pour la couche d'ozone, pouvant entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. Il est souvent employé en tant que solvant dans les laboratoires et dans les industries chimiques. Sa vente est désormais interdite en raison de sa toxicité. Sa métabolisation en radicaux libres réactifs conduit à des nécroses hépatocellulaires suite à des réactions de peroxydation lipidique des membranes cellulaires, des réactions d'inhibition enzymatique et des réactions de liaisons covalentes avec les macromolécules cellulaires (**Ineris, 2005**).

### **II.5.2. Propriétés physico-chimiques**

Le tétrachlorure de carbone est un solvant apolaire, dissout facilement les hydrocarbures (**Bagard et Simon, 2008**), très peu soluble dans l'eau. C'est un solvant volatil dont les vapeurs sont 5 fois plus lourdes que l'air. Il s'oxyde facilement en présence d'air et sous l'action de la chaleur et de l'humidité en donnant du dichlorure de carbonyle, chlorure d'hydrogène, chlore, tétrachloroéthylène, hexachloroéthane et du dioxyde de carbone.

### **II.5.3. Propriétés cinétiques principales**

Le tétrachlorure de carbone est absorbé principalement par inhalation et par voie orale. L'absorption cutanée est moins importante et moins rapide (**Gupta, 2011**). De nombreux travaux retiennent une absorption moyenne calculée de 40% à 65% pour une exposition au tétrachlorure de carbone par inhalation chez l'homme. Après inhalation il est rapidement distribué dans tout l'organisme en particulier dans les tissus adipeux, le foie et la moelle osseuse. Environ 50 % du tétrachlorure de carbone sont excrétés inchangés, l'autre partie étant

métabolisée. Une quantité minime de 4 à 8% est excrétée dans les urines et les fèces (**Ineris, 2005**).

#### **II.5.4. Mode d'action de tétrachlorure de carbone**

Le métabolisme de  $\text{CCl}_4$  a été étudié chez les animaux expérimentaux, son principal effet est l'hépatotoxicité. Sa pénétration dans le foie entraîne une biotransformation par les enzymes microsomiales, il se forme d'abord un radical trichlorométhyle  $\text{CCl}_3^\bullet$  et du chlore monoatomique (figure 12). Cette biotransformation fait intervenir le cytochrome P450, contenu en grande quantité dans le réticulum endoplasmique (**Mégarbane et al., 2007 ; Gupta, 2011**).

Les composés radicalaires très réactifs vont agir sur les structures membranaires avoisinantes, induisant la peroxydation des acides gras polyinsaturés et des phospholipides des membranes du réticulum endoplasmique.

Le radical trichlorométhyle peut conduire à la formation d'hexachloroéthane ou de trichlorométhane, celui-ci étant ensuite dégradé en acide formique puis en  $\text{CO}_2$ . Si la pression partielle en oxygène ( $\text{PO}_2$ ) dans les tissus est forte, le radical trichlorométhyle donne le trichlorométhyle-peroxyde qui est dégradé en oxychlorure de carbone (phosgène) et en acide chlorhydrique. Si la pression partielle en oxygène est réduite, ce qui a lieu au niveau hépatique dans les intoxications, il se formerait un radical carbène encore plus réactif, dont la fixation tissulaire serait à l'origine des destructions cellulaires observées (**Viala et Botta, 2005**).

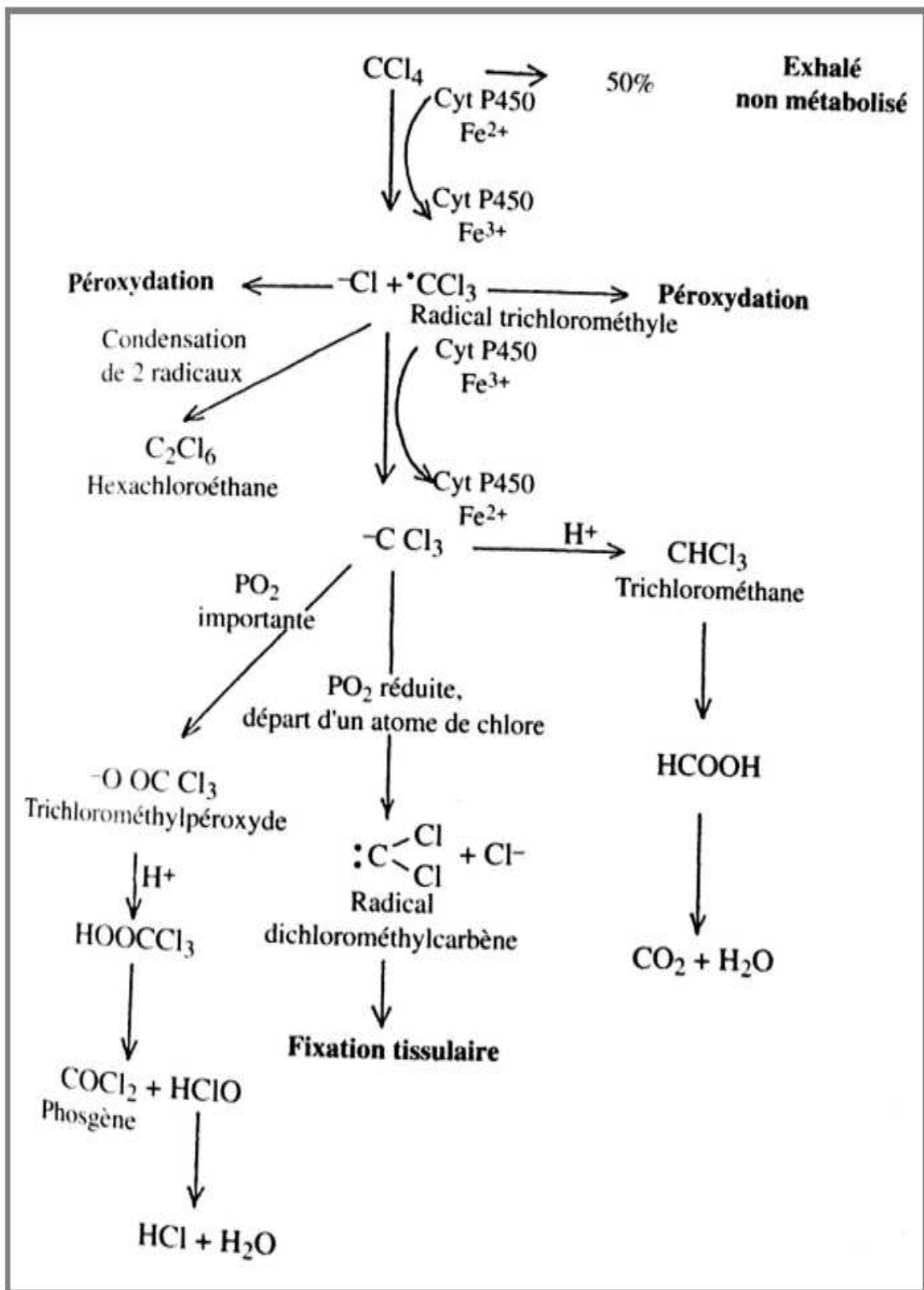


Figure 12. Métabolisme du tétrachlorure de carbone (Viala et Botta, 2005).

### II.5.5. Principales sources d'exposition

La présence de tétrachlorure de carbone dans l'environnement est essentiellement anthropique. Les rejets dans l'environnement se produisent lors de la production et des utilisations. Des quantités infimes peuvent également être formées dans l'atmosphère par décomposition photochimique de perchloroéthylène ou par sa dégradation thermique au cours de l'incinération de déchets. Du fait de sa tension de vapeur relativement élevée à température ambiante, le tétrachlorure de carbone présent dans l'environnement est principalement atmosphérique (**Zimmerman, 1999**). Le tableau 3 présente la distribution de tétrachlorure de carbone dans les différents milieux.

**Tableau 3.** Distribution de tétrachlorure de carbone dans les différents milieux (**Ineris, 2005**).

Milieux	Distribution (%)
Eau	< 1
Sols	2
Air	97

### II.5.6. Toxicité Chez l'homme

Du fait de ses propriétés lipophiles, le tétrachlorure de carbone s'accumule dans les tissus riches en graisses, comme le tissu adipeux, le foie et la moelle osseuse (**Jacqueline et James, 1980**).

#### ❖ Toxicité aiguë

Les cas d'intoxication au tétrachlorure de carbone résultent d'ingestion accidentelle ou volontaire ou le plus souvent d'exposition par inhalation aux vapeurs. Des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques peuvent survenir dès les premières 24 heures. Il s'agit de nausées, de vomissements et de diarrhées, accompagnés d'une atteinte neurologique centrale souvent discrète. Les principaux effets de l'exposition aiguë sont la dépression du système nerveux central, des troubles hépatiques et des lésions rénales (**ATSDR, 2004**). Les signes d'atteinte hépatique peuvent survenir un à quatre jours après l'exposition. La cytolysse hépatique évolue

rarement vers l'insuffisance hépatique. L'atteinte rénale est prédominante sous forme d'une tubulopathie aiguë, souvent de type anurique réversible en 3 à 15 jours. Des décès sont rapportés lors d'une exposition par ingestion pour des doses aussi faibles que 1,5 ml chez l'adulte et 0,18-0,92 ml chez l'enfant (**Ineris, 2005**).

#### ❖ Toxicité chronique

Quelques cas de cirrhoses hépatiques et d'atteintes neurologiques centrales et périphériques ont été décrits. Comme tous les autres solvants chlorés, il est irritant au niveau cutané et ORL. Des études menées au sein des industries ont mis en évidence une légère augmentation de la mortalité chez des salariés potentiellement exposés au tétrachlorure de carbone. Sur le plan de la cancérogénicité, il est classé dans la catégorie 3 par l'union européenne et 2B par le CIRC (Centre International de Recherche Contre le Cancer) (**IARC, 1982**).

#### II.5.7. Utilisations

Le tétrachlorure de carbone est principalement utilisé pour produire des chlorofluorocarbones, employés comme réfrigérants, fluides propulseurs (aérosols), solvants et pour produire d'autres hydrocarbures chlorés. Il est employé dans la synthèse du nylon, également utilisé comme solvant pour l'asphalte, les bitumes, le caoutchouc chloré, les gommes, l'éthylcellulose et comme agent nettoyant pour les machines et les équipements électriques (**Gupta, 2011**).

#### II.5.8. Conduite à tenir en cas d'urgence

En cas de projection oculaire ou cutanée, un lavage abondant pendant au moins 15 minutes de la zone projetée est préconisé. En cas d'ingestion importante un lavage gastrique ou une aspiration après intubation trachéale est pratiquée si le patient est inconscient, sinon du charbon actif est administré. Par la suite un traitement symptomatique des troubles est réalisé en milieu spécialisé. En cas d'inhalation, il faut éloigner le sujet de la zone polluée avant d'envisager toute prise en charge (**UVMT, 2002**).

Depuis toujours l'homme a loué les services de la nature pour soulager ses maux ; celle-ci le lui a bien rendu à travers la médecine traditionnelle qui se définit selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant « l'ensemble de toutes les connaissances et pratiques explicables ou non pour diagnostiquer, prévenir ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation transmise de générations en générations, le plus souvent oralement ou par écrit » (**Paschal, 2006**).

### III.1. La phytothérapie

Les médecines « douces » connaissent un succès considérable dans de nombreuses régions du monde, en particulier la phytothérapie. De nos jours, malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections dans les différentes sociétés et cultures (**Eddouks et al., 2007**), y compris les pays occidentaux où les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins naturels moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Paul, 2001**).

En Afrique, les remèdes traditionnels à base de plantes constituent une alternative médicale importante pour près de 80% de la population africaine. Ceci est expliqué surtout par le faible coût de la pharmacopée traditionnelle qui rend ces phytomédicaments facilement accessibles et disponibles (**Paschal, 2006**).

Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique à cause de leur richesse en métabolites secondaires : tanins, glucoside, mucilage, flavonoïdes, saponines ; qui procurent des propriétés curatives appréciables. Selon les estimations de l'OMS, sur 252 médicaments considérés comme essentiels, plus de 11% sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales (**Eddouks et al., 2007**).

L'emploi des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé, néanmoins certaines d'entre elles provoquent des effets secondaires d'où la nécessité de valider l'usage traditionnel qui en est fait (**Jaouhari et al., 1999**).

Beaucoup d'utilisateurs prennent goût à reconnaître, à cultiver ainsi qu'à récolter les plantes qui les guérissent plutôt que de les utiliser toutes prêtes dans le commerce de détail. Certaines précautions sont alors nécessaires pour la réussite de l'opération (**Debuigue, 1984**).

### III.2. Récolte et conservation des plantes médicinales

La qualité des drogues végétales dépend en grande partie des soins apportés à leur récolte et de la manière dont elles seront conservées (**Marie, 2001**).

#### III.2.1. Récolte

La récolte des plantes médicinales en pleine nature nécessite une bonne connaissance des espèces végétales, de la localité où elles croissent et de leur cycle biologique qui déterminera le moment le plus propice à ce ramassage.

Il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec, et chaud. Le matin est le moment le plus favorable (surtout pour les plantes aromatiques riches en huiles essentielles) (**Anne et Nogaret, 2003**), mais on peut toutefois cueillir aussi le soir, avant la fraîcheur. La cueillette des plantes sauvages doit se faire dans la mesure du possible, dans un lieu peu fréquenté en choisissant uniquement les plantes saines et éliminer les plantes flétries, tachées, décolorées, attaquées par les insectes ou poussant à proximité des champignons (**Debuigue, 1984**). D'une manière générale les feuilles sont récoltées avant et pendant la floraison avec précaution une à une, sans arracher ni déchirer, les fleurs sont souvent cueillies au début de la floraison, les fruits sont récoltés au moment de la maturité, la racine en (automne ou printemps). Les graines doivent être cueillies mures, habituellement en fin de saison (**Marie, 2001**).

#### III.2.2. Séchage

Le séchage est une opération qui consiste à retirer progressivement l'humidité du végétal afin d'éviter un certain nombre de réactions pouvant entraîner l'altération des drogues (**Hugues, 2001 ; Marie, 2001**). Il doit être rapide, les plantes récoltées seront séchées à l'ombre, dans des endroits bien aéré (**Hugues, 2001**).

D'autres techniques de séchage sont utilisées tels que : (**Marie, 2001**)

- Le séchage sous abris dans des hangars, des greniers, des séchoirs.
- Le séchage par l'air chaud.

#### III.2.3. Conservation

Une fois le séchage est terminé, les plantes sont coupées grossièrement et disposées dans des bocaux de verre ou des sacs en papier (**Hugues, 2001**) à l'abri de certains agents pouvant entraîner leur altération, et protégées contre l'air, l'humidité, la lumière, les champignons

(moisissures) et les insectes (Marie, 2001). La durée de conservation est limitée et adaptée à chaque cas. Généralement les plantes séchées peuvent être conservées dans de bonnes conditions pendant une année. Au-delà de cette période, leur pouvoir diminue sensiblement et l'action thérapeutique disparaît. C'est pourquoi il faudra renouveler le stock de plantes chaque année (Hugues, 2001).

### III.3. Formes d'utilisation des plantes médicinales

Les plantes médicinales faisaient l'objet d'une variété de préparation, dont les trois élémentaires sont l'infusion, la décoction et la macération (Paul, 2001 ; Debuigue, 1984).

#### III.3.1. Infusion

Elle convient aux drogues fragiles (feuilles, fleurs,...) et riches en huiles essentielles. Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur les plantes ou encore (à mettre les plantes dans des récipients contenant l'eau bouillante), on couvre le récipient et on laisse infuser le temps nécessaire (Goetz, 2004).

#### III.3.2. Décoction

Elle est adaptée pour les drogues de consistance dure ou très dure (bois, racines ou écorces), notamment celles renfermant des tanins (Anne et Nogaret, 2003). Elle consiste à maintenir la drogue avec l'eau potable à ébullition pendant un temps plus ou moins long selon les espèces, en général de 10 à 30 min. pour extraire le plus possible de principes actifs, il faut couper soigneusement les plantes en petits morceaux.

#### III.3.3. Macération

Cette préparation consiste à maintenir en contact la drogue avec de l'eau potable à température ambiante pendant une durée de 30 min à 4h, ce mode de préparation convient bien aux drogues mucilagineuses. Elle est rarement employée à cause de l'inconvénient de fermentation. De toute manière elle ne doit pas excéder une dizaine d'heures (Schauenberg, 1977).

### III.4. Substances actives des plantes médicinales

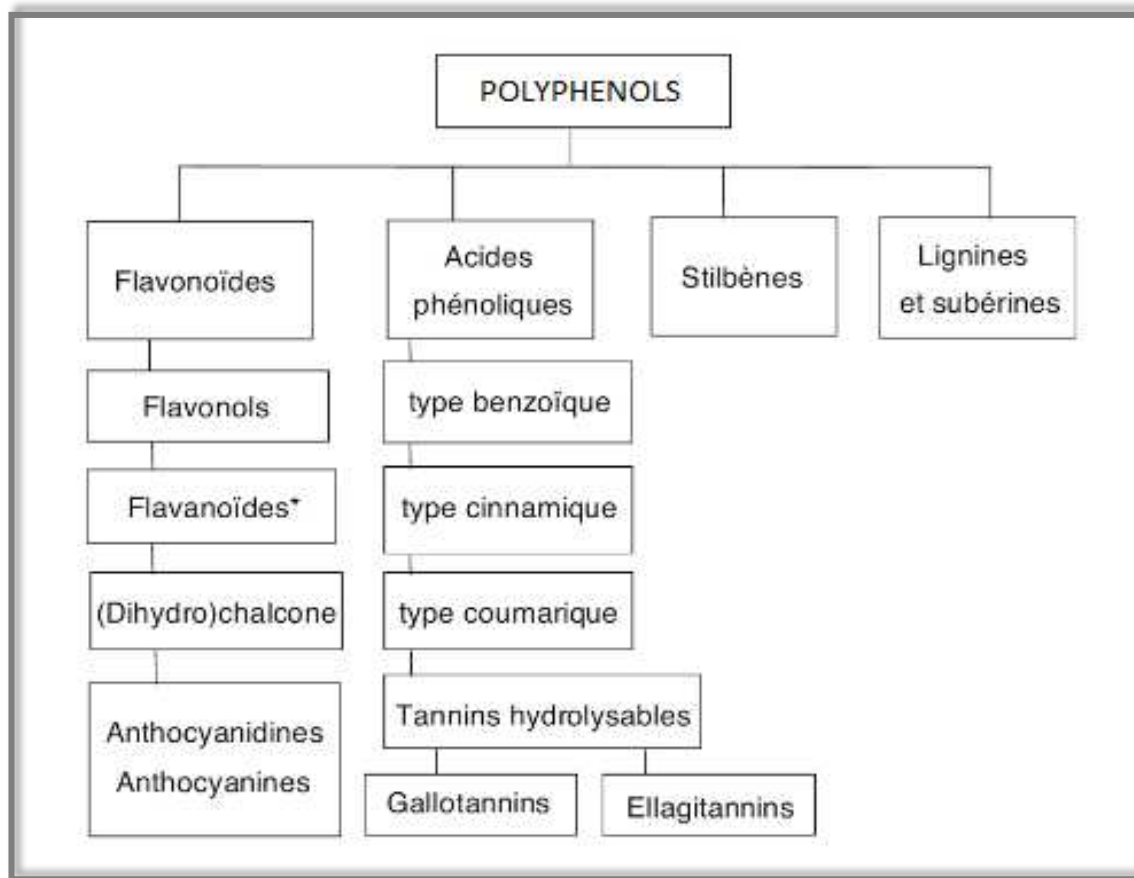
Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types :

♦ **Métabolites primaires** : Ce sont des substances indispensables à la vie de la plante (protéines, protides, acides nucléiques et lipides).

♦ **Métabolites secondaires** : Appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques ...) qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelques fois atteindre des valeurs élevées. Les métabolites secondaires représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Richter, 1993 ; Macheix et al., 2005**). Parmi lesquels on distingue notamment :

#### ❖ Les composés phénoliques

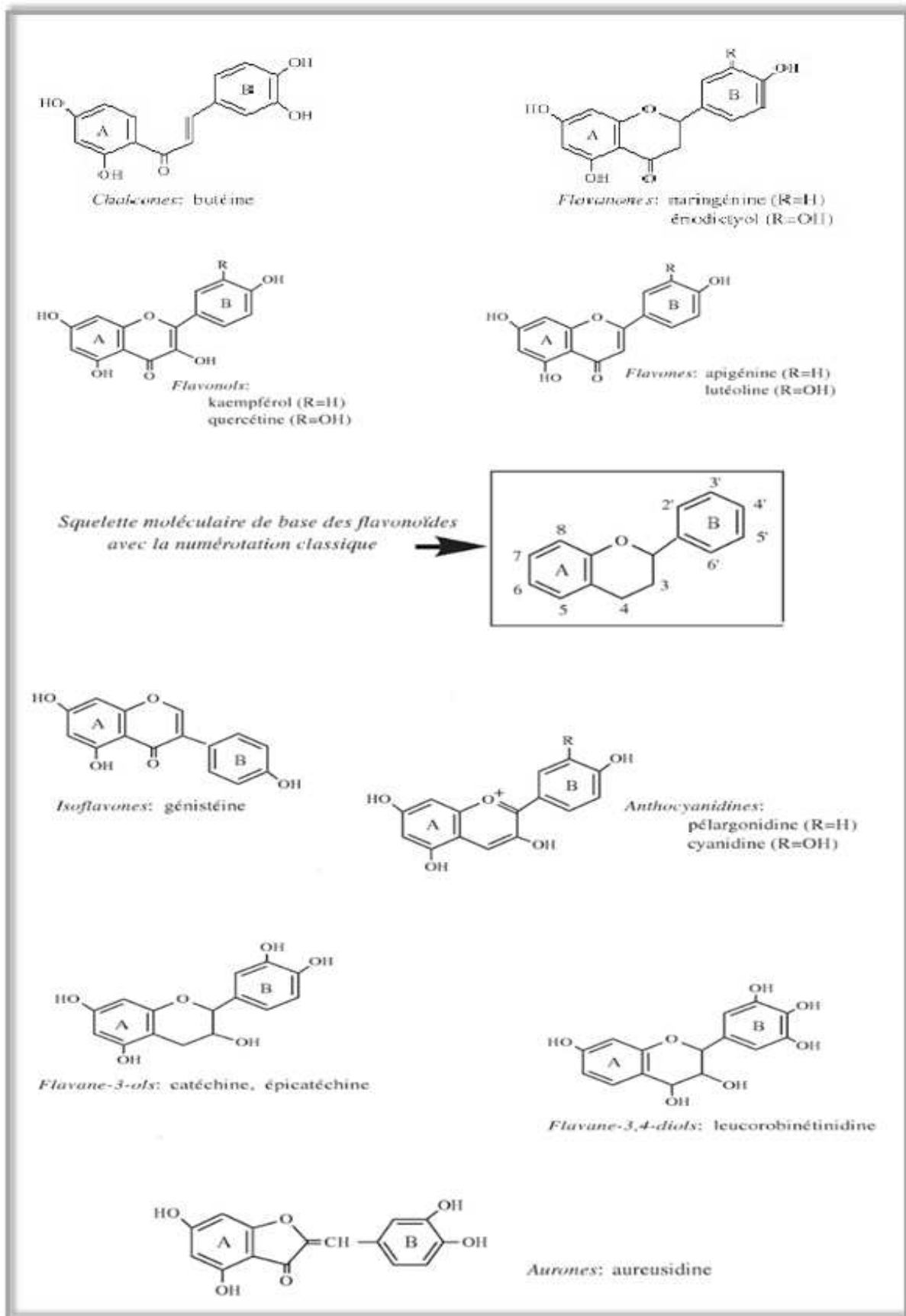
Les composés phénoliques ou polyphénols des végétaux correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside). Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Collin et Crouzet, 2011**) allant de simples molécules comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 dalton, comme les tanins (figure 13) (**Jarrige et al., 1995**). D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate, ce qui permet de différencier deux classes de composés phénoliques. Par ailleurs, la voie des polyacétates intervient chez les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates (**Krief, 2003**). Chez l'homme, ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de diverses pathologies (**Macheix et al., 2005 ; Chèze et al., 2013**).



**Figure 13.** Différentes familles de polyphénols \* Polymères de flavonoïdes = proanthocyanidines, anthocyanogènes ou procyanidols (Collin et Crouzet, 2011).

#### ❖ Flavonoïdes

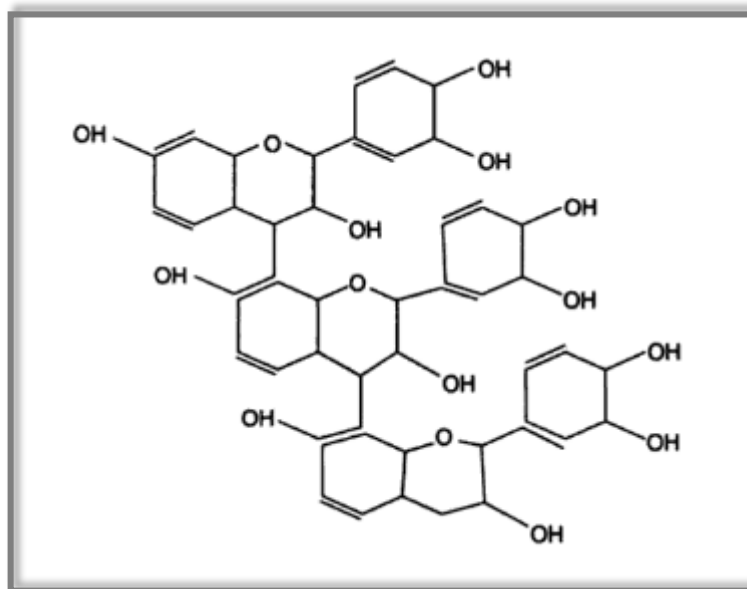
Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés phénoliques répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones et les isoflavones (figure 14). Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. On les trouve dans les plantes très colorées comme les légumes vert foncé et les fruits rouges. Chez l'homme, les propriétés des flavonoïdes sont de mieux en mieux connues. On leur reconnaît désormais des fonctions antioxydantes certaines, mais également anti-virales, anti-inflammatoires, antiulcéreuses vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, et anti-cancéreuses (Causse, 2004 ; Ghedira, 2005).



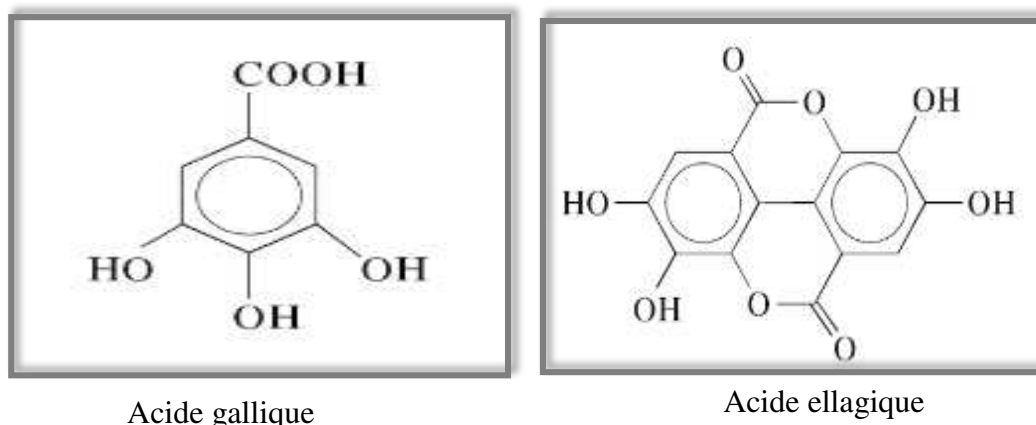
**Figure 14.** Principales classes de flavonoïdes (Macheix *et al.*, 2005).

### ❖ Tanins

Les tanins constituent un sous-ensemble des substances polyphénoliques végétales présentes dans les feuilles, les fleurs, les fruits, les écorces, les racines et les graines de certains végétaux (Mann, 1962 ; Woodward et Reed, 1989). On en distingue deux groupes selon leur structure et la voie de leur synthèse : les tanins condensés (figure 15) et les tanins hydrolysables. Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par de liaisons fortes carbone-carbone. Ces liaisons ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines. La structure de base des tanins hydrolysables est constituée d'un glucide, habituellement le glucose, dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique (figure 16). Les résidus de ce dernier se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé (Jarrige *et al.*, 1995 ; Hopkins, 2003). Les tanins présentent des propriétés astringentes, antidiarrhétic, antibactériennes et antifongiques. Certains présentent également des propriétés vitaminiques. Les tanins hydrolysables sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde (Gazengel et Orecchioni, 2013). Ils permettent aussi de stopper les hémorragies et de réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Kpètèhoto *et al.*, 2017).



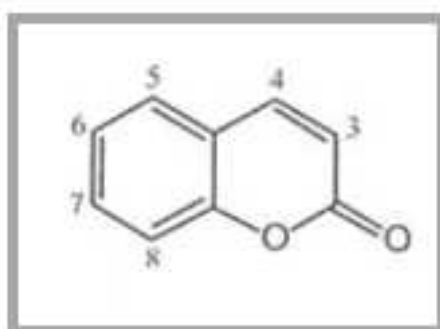
**Figure 15.** Structure chimiques des tanins condensés (Guillaume, 1999).



**Figure 16.** Structure chimique des éléments des tanins hydrolysables (Gazengel et Orecchioni, 2013).

#### ❖ Coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka « *Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae » d'où fut isolée, en 1820, la coumarine. Plus d'un millier de ces composés ont été décrits et les plus simples d'entre eux sont largement distribués dans tout le règne végétal (figure 17). Certaines familles d'Angiospermes élaborent des structures très variées : Fabaceae, Asteraceae et, surtout, Apiaceae et Rutaceae chez les quelles sont rencontrées les molécules les plus complexes. Les coumarines sont connues par leurs propriétés anti-œdémateuses, immunostimulantes, antioxydantes (Bruneton, 2009), anti-tumorales (Germosén-Robineau, 1999) et anti-coagulantes (Collin et Crouzet, 2011).



**Figure 17.** Structure de base de Coumarine (Bruneton, 2009).

#### ❖ Saponines

Les saponines ou saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Elles sont caractérisées par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (**Jarrige, 1995 ; Bruneton, 2009**). Structuralement, elles peuvent être classées en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être stéroïdique ou triterpénique. Les saponosides et les drogues qui en renferment, sont utilisées en thérapeutique pour leur propriétés anti-inflammatoires, cicatrisantes, expectorante, antispasmodiques, anti-œdémateuses, diurétiques et en tant que protecteurs veineux et capillaires. Toutes ces activités biologiques dérivent de deux propriétés majeures des saponosides, leur caractère amphiphile et leur interaction avec les stérols membranaires des cellules (**Paul, 2001 ; Gazengel et Orecchioni, 2013**).

#### ❖ Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène de composés azotés qui possèdent des propriétés pharmacologiques importantes. La plupart d'entre eux sont plus ou moins toxiques et semblent intervenir essentiellement dans des réactions de défense contre les infections microbiennes ou l'attaque d'herbivores (**Hopkins, 2003**). D'autres propriétés pharmacologiques concernent des domaines variées comme le système nerveux (atrophine) et la cancérologie (**Iserin, 2001**).

#### ❖ Huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie. Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Elles ont de multiples propriétés, antiseptiques pour les poumons (eucalyptus), dépuratives ou cicatrisantes (lavande), antibactériennes (romarin), spasmolytiques et sédatives (menthe et verveine) (**Iserin, 2001 ; Bruneton, 2009**).

### III.5. Présentation de *Juniperus phoenicea*

D'origine américaine, asiatique, africaine et européenne, le genre *Juniperus* (Cupressacées) comprend environ une soixantaine d'espèces d'arbustes, réparties dans les zones tempérées et froides de l'hémisphère nord (Mhirit et Blérot, 1999 ; Paul, 1999 ; Louppe *et al.*, 2004). En Afrique du Nord, les genévriers occupent une place importante dans le maintien de paysage, essentiellement en raison de leur rusticité et de leur dynamisme ; ce sont en effet des espèces pionnières peu exigeantes du point de vue écologique et présentes depuis le bord de mer jusque sur les sommets des Atlas. Leur rusticité leur permet de résister tant bien que mal aux agressions humaines intenses dont ils sont l'objet car dans de nombreuses régions, ils représentent le seul élément arboré ou arbustif susceptible d'être exploité pour le bois ou le feuillage, voire à des fins industrielles ou médicinales. Six espèces, de répartition fort inégale, se rencontrent en Afrique du Nord où l'on peut aisément distinguer ; les espèces à feuilles écailleuses réduites, appliquées sur les rameaux et les espèces à feuilles étalées-piquantes (Quezel et Gast, 2017).

*Juniperus phoenicea* (morven, genévrier de phénicie) représente l'espèce la plus répandue en Afrique du Nord où elle est présente depuis les dunes littorales jusqu'aux limites sahariennes. Généralement, les peuplements de genévriers de phénicie sont constitués par des arbustes de 1 à 3 m de hauteur mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 8 à 10 mètres (figure 18), notamment sur les Hauts Plateaux. Du point de vue écologique, ce genévrier typiquement méditerranéen caractérise essentiellement les substrats rocaillieux arides et fait défaut sur les sols profonds (Botineau, 2015 ; Quezel et Gast, 2017).

En Algérie, le genévrier de phénicie est souvent connu sous le nom vernaculaire « arar » (Tahar et Dahmane, 2008 ; Quezel et Gast, 2017), en poussant sur les steppes, il constitue parfois la seule végétation arborescente et ce, jusqu'à 3000 m d'altitude (Jacques, 2000).



**Figure 18.** Arbrisseau de *Juniperus phoenicea* dans la région d'El Aouinet.

### III.5.1. Classification botanique de *Juniperus phoenicea*

**Règne** : Plantae

**Division** : Pinophyta

**Classe** : Pinopsida

**Ordre** : Pinales

**Famille** : Cupressaceae

**Genre** : *Juniperus*

**Espèce** : *Juniperus phoenicea*

### III. 5.2. Distribution géographique

Le genévrier de phénicie est une espèce circumméditerranéenne croit dans le sud de l'Europe, l'Asie occidentale et en Afrique du nord (dans la région méditerranéenne) (**Jacques, 2000**). Il est caractérisé par sa grande résistance au vent, poussant surtout sur les sables maritimes, comme sur les sommets et les crêtes les plus exposées au vent, les ravins, les zones steppiques et prédésertiques (**Alexandre, 1985**).

### III.5.3. Caractères généraux

#### ◆ Feuillage

❖ **Juveniles** : Aciculaires, groupées par 3 en verticilles à base enserrant la pousse, avec deux bandes claires de stomates sur les deux faces.

❖ **Adultes** : Squamiformes, étroitement imbriquées, opposées par 3 sur 6 rangs, ovales – rhomboïdales de 1mm long, obtuses au sommet, arrondies à la base glanduleuses, bombées et sillonnées sur le dos, vert foncé ou bleuâtre (figure 19) (Jacques, 2000). Elles sont constituées des huiles aromatiques, résines, glucosides, acides organiques (Kabaissi, 2002).

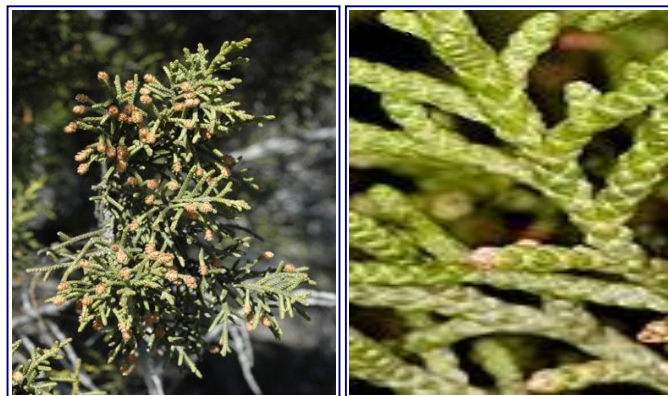


Figure 19. Feuilles de *Juniperus phoenicea*.

#### ◆ Fleurs

La floraison a lieu à la fin de l'hiver au printemps (février- mars) (Arista *et al.*, 1997). Les fleurs males sont petites, situées à l'extrémité des rameaux (figure 20). Les fleurs femelles sont également petites, globuleuses avec des écailles opposées, soudées à la base (Alexandre, 1985).



**Figure 20.** Fleures de *Juniperus phoenicea*.

#### ◆ Fruits

Gros, globuleux ou subglobuleux, à chaire fibreuse très ferme, contient de quatre à neuf graines, ovales, aux extrémités aiguës avec une enveloppe dure qui retarde la germination. Le fruit murs à l'automne de la deuxième année, d'une couleur jaunâtre ou rouge brunâtre, luisante à maturité (Joel, 2002), d'environ 6-10 mm de diamètre (Botineau, 2015) (figure 21), constitué de flavonoïdes et des terpènes (Abou-Ala *et al.*, 2005 ; Tahar et Dahmane, 2008).



**Figure 21.** Fruits de *Juniperus phoenicea*.

### III. 5. 4. Utilisations

Le genévrier de phénicie devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive (son bois est très recherché comme comestible et fournit un charbon très apprécié). En médecine traditionnelle, plusieurs parties de cette espèce sont utilisées. Les composés chimiques des rameaux, feuilles et fruits sont incorporés dans des préparations pharmaceutiques d'usage particulièrement antiseptique attribué à la présence d'huiles essentielles (**Mansouri *et al.*, 2011**). Les cônes, les rameaux, mais surtout les jeunes pousses préparées en infusion ont des effets diurétiques, stomachiques et digestifs (**Bellakhder, 1997**). Les feuilles de cette espèce sont employées contre les affections brochopulmonaires (**Alejandro *et al.*, 2004**), sous forme de décoction pour soigner le diabète, l'ulcère, le rhumatisme et les troubles digestifs tels que la diarrhée. Les fruits (baies, cônes) séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (**Mansouri *et al.*, 2011**). Le décocté des fruits est employé en cas de vomissement, très utilisé par les patients algériens, tunisiens et marocains souffrants de diabète (**Le Floch, 1983 ; Cheriti *et al.*, 1995 ; Mohamed *et al.*, 2002**).

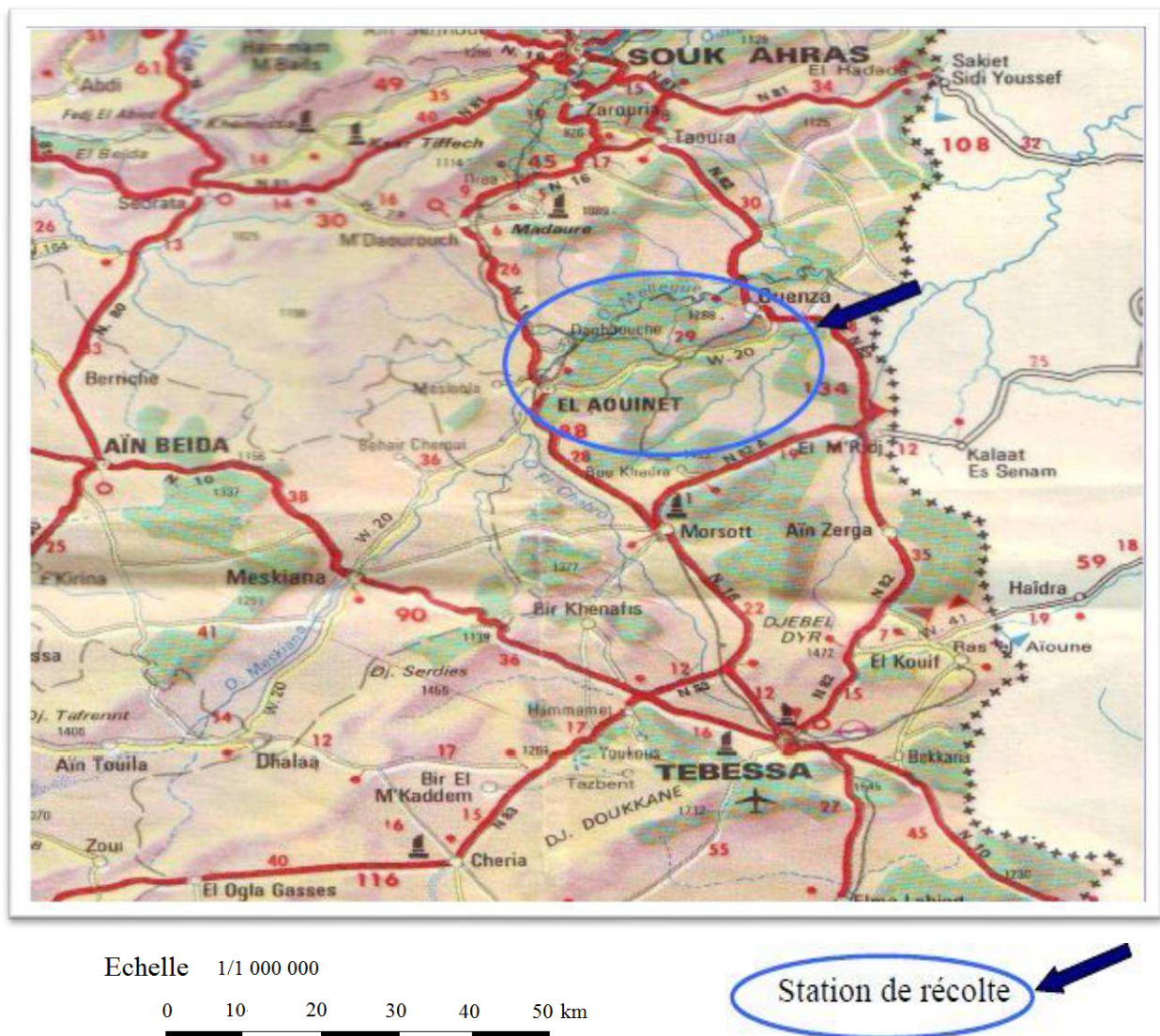
**Partie pratique**

# Matériels et méthodes

## I. Etude phytochimique

### I.1. Matériel végétal

Les baies matures de *Juniperus phoenicea* ont été récoltées au mois de Mars 2013 dans la région d'El Aouinet (wilaya de Tébessa) (figure 22). Après leur identification par Mr. CHEFROUR. A, Professeur à l'université de Souk Ahras, les échantillons de baies ont été lavés et laissés sécher à l'ombre, broyés en poudre et conservés dans un récipient hermétique.



**Figure 22.** Carte géographique de la région d'El Aouinet montrant la station de Récolte.

## I.2. Extractions des composés phénoliques

### I.2.1. Préparation de l'extrait brut

Une quantité de 20 g du matériel végétal broyé est macérée dans un mélange de méthanol /eau (85 %, v/v) avec renouvellement du solvant chaque 24h. Après filtration, la solution méthanolique est évaporée sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI R-210 à 60°C. Le résidu sec a été pesé et repris dans 3ml de méthanol puis conservé au réfrigérateur à 4 °C (figure 23).

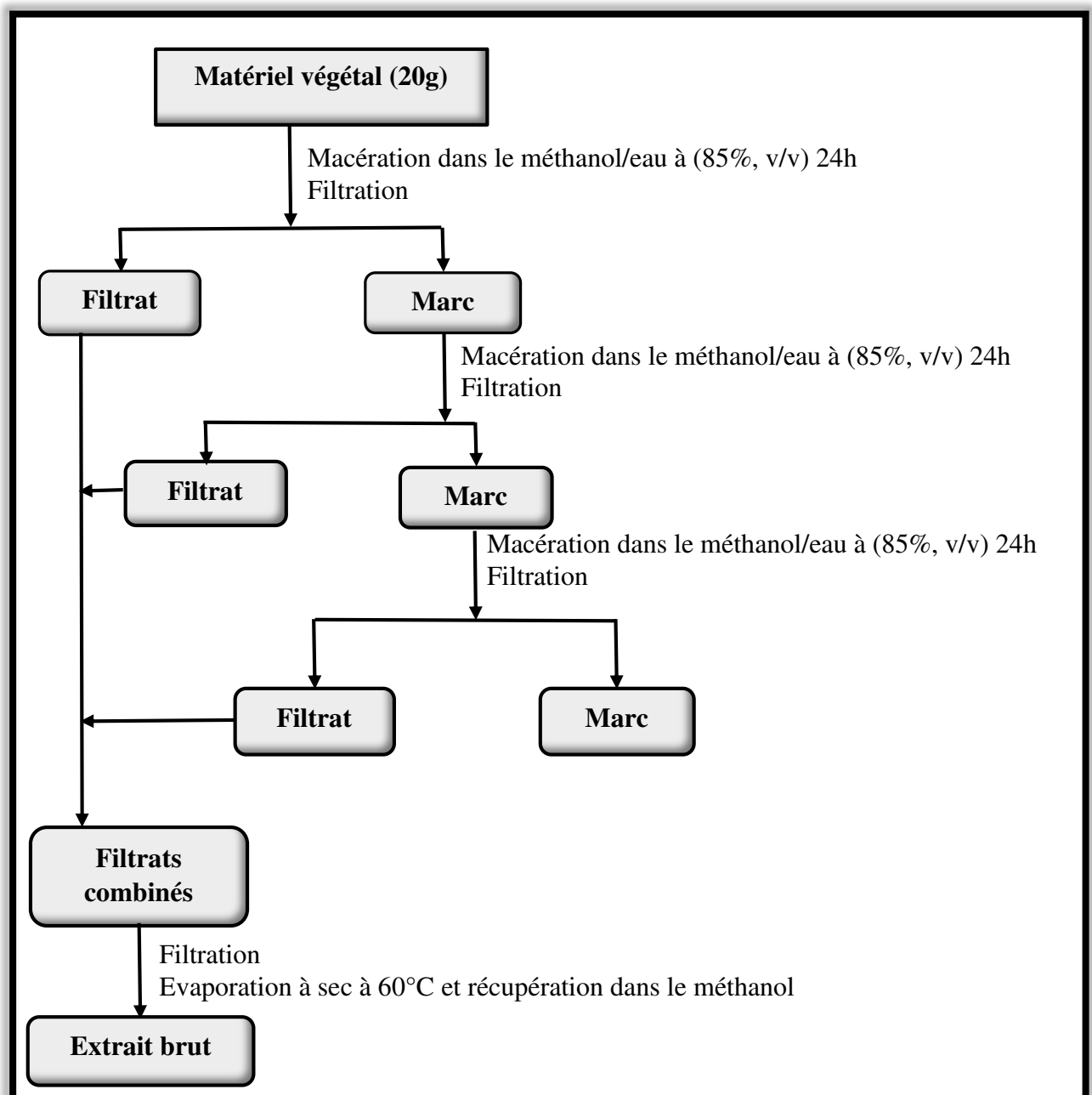


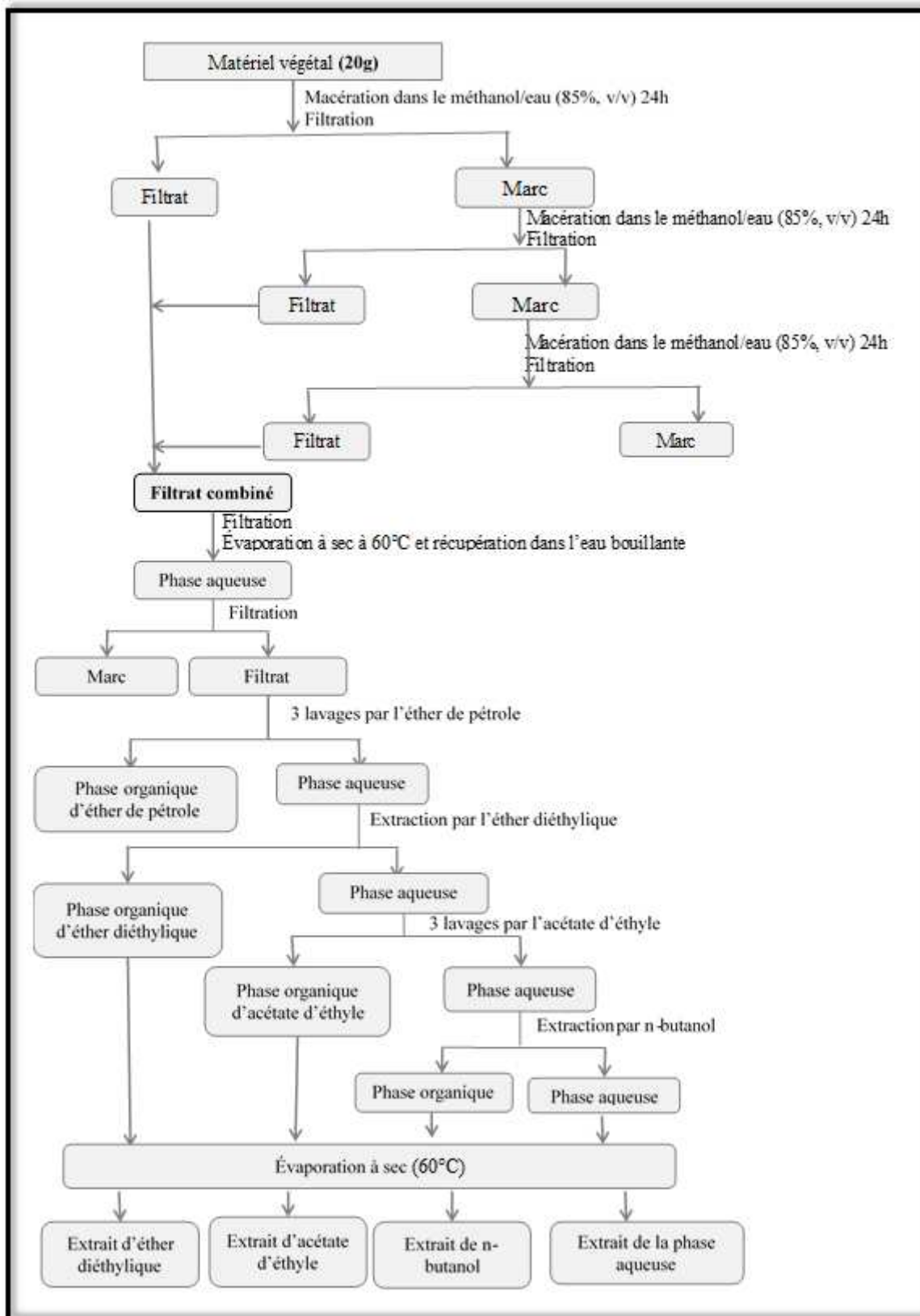
Figure 23. Protocole de préparation de l'extrait brut.

### I.2.2. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est effectuée à partir du matériel végétal finement broyé dans un mélange de méthanol / eau (85%, v/v) avec renouvellement du solvant chaque 24h. Le macérât est filtré sur Büchner sous pression réduite puis soumis à une évaporation sous pression réduite à 60°C (Rot à Vapeur, BÜCHI R-210). Le résidu sec est repris dans l'eau distillée bouillante et la phase aqueuse ainsi obtenue est conservée puis filtrée. Le filtrat subit un affrontement dans des ampoules à décanter pour débarrasser des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (v/v), on obtient deux phases : phase aqueuse et phase organique. La phase aqueuse est mélangée avec l'éther diéthylique (v/v) pour obtenir une phase aqueuse et une phase organique. Cette dernière contenant les flavonoïdes aglycones qui va être conservée pour évaporation. La phase aqueuse restante subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides. La phase aqueuse restante est mélangée avec le n-butanol pour récupérer notamment les flavonoïdes di et triglycosides dans la phase organique. La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés les plus polaires (figure 24). Les quatre fractions récoltées sont soumises à une évaporation sous pression réduite pour obtenir des résidus secs, conservés au réfrigérateur à 4 °C (**Markham, 1982**).

### I.2.3. Extraction des tanins

30 g de matériel végétal a été dégraissée en les laissant macérer dans 100 ml d'éther de pétrole pendant 24 h. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés. Le marc récupéré est repris par 50 ml d'éther diéthylique ensuite il sera filtré pour éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique. Le marc est repris une deuxième fois par 100 ml de méthanol puis filtré. Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous pression réduite pour obtenir un résidu sec, ce dernier est récupéré par l'addition de méthanol (figure 25). C'est un extrait pur de tanins pesé et conservé au réfrigérateur à 4 °C (**Feknous et al., 2014**).



**Figure 24.** Protocole d'extraction des flavonoïdes.

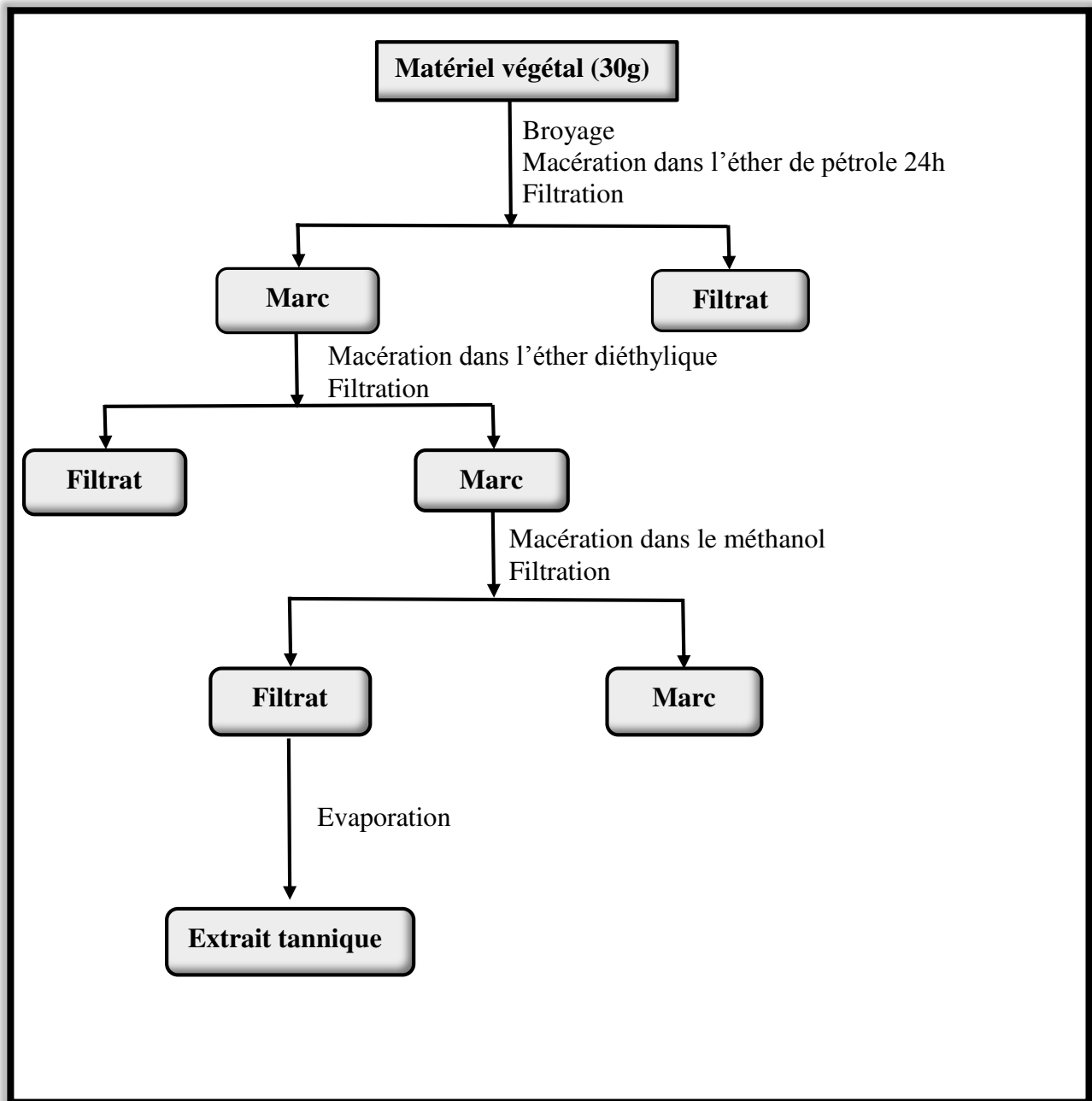


Figure 25. Protocole d'extraction des tanins.

#### I.2.4. Préparation de l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea*

L'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* (EAJP) a été préparé par décoction. 5 g de la poudre sèche des baies ont été mis avec 50 ml de l'eau distillée, on fait bouillir pendant 15 minutes, on laisse refroidir et on filtre.

#### I.2.5. Détermination du rendement d'extraction

La détermination du rendement d'extraction a été effectuée en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rendement (\%)} = (P1 - P2 / P3) \times 100$$

**P1** : Poids du ballon après évaporation.

**P2** : Poids du ballon avant évaporation.

**P3** : Poids de la matière végétale de départ.

### I.3. Dosage des composés phénoliques

#### I.3.1. Dosage des polyphénols

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu en suivant la méthode de **Waterman et Mole (1994)**. 10 µl des extraits sont ajoutés à 50 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après 5 min, 150 µl d'une solution de carbonate du sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) sont ajoutés. Après 1 min, on additionne au mélange un volume d'eau distillée jusqu'à 790 µl de volume final. Après 90 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 760 nm. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme du poids de la matière sèche (mg EAG/g de PS).

#### I.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium de **Zhishen et ses collaborateurs (1999)**. Un volume de 250 µl des extraits a été mélangé avec 1,25 ml d'eau distillée et par la suite avec 75 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5%. Après 6 min, 150 µl d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> à 10% a été ajouté. Après 5 min de repos, on additionne au mélange 0,5 ml de solution de NaOH (1M) et d'eau distillée jusqu'à 2,5 ml de volume final. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et sont exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme du poids de la matière sèche (mg EQ/g de PS).

#### I.3.3. Dosage des tannins condensés

La quantité des tannins condensés est estimée en utilisant la méthode de vanilline de **Julkunen-Tiitto (1985)**. Un volume de 50 µl des extraits est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 500 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tannins est

estimée en milligramme (mg) équivalent de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC/g de PS) à partir de la courbe d'étalonnage.

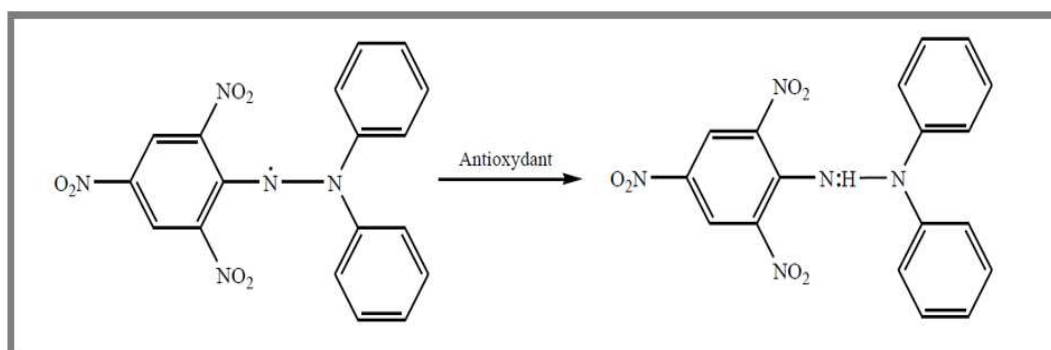
#### I.4. Evaluation de l'activité antiradicalaire

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre travail nous avons utilisé un test chimique de l'effet scavenger du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) en suivant la méthode de **Brand-Williams et ses collaborateurs (1995)**.

##### I.4.1. Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH• (**Popovici et al., 2009**). Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picrylhydrazine par un composé à propriété antiradicalaire (figure 26).

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.



**Figure 26.** Réduction du radical DPPH• (**Boubekri, 2014**).

### I.4.2. Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

## II. Etude biologique

### II.1. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux d'expérience sont des rats males de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevage, El kouba- Alger). L'élevage des animaux a été réalisé au sein de l'animalerie de biologie (université d'Annaba). A leur arrivée, ces rats sont placés dans des cages standard pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Pendant notre expérimentation les animaux ont un accès libre à la nourriture (croquettes provenant de ONAB, El harrouch, Algérie) et à l'eau, maintenus à température constante ( $22 \pm 2$ ) °C et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h avec une humidité relative minimale de 40%. La composition du régime standard qui a servi à l'alimentation des rats, durant toute la durée de l'expérimentation est résumée dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Composition de l'alimentation pour 1 Kg d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/Kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1,6
Calcaire	9	0,9
Cellulose	10	1,0
Minéraux	10	1,0
Vitamines	10	1,0

## II.2. Mode de traitement

Les 24 rats ont été répartis en quatre lots et les traitements ont été effectués comme suit :

**T** : Rats témoins sains.

**TC** : Rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> dissous dans l'huile d'olive et administré aux rats par voie intrapéritonéale à la dose de 1ml/kg de poids corporel (pc) (v/v dans huile d'olive).

**CJP** : Rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> dissous dans l'huile d'olive à la dose de 1ml/kg de pc et traités par l'extrait aqueux *Juniperus phoenicea* (EAJP) à la dose 250 mg/kg de pc.

**JP** : Rats sains traités par l'extrait aqueux de *Juniperus phoenicea* (EAJP) à la dose 250 mg/kg de pc.

## II.3. Sacrifice et prélèvements des organes

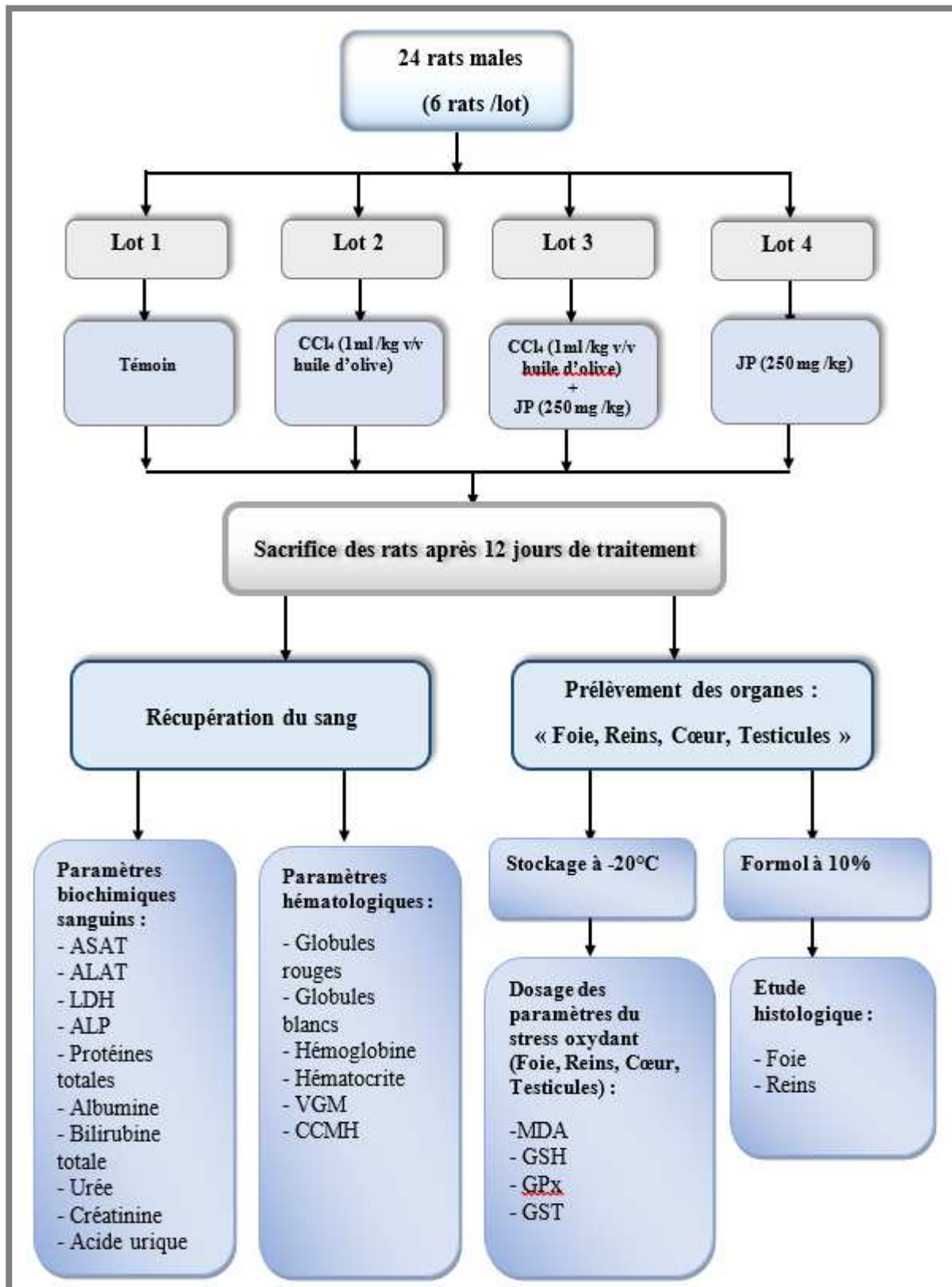
### II.3.1. Prélèvement sanguin

Les rats des 4 groupes ont été sacrifiés (par décapitation) après 12 jours de traitement. Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes étiquetés divisés en deux, l'un contient l'anticoagulant EDTA et l'autre étant hépariné. Ce dernier est centrifugé à 2200g pendant 15 min. Le plasma obtenu a été récupéré et conservé au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire

d'analyse (Laboratoire d'Analyse Médicale – Dr. KACI , Annaba) pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS).

### **II.3.2. Dissection et prélèvement des organes**

Après le sacrifice des animaux, le foie, les reins, les testicules et le cœur ont été rapidement prélevés et rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na cl) à 0,9 %, puis pesés. La moitié de ces organes a été conservée au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant, tandis que l'autre moitié du foie et des reins a été fixée dans le formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques. La figure 27 présente les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.



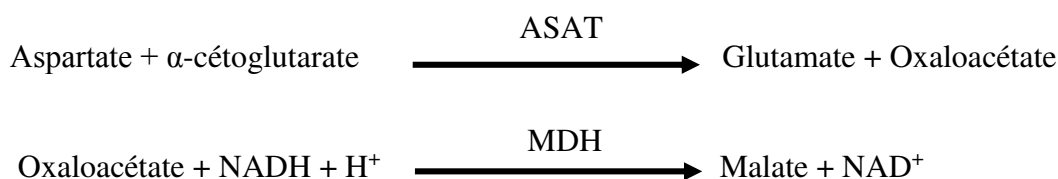
**Figure 27.** Schéma récapitulatif de l'expérimentation.

## II.4. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé par des kits fournis par Spinreact, Espagne.

### II.4.1. Aspartate aminotransférase (ASAT/ TGO)

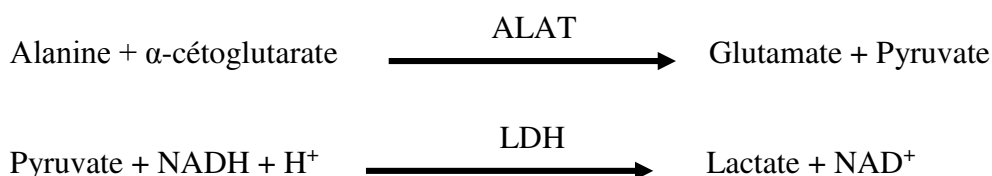
L'aspartate amino transférase (ASAT), appelée aussi l'Oxaloacétate de glutamate (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé de l'aspartate vers l' $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate en présence de malate déshydrogénase (MDH) et de NADH, H<sup>+</sup> selon les réactions suivantes :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'ASAT présente dans l'échantillon (Murray, 1984).

### II.4.2. Alanine aminotransférase (ALAT/ TGP)

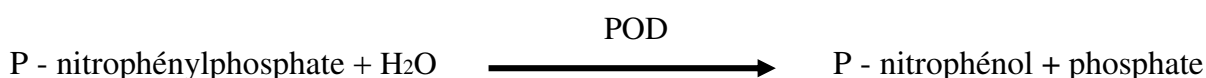
L'alanine aminotransférase (ALAT), appelée aussi Glutamate pyruvate transférase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir d'alanine au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et de NADH, H<sup>+</sup> selon les réactions suivantes :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présente dans l'échantillon (Murray, 1984).

### II.4.3. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10,4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante :



La formation de P-nitrophénol est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon (Wenger et al., 1984 ; Rosalki et al., 1993).

#### II.4.4. Lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante :



Le taux de la diminution de la concentration de NADH est proportionnel à la concentration catalytique de LDH présente dans l'échantillon (**Pesce, 1984**).

#### II.4.5. Protéines totales

En milieu alcalin, les ions de cuivre interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines en formant un complexe coloré (bleu-violet). L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (**Koller, 1984 ; Burtis et al., 1999**).

#### II.4.6. Albumine

En milieu acide, l'albumine réagit avec le vert de bromocrésol, pour former un complexe coloré. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 630 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'albumine dans l'échantillon (**Doumas, 1971 ; Gendler, 1984**).

#### II.4.7. Bilirubine totale

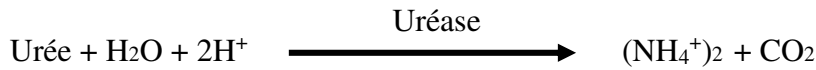
La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte et nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (**Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984**).

#### II.4.8. Créatinine

La créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate en milieu alcalin, en donnant un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (**Murray, 1984**).

### II.4.9. Urée

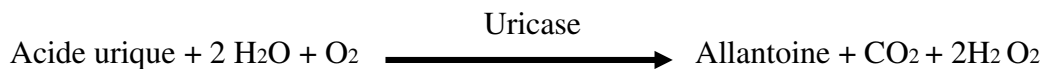
La technique utilisée pour la détermination du taux d'urée est basée sur les réactions suivantes :



La diminution de la concentration des NADH, est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon (**Kaplan, 1984**).

### II.4.10. Acide urique

L'acide urique présent dans l'échantillon donne selon les réactions ci-dessous un complexe coloré :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon (**Schultz, 1984 ; Fossati et al., 1980**).

### II.4.11. Glucose

Le glucose oxydase catalyse l'oxydation de glucose en acide gluconique. Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formé réagit grâce à l'action catalytique d'une peroxydase (POD), avec le phénol et le 4- aminophénazone pour former de la quinone selon les réactions suivantes :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon (**Trinder, 1969 ; Kaplan, 1984**).

## II.5. Dosage des paramètres du stress oxydant

### II.5.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de (foie, rein, cœur et testicule) de rats des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min). Les surnageants obtenus sont mis dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

### II.5.2. Dosage des protéines

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de **bradford (1976)** qui utilise le bleu de coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (NH<sub>2</sub>) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ◆ Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- ◆ Ajouter 5 ml du bleu de coomassie.
- ◆ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ◆ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme d'étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (Annexes 1, figure 4).

### II.5.3. Dosage du glutathion (GSH)

#### ◆ Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2 -nitro -5- marcapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5' -dithio-bis-2- nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion.

#### ◆ Protocole expérimental

Les échantillons (250 mg des organes étudiés de chaque animal) sont mis individuellement en présence de 10 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0,02 M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'ultrason pendant 35 secondes. On procède ensuite à la déprotéinisation de l'homogénat en prélevant 0,8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique à 0,25%. Ce mélange obtenu est mis 15 min au congélateur puis centrifugé pendant 5 min à 1000 tr/min. Le surnageant récolté est utilisé pour le dosage de GSH. Le dosage se fait comme suit : 1 ml de tampon tris, HCl à 0,4 M et 0,025 ml de DNTB (Acide 5-5 dithiobis- 2-nitrobenzoïque) à 0,01 M sont ajoutés à 0,5 ml du surnageant.

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH/mg protéine)} = \frac{\text{Do} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéine}}$$

**Do** : Densité optique.

**1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml acide salicylique).

**1,525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant + 1 ml Tris- EDTA + 0,025 ml DTNB).

**13100** : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

**0,8** : Volume de l'homogénat.

**0,5** : Volume de surnageant.

#### II.5.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de **Esterbauer et ses collaborateurs (1992)**. Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- ◆ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ◆ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 Mm, pH 7,4).
- ◆ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- ◆ Vortexer et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- ◆ Prélever 400 µl du surnageant.
- ◆ Ajouter 80 µl d' HCl à 0,6 M.
- ◆ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- ◆ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à 530 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

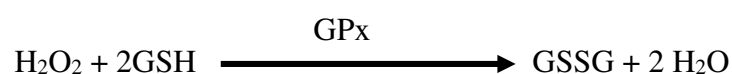
La concentration du MDA est calculée selon la formule suivante :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{D_o \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd}$$

- **C** : Concentration en nmole/mg de protéines
- **Do** : Densité optique à 530 nm
- **ε** : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- **L** : Longueur du trajet optique = 0,779 cm
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)
- **Fd** : Facteur de dilution : Fd = 0,2083

### II.5.5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ◆ Prélever 0,2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ◆ Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- ◆ Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 Mm, pH 7,4).
- ◆ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ◆ Ajouter 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ◆ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ◆ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ◆ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ◆ Prélever 0,48 ml du surnageant.
- ◆ Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- ◆ Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM).
- ◆ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{molGSH/mg protéine}) = \frac{(\text{Do échantillon} \times \text{Do étalon}) \times 0,04}{\text{Do étalon}} \times \frac{5}{\text{mg protéine}}$$

- **Do échantillon** : Densité optique de l'échantillon.
- **Do étalon** : Densité optique de l'étalon.
- **0,04** : Concentration de substrat (GSH).

### II.5.6. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm.

### • Protocole expérimental

La méthode utilisée pour le dosage des GST est celle de **Habig et ses collaborateurs (1974)**. Cette dernière consiste à faire agir les GST contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

#### ➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Essai (µl)
Tampon phosphate (0,1M) pH= 6	850	830
CDNB (0,02M)	50	50
GSH (0,1M)	100	100
Homogénat	-	20

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(\text{Do échant/min} - \text{Do blanc/min})}{9,6 \times \text{mg protéine}}$$

- **Do** : Densité optique de l'échantillon /min.
- **Do/min blanc** : Densité optique du blanc /min
- **9,6** : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

### II.6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique de Dr Niha.L (Annaba). La technique suivie est celle décrite par (**Hould, 1984**). Les organes pris de chaque rat sont retirés du formol à 10%, puis coupés à l'aide des couteaux tranchants, ensuite mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

- **Déshydratation**

La déshydratation se fait à l'aide d'un appareil automatique qui permet le passage des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90%, 100%).

- **Inclusion et réalisation des blocs**

Cette opération est achevée par la mise des tissus dans des bains de paraffine liquide. L'étape d'inclusion fait appel à des appareils « dits à inclusion » qui permettent l'obtention d'un bloc de paraffine solide coupé contenant le tissu imprégné. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) se fait à l'aide des appareils spéciaux appelés "Microtomes ". Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

- **Coloration**

La coloration des échantillons a été faite selon la technique de l'Hématoxyline- Eosine en suivant les étapes suivantes :

1. Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer dans l'eau distillée.
2. Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
3. Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
4. Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
5. Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
6. Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
7. Enfin, on passe à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique.

## **II.7. Exploration statistique**

Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne  $\pm$  erreur standard. Les valeurs d' IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe (% inhibition = f (concentration)).

Les calculs de l'étude biologique ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13, 31).

Les différences ont été considérées significatives à  $P \leq 0,05$ , hautement significatives lorsque à  $P \leq 0,01$ , très hautement significatives lorsque  $P \leq 0,001$ , avec P est le seuil de signification.

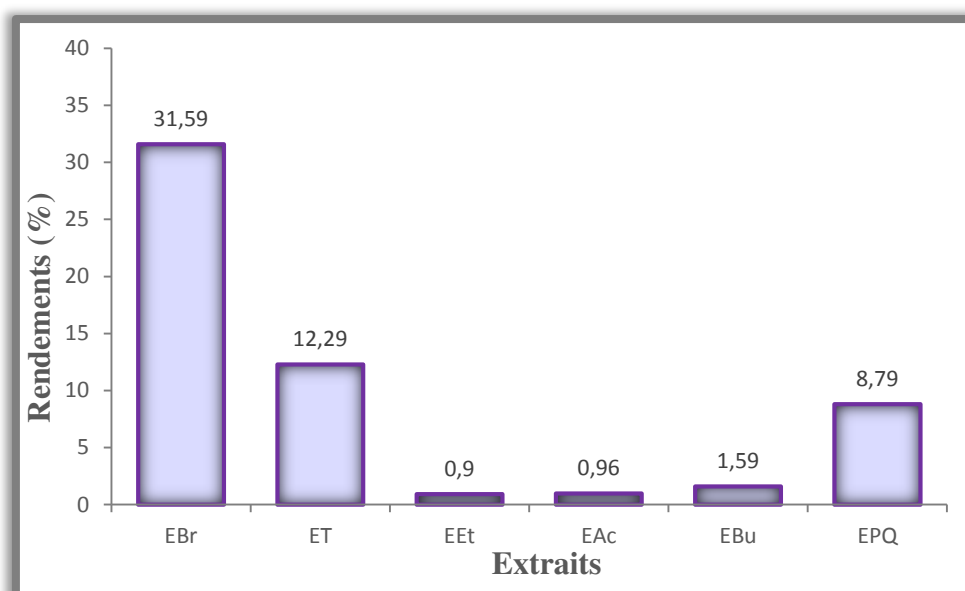
- Nous avons déterminé grâce aux statistiques élémentaires, les paramètres statistiques de base pondérale et biochimiques pour chaque lot expérimental.
- Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).
- A l'aide du test de Tukey, nous avons comparé les moyennes deux à deux : entre le lot T avec le lot TC, le lot TC avec le lot CJP, T avec le lot CJP et enfin le lot JP avec T et ceci pour chaque paramètre étudié.

## Résultats et interprétation

## I. Etude phytochimique

### I.1. Rendement des extraits

L'extraction des composés phénoliques des baies de *Juniperus phoenicea*, nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait par rapport au poids total des baies. Il ressort à travers l'observation de nos résultats que l'extrait brut (EBr) enregistre un fort rendement de l'ordre de 31,59 % suivi par l'extrait des tannins (ET) à raison de 12,29 %. L'extraction des flavonoïdes par la méthode d'affrontement par les solvants organiques montre que la phase aqueuse restante (EPQ) enregistre le rendement le plus élevé (8,79%) suivi de l'extrait butanolique (EBu = 1,59%) puis de l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc = 0,96%). Le rendement le plus faible (0,90 %) est obtenu par l'extrait d'éther diéthylique (EEt) (figure 28).



**Figure 28.** Représentation des rendements des différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea*.

### I.2. Teneurs des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins des différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea* a été effectué en moyen d'un dosage spectrophotométrique en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de vanilline respectivement. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique, de quercétine et de catéchine

par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage tracée (Annexes 1, figure 1, 2 et 3).

Nos résultats révèlent la richesse des différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea* en composés phénoliques. La teneur la plus élevée en polyphénols est constatée dans l'EBr, elle est de l'ordre de  $(49,43 \pm 0,88)$  suivi par l'EA qui est de l'ordre de  $(38,86 \pm 0,23)$  mg EAG/g PS. Les teneurs en polyphénols des différentes fractions obtenues à partir de l'EBr sont comprises entre  $25,91 \pm 0,78$  et  $36,22 \pm 0,96$  mg EAG/g PS.

Les flavonoïdes enregistrent des valeurs de l'ordre de  $2,88 \pm 0,10$  et  $2,9 \pm 0,37$  mg EQ/g PS dans les extraits EBr et EA respectivement. Pour les autres extraits, la teneur en flavonoïdes la plus élevée a été enregistrée dans l'EBu ( $11,76 \pm 0,90$ ). Les autres extraits enregistrent des valeurs comprises entre  $7,33 \pm 0,34$  et  $8,89 \pm 0,22$  mg EQ/g PS.

Les résultats de dosage des tanins révèlent que les extraits EBr et EA des baies de *Juniperus phoenicea* contiennent respectivement  $23,25 \pm 0,96$  et  $15,12 \pm 0,70$ . La teneur en tanins des autres extraits varie de  $8,40 \pm 0,81$  à  $18,84 \pm 4,41$  mg EC/g PS (tableau 5).

**Tableau 5.** Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits de *Juniperus phoenicea*.

Extraits	Polyphénols <sup>a</sup>	Flavonoïdes <sup>b</sup>	Tanins <sup>c</sup>
<b>EA</b>	$38,86 \pm 0,23$	$2,09 \pm 0,37$	$15,12 \pm 0,70$
<b>EBr</b>	$49,43 \pm 0,88$	$2,88 \pm 0,10$	$23,25 \pm 0,96$
<b>EEt</b>	$26,17 \pm 3,73$	$8,89 \pm 0,22$	$11,35 \pm 5,12$
<b>EAc</b>	$31,44 \pm 1,12$	$7,33 \pm 0,34$	$18,84 \pm 4,41$
<b>EBu</b>	$25,91 \pm 0,78$	$11,76 \pm 0,90$	$8,40 \pm 0,81$
<b>EPQ</b>	$36,22 \pm 0,96$	$8,43 \pm 0,11$	$9,62 \pm 4,60$

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  ES.

(<sup>a</sup>) mg d'équivalent d'acide gallique par g du poids de la matière sèche.

(<sup>b</sup>) mg d'équivalent de quercétine par g du poids de la matière sèche.

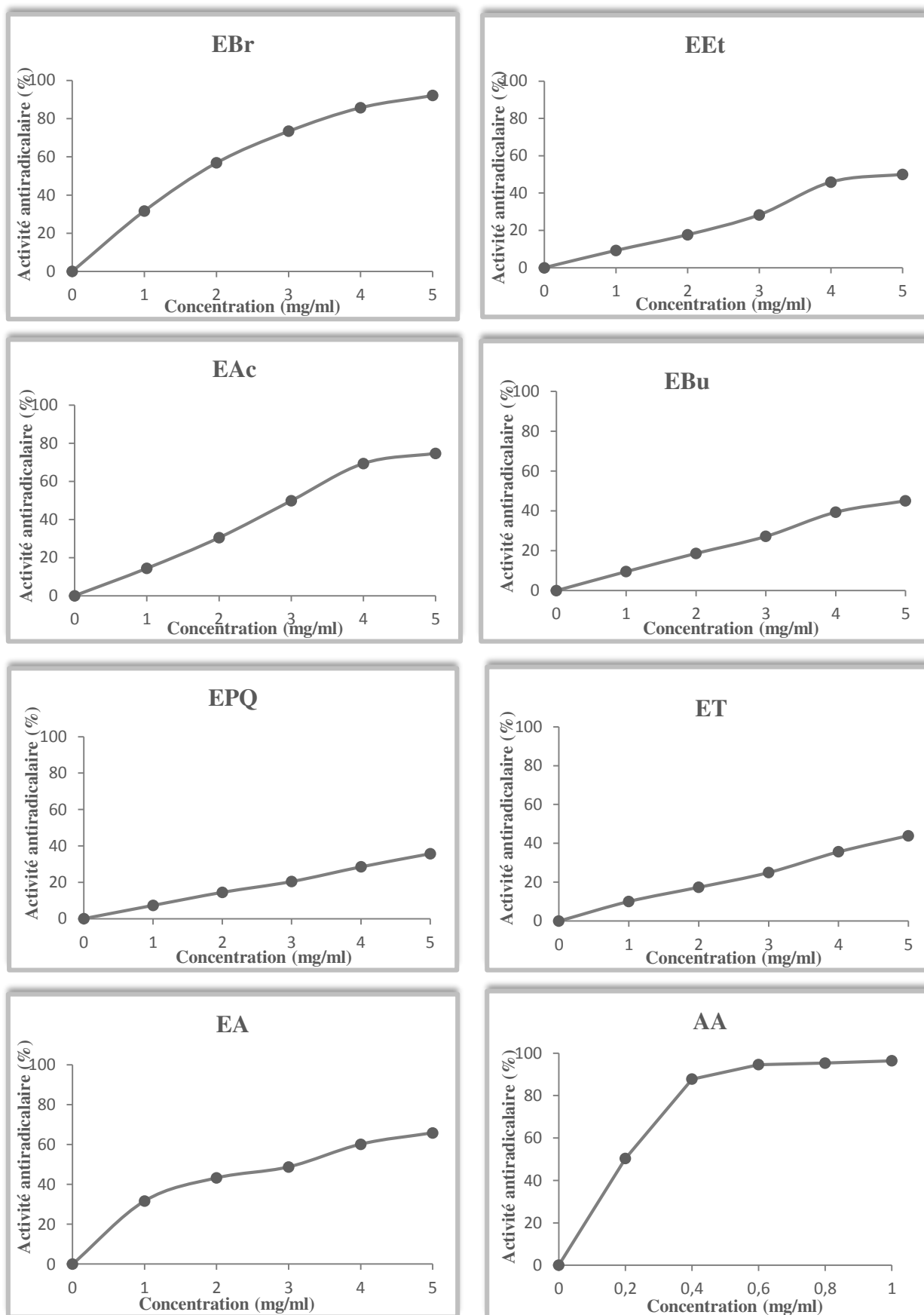
(<sup>c</sup>) mg d'équivalent de catéchine par g du poids de la matière sèche.

### I.3. Etude de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des baies de *Juniperus phoenicea* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) a été réalisée par la technique du piégeage du radical libre DPPH. Ce dernier est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de la stabilité de son radical et la simplicité de l'analyse. Ce radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés antiradicalaires. Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des extraits à tester a été mesuré à 517 nm. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes en montrant une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des différents extraits. Un effet antiradicalaire maximal de  $96,4 \pm 2,14\%$  est exercé par l'acide ascorbique (AA) à la concentration de 1mg/ml. Les pourcentages d'inhibition enregistrés en présence des différents extraits de *Juniperus phoenicea* sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. A la concentration de 5 mg/ml, l'EBr semble avoir la meilleure activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition maximal de l'ordre de  $92,08 \pm 1,56 \%$ . A la même concentration l'EAc et l'EA enregistrent des pourcentages égaux à  $74,73 \pm 1,34 \%$  et  $65,77 \pm 9,33 \%$  respectivement. Tandis que les extraits EEt, EBU et ET enregistrent un pourcentage d'inhibition de l'ordre de  $50,05 \pm 2,12 \%$ ,  $45,07 \pm 3,75 \%$  et  $43,94 \pm 1,88 \%$  respectivement. Alors que l'EPQ montre une faible activité avec une valeur de  $35,70 \pm 1,21 \%$  (tableau 6 et figure 29).

**Tableau 6.** Valeurs de l'activité antiradicalaire (%) des extraits des baies de *Juniperus phoenicea* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique).

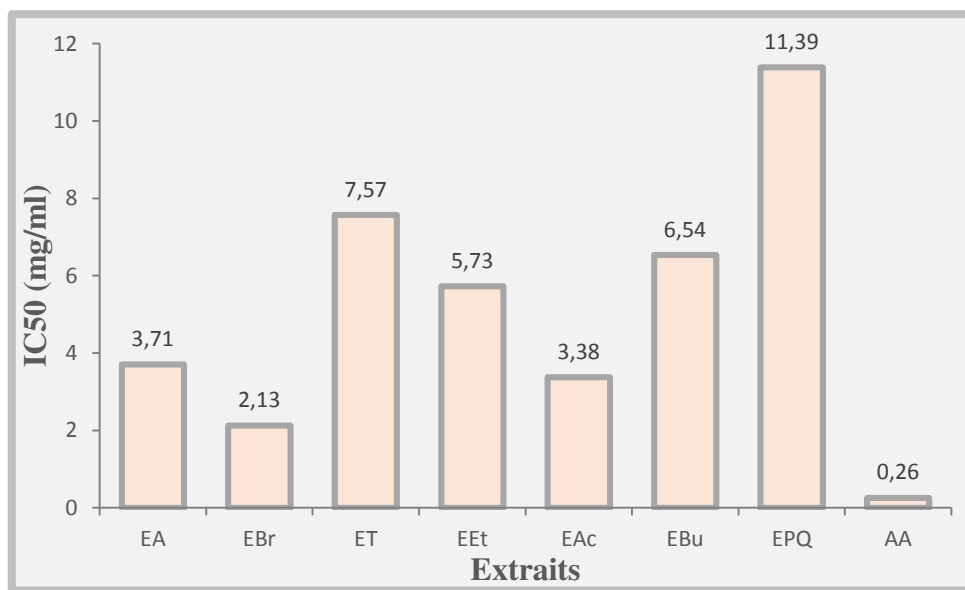
Extraits (5mg/ml)	Activité antiradicalaire (%)
EA	$65,77 \pm 9,33$
EBr	$92,08 \pm 1,56$
EEt	$50,05 \pm 2,12$
EAc	$74,73 \pm 1,34$
EBu	$45,07 \pm 3,75$
EPQ	$35,70 \pm 1,21$
ET	$43,94 \pm 1,88$
Acide ascorbique (1 mg/ml)	$96,4 \pm 2,14$



**Figure 29.** Activité antiradicalaire (%) des extraits des baies de *Juniperus phoenicea* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH.

### ● Evaluation de l' IC<sub>50</sub>

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, les résultats sont exprimés aussi en termes d' IC<sub>50</sub> exprimant la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire dans le milieu réactionnel. Les valeurs d' IC<sub>50</sub> ont été représentées dans la figure 30. Ces dernières ont été calculées à partir des courbes des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction de différentes concentrations d'extraits utilisés. Plus la valeur d' IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. Selon les résultats enregistrés, les extraits EBr, EAc et EA sont dotés d'un pouvoir antioxydant important par rapport aux autres extraits, leurs IC<sub>50</sub> respectives sont : 2,13, 3,38 et 3,71 mg/ml mais relativement faible que celle d'acide ascorbique (AA) dont la valeur est de l'ordre de 0,26 mg/ml. L' IC<sub>50</sub> de l'EEt est de l'ordre de 5,73 mg/ml, suivi de l'EBu, et de ET avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de (6,54 mg/ml) et (7,57 mg/ml) respectivement. L'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'EPQ (IC<sub>50</sub>= 11,39 mg/ml).



**Figure 30.** Représentation de la concentration IC<sub>50</sub> des différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique).

## II. Etude biologique

### II.1. Etude pondérale

#### II.1.1. Variation du poids corporel

Le poids corporel des rats exprimé en (g) des quatre lots expérimentaux a été pris quotidiennement et présenté au début et à la fin de l'expérimentation.

Après 12 jours de traitement, nos résultats montrent une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) du poids des animaux du lot TC par rapport au T. Aucune différence de poids corporel n'a été enregistrée chez les rats du lot CJP par rapport aux TC et ceux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 7, figure 31).

#### II.1.2. Variation du poids relatif de certains organes

Les résultats aperçus chez les rats intoxiqués au  $\text{CCl}_4$ , montrent une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) du poids relatif du foie et du cœur par rapport au groupe témoin. Nous avons enregistré également une augmentation significative du poids relatif des testicules ( $P \leq 0,05$ ) et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du poids relatif des reins des animaux traités par le  $\text{CCl}_4$  comparativement aux témoins. En revanche, l'administration orale de l'EAJP aux animaux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  a diminué d'une façon hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) le poids corporel du foie et des testicules par rapport aux animaux du lot TC. De même, une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du poids relatif du cœur et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du poids relatif des reins a été notée chez les animaux du lot CJP comparativement à ceux du lot TC. Tandis qu'aucune différence significative n'a été observée du poids relatif des organes prélevés (foie, reins, cœur et testicules) chez les animaux du groupe JP par rapport à ceux du groupe T (tableau 7, figure 32).

**Tableau 7.** Variation de poids corporel (g) et de poids relatif (g/100g de poids corporel) du foie, reins, testicules et cœur chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

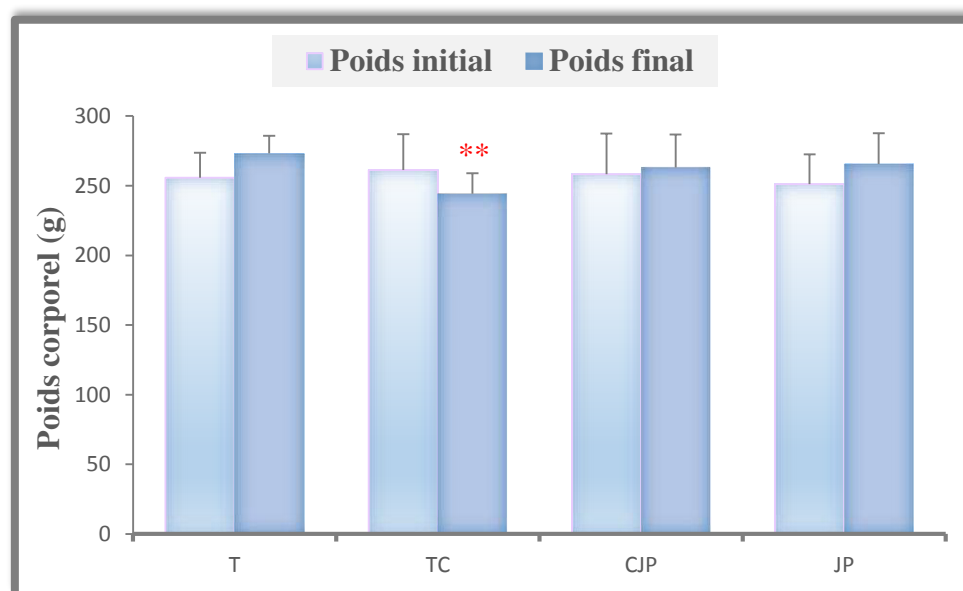
Paramètres	Lots expérimentaux			
	T	TC	CJP	JP
Poids initial (g)	255,83 ± 17,83	261,33 ± 25,65	258,33 ± 29,01	251,16 ± 21,26
Poids final (g)	273,16 ± 12,79	244,16 ± 14,79**	263 ± 23,85	265,66 ± 21,98
Poids relatif du foie	3,58 ± 0,25	4,23 ± 0,27**	3,77 ± 0,16 ##	3,65 ± 0,27
Poids relatif des reins	0,62 ± 0,03	0,80 ± 0,03***	0,69 ± 0,01###***	0,66 ± 0,03
Poids relatif des testicules	1,21 ± 0,09	1,30 ± 0,22*	1,06 ± 0,23##	1,15 ± 0,13
Poids relatif du cœur	0,27 ± 0,04	0,33 ± 0,02**	0,30 ± 0,02#	0,30 ± 0,05

*Poids relatif = (poids absolu individuel/poids corporel individuel au 12<sup>ème</sup> j) × 100.*

\* P ≤ 0,05 D vs, \*\* P ≤ 0,01 DH vs, \*\*\* P ≤ 0,001 DTH vs par rapport au T.

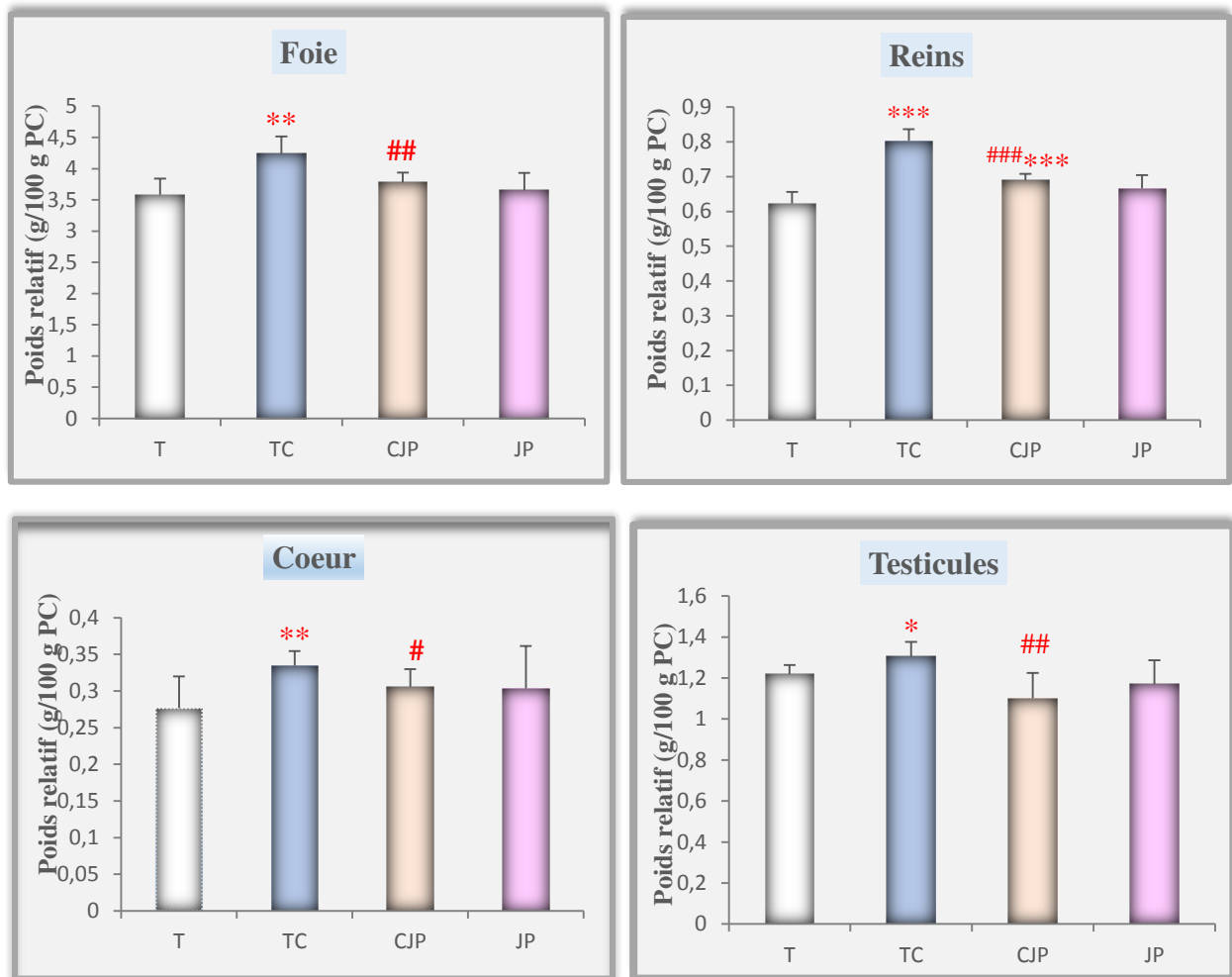
# P ≤ 0,05 D vs, ## P ≤ 0,01 DH vs, ### P ≤ 0,001 DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.



**Figure 31.** Variation de poids corporel en (g) des rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\* P ≤ 0.01 DH vs par rapport au T.



**Figure 32.** Variation du poids relatif de certains organes (foie, reins, cœur et testicules) en (g/100 g de pc) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs, ###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

## II.2. Paramètres hématologiques

Le tableau 8 et les figures (33-39) illustrent les résultats de la formule numérique sanguine des rats témoins et traités. Après 12 jours de traitement, Nos résultats révèlent que le traitement des animaux du lot TC par le  $\text{CCl}_4$  provoque une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) d'hémoglobine et une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) des plaquettes, du taux d'hématocrite et du volume globulaire moyen (VGM) par rapport aux animaux témoins. Par ailleurs, une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) des globules rouges a été enregistrée chez les animaux du lot TC par rapport à ceux du lot témoin. En revanche, nous

avons noté une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) des globules blancs chez les animaux du groupe TC par rapport aux témoins. Tandis qu'aucune différence significative de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) n'a été notée chez les rats du groupe TC par rapport à ceux du groupe T. Le traitement des animaux par l'EAJP a significativement amélioré certains paramètres hématologiques par rapport aux animaux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  et non traités. Aucune perturbation des valeurs hématologiques n'a été rapportée chez les rats traités uniquement par l'EAJP comparant aux témoins.

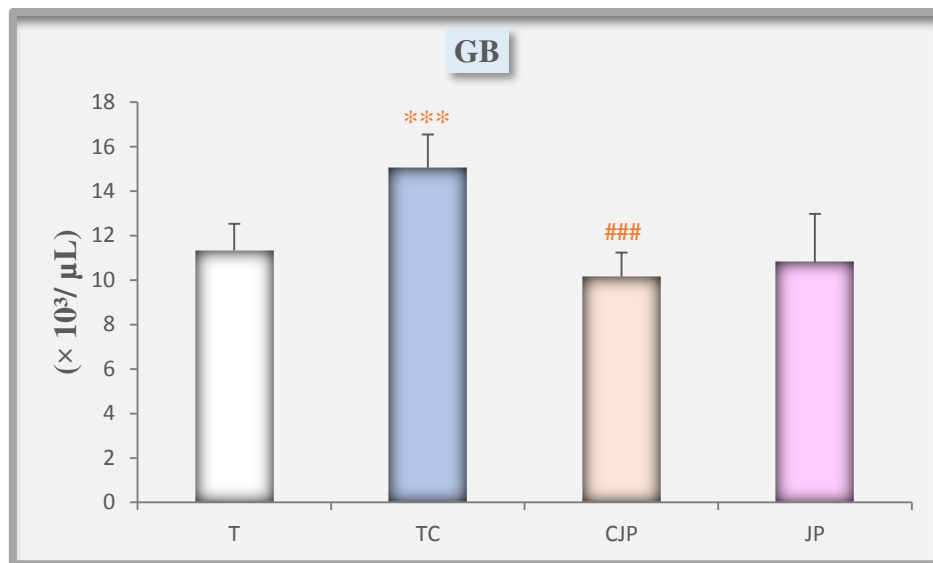
**Tableau 8.** Variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

Paramètres	Témoin	TC	CJP	JP
<b>Globules blancs</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	11,34 $\pm$ 1,18	15,05 $\pm$ 1,50***	10,15 $\pm$ 1,08 ###	10,80 $\pm$ 2,17
<b>Plaquettes</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	828,5 $\pm$ 48,45	726,5 $\pm$ 31,77 **	743,00 $\pm$ 41,26*	852,33 $\pm$ 43,01
<b>Globules rouges</b> ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8,33 $\pm$ 0,36	7,90 $\pm$ 10,84*	8,13 $\pm$ 0,19 #	8,31 $\pm$ 0,50
<b>Taux d'hémoglobine</b> (g/dl)	15,6 $\pm$ 0,68	13,95 $\pm$ 0,51***	15,11 $\pm$ 0,54 ##	15,45 $\pm$ 0,99
<b>Taux d'hématocrite</b> (%)	42,01 $\pm$ 2,56	37,45 $\pm$ 1,77**	41,10 $\pm$ 1,17 ##	40,40 $\pm$ 3,03
<b>VGM (fl)</b>	53,31 $\pm$ 4,21	48,56 $\pm$ 1,44**	49,13 $\pm$ 1,00 #*	50,08 $\pm$ 2,25
<b>CCMH (g/dl)</b>	35,48 $\pm$ 0,68	35,40 $\pm$ 0,4	35,60 $\pm$ 0,35	35,65 $\pm$ 0,45

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs, ###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

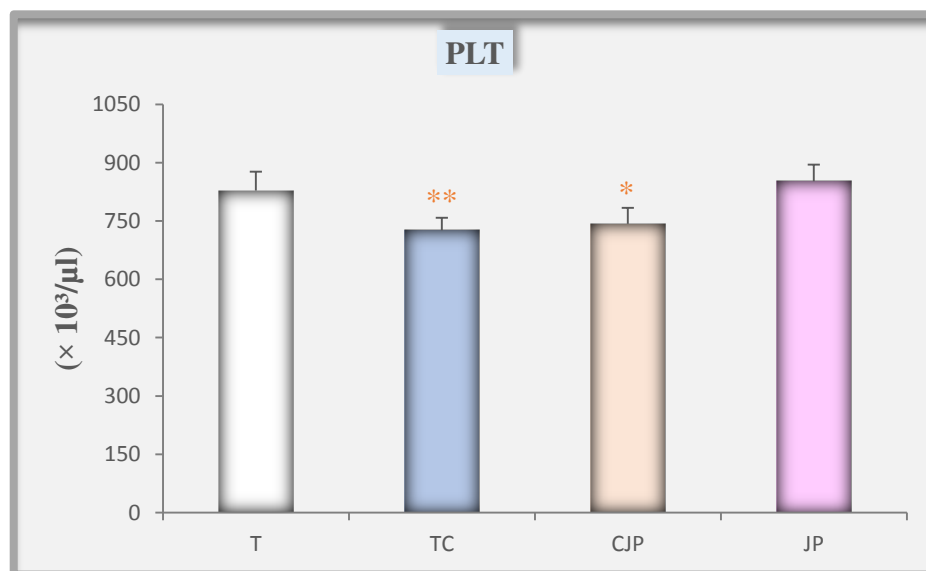


**Figure 33.** Variation des globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

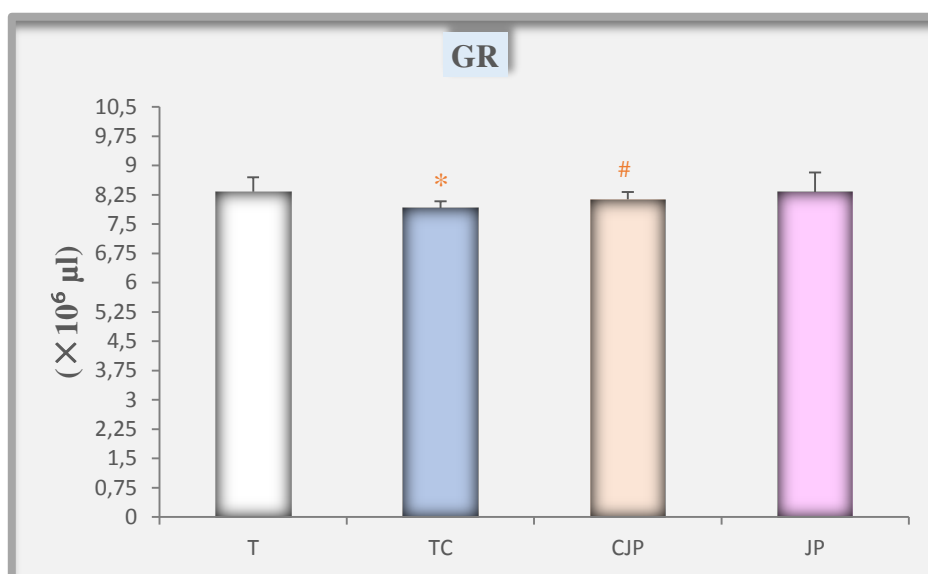
P : Seuil de signification.



**Figure 34.** Variation des plaquettes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au T.

P : Seuil de signification.

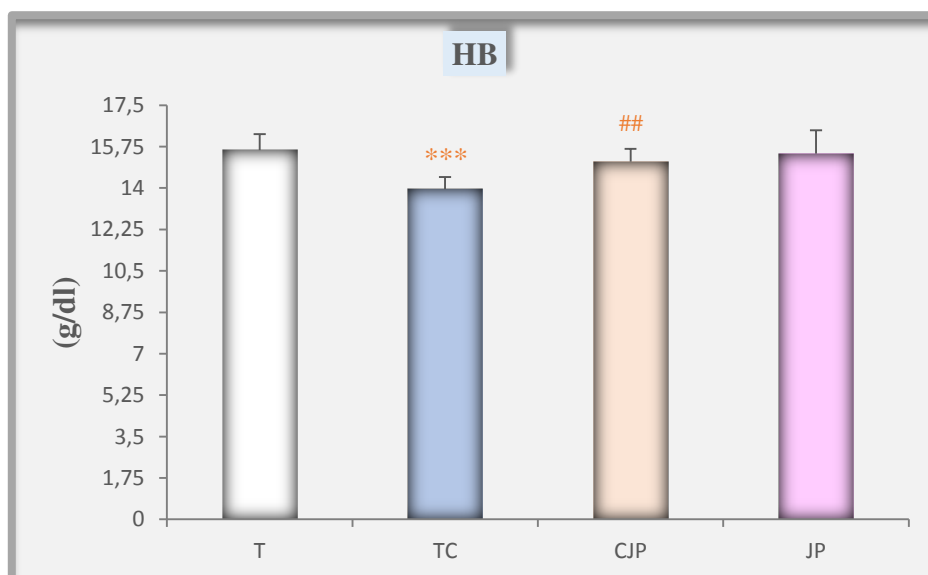


**Figure 35.** Variation des globules rouges ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

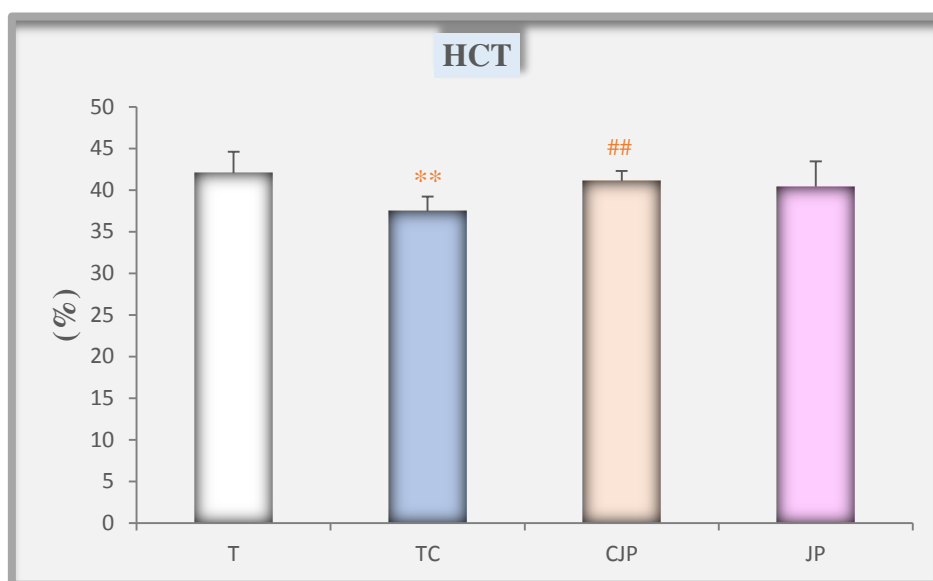


**Figure 36.** Variation du Taux d'hémoglobine (g/dl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

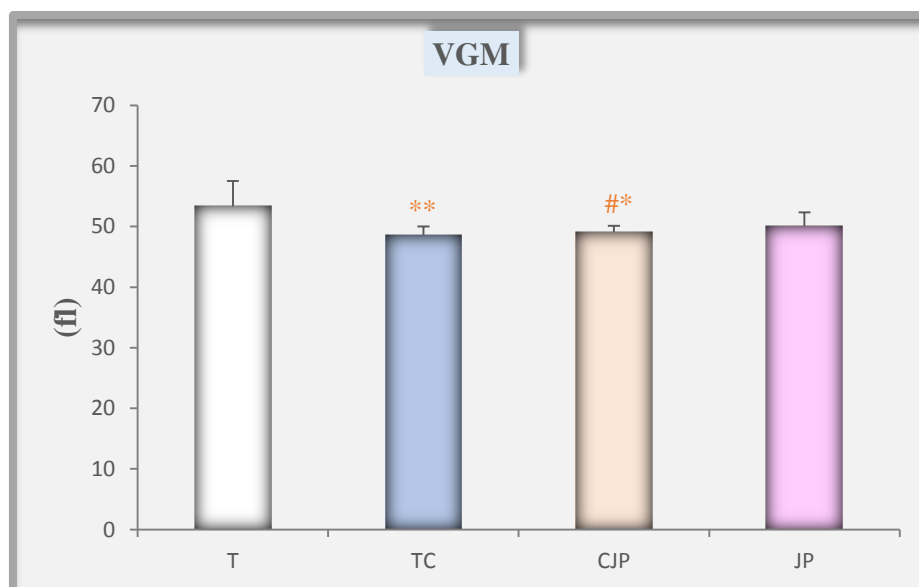


**Figure 37.** Variation du Taux d'hématocrite (%) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au T.

##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

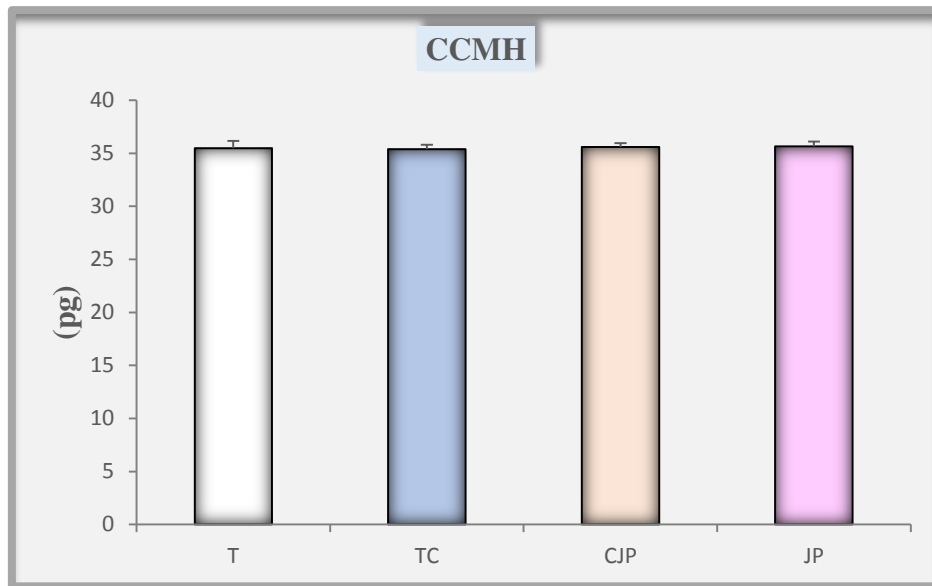


**Figure 38.** Variation de VGM (fl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.



**Figure 39.** Variation de CCMH (g/dl) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

### II.3. Paramètres biochimiques sanguins

Le tableau 9 présente quelques paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

#### II.3.1. Bilan hépatique

##### ❖ Protéines totale

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la concentration plasmatique des protéines totales chez les animaux du lot TC par rapport aux témoins. Cette concentration augmente d'une manière hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) chez les animaux du lot CJP comparativement à ceux du lot TC. Par ailleurs aucune différence significative n'a été observée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 9, figure 40).

##### ❖ Albumine

Nous constatons une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la concentration plasmatique d'albumine chez les animaux du lot TC par rapport au T. En revanche, le traitement des rats par l'EAJP a augmenté cette concentration d'une façon significative ( $P \leq 0,05$ ) par

rapport aux animaux du groupe TC. Par ailleurs aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 9, figure 40).

#### ❖ Bilirubine totale

L'administration du  $\text{CCl}_4$  aux animaux du lot TC a entraîné une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la concentration plasmatique de bilirubine totale par rapport aux témoins. En revanche, une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) de cette concentration a été enregistrée chez les rats du lot CJP par rapport au TC. Tandis qu'aucune différence significative n'a été notée chez les animaux du lot JP comparativement aux témoins (tableau 9, figure 40).

#### ❖ Transaminases

Les résultats illustrés montrent, une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les animaux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  par rapport à ceux du lot T. Par ailleurs nous avons enregistré une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'ASAT et hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'ALAT chez les rats du lot CJP par rapport à ceux du groupe TC. Aucune variation significative de ces enzymes n'a été remarquée chez les animaux ayant reçu l'EAJP uniquement par rapport aux témoins (tableau 9, figure 41).

#### ❖ Phosphatase alcaline

Nous constatons une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats du lot TC par rapport aux rats témoins. En revanche une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) a été notée chez les animaux du lot CJP par rapport à ceux du groupe TC. Tandis qu'aucune variation significative n'a été remarquée chez les animaux ayant reçu l'EAJP uniquement par rapport aux témoins (tableau 9, figure 42).

#### ❖ Lactate déshydrogénase

Les résultats illustrés montrent, une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique du lactate déshydrogénase (LDH) chez les animaux traités par le  $\text{CCl}_4$  par rapport à ceux du lot T. Par ailleurs l'administration orale de l'EAJP a diminué

cette activité d'une façon très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) chez les animaux du lot CJP par rapport à ceux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  et non traités. Par ailleurs aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 9, figure 42).

### **II.3.2. Bilan rénal**

#### **❖ Urée**

La concentration plasmatique d'urée a été augmentée d'une façon très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) chez les rats du lot TC comparativement aux témoins. Cette concentration a diminué d'une façon très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) chez les animaux du lot CJP par rapport à ceux du groupe TC. Tandis qu'aucune variation significative n'a été notée chez les animaux ayant reçu l'EAJP uniquement par rapport aux témoins (tableau 9, figure 43).

#### **❖ Créatinine et acide urique**

Nous constatons une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la concentration plasmatique de créatinine et d'acide urique chez les animaux du lot TC par rapport au T. En revanche le traitement des rats par l'EAJP a diminué d'une façon hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) ces concentrations chez les rats du lot CJP par rapport à ceux du groupe TC. Par ailleurs aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 9, figure 43).

### **II.3.3. Bilan énergétique**

#### **❖ Glucose**

D'après le tableau 9 et la figure 44, nous constatons une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de la concentration plasmatique en glucose chez les animaux traités par le  $\text{CCl}_4$  par rapport aux témoins. Cette concentration diminue d'une manière significative ( $P \leq 0,05$ ) chez les animaux traités par l'EAJP par rapport à ceux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  et non traités. Aucune différence significative n'a été remarquée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins.

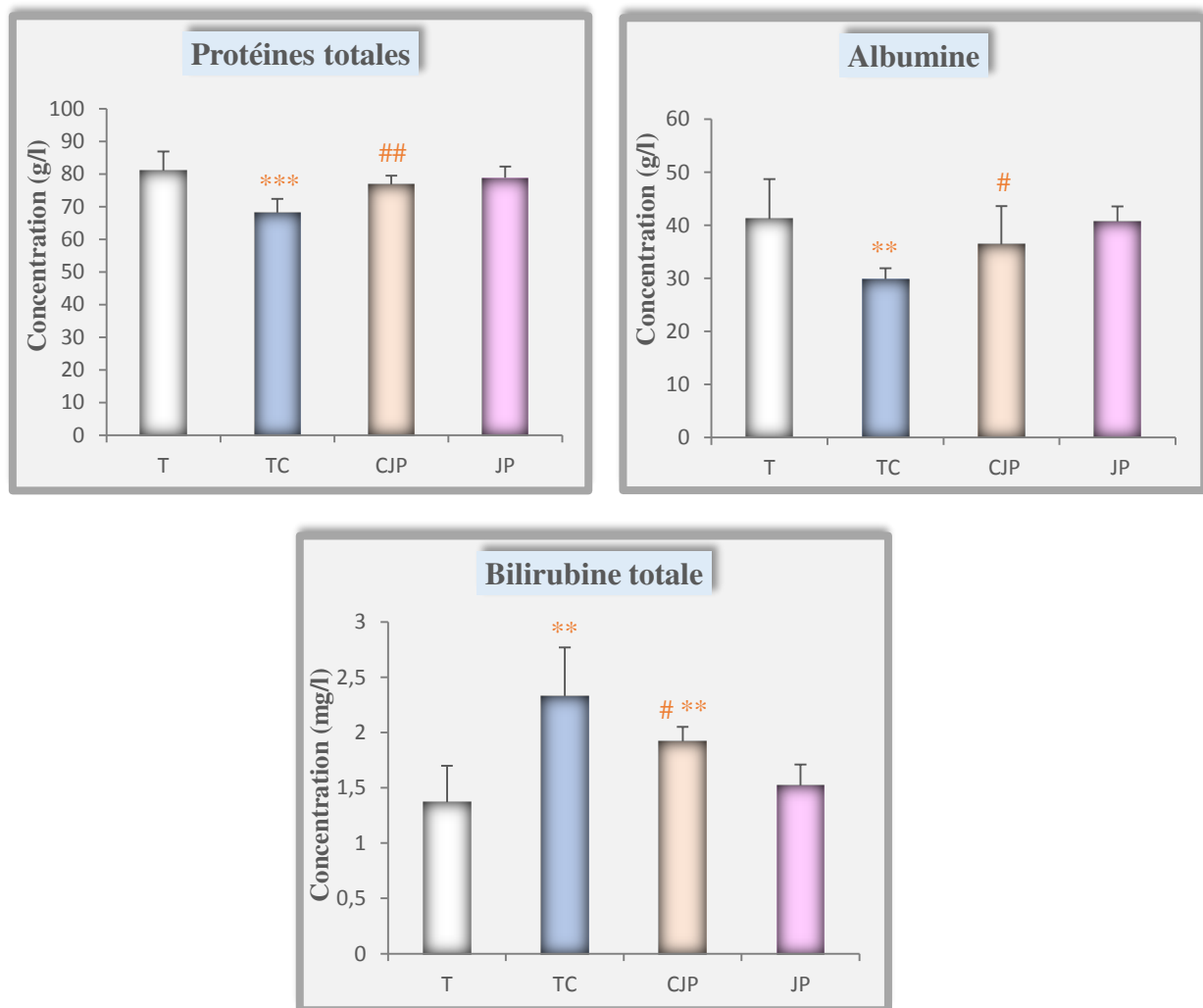
**Tableau 9.** Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

Paramètres	Témoin	TC	CJP	JP
ASAT (UI/L)	179,04 ± 12,70	255,12±11,45***	200,53±15,66 ###*	190,20 ±12,74
ALAT (UI/L)	56,27 ± 4,93	77,05 ± 9,13 ***	61,41 ± 5,51 ##	58,45 ± 7,71
ALP (UI/L)	190,39 ± 12,36	260,61±10,84***	202,65 ± 7,67 ###	184,54 ± 9,97
LDH (UI/L)	618,16 ± 18,60	768,5 ± 12,54***	661,5±22,47 ###**	631,83±14,40
Protéine totale (g/l)	81,09 ± 5,81	68,18 ± 4,25***	76,87 ± 2,70 ##	78,89 ± 3,42
Albumine (g/l)	41,22 ± 7,48	29,83 ± 2,06**	36,40 ±7,23#	40,73 ± 2,85
Bilirubine totale(mg/l)	1,37 ± 0,33	2,33 ± 0,44**	1,92 ± 0,13#**	1,52 ± 0,19
Créatinine (mg/l)	5,62 ± 0,75	7,18 ± 0,66**	5,99 ± 0,33##	5,48 ± 0,40
Urée (g/l)	0,47 ± 0,05	0,66 ± 0,07 ***	0,45 ± 0,03###	0,49 ± 0,06
Acide urique (mg/l)	17,19 ± 3,11	26,03 ± 4,26**	16,17 ± 3,69##	19,15 ± 3,86
Glycémie (g/l)	1,06 ± 0,13	1,38 ± 0,15**	0,96 ± 0,14 #	1,16 ± 0,08

\* P ≤ 0,05 D vs, \*\* P ≤ 0,01 DH vs, \*\*\* P ≤ 0,001 DTH vs par rapport au T.

# P ≤ 0,05 D vs, ## P ≤ 0,01 DH vs, ### P ≤ 0,001 DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification

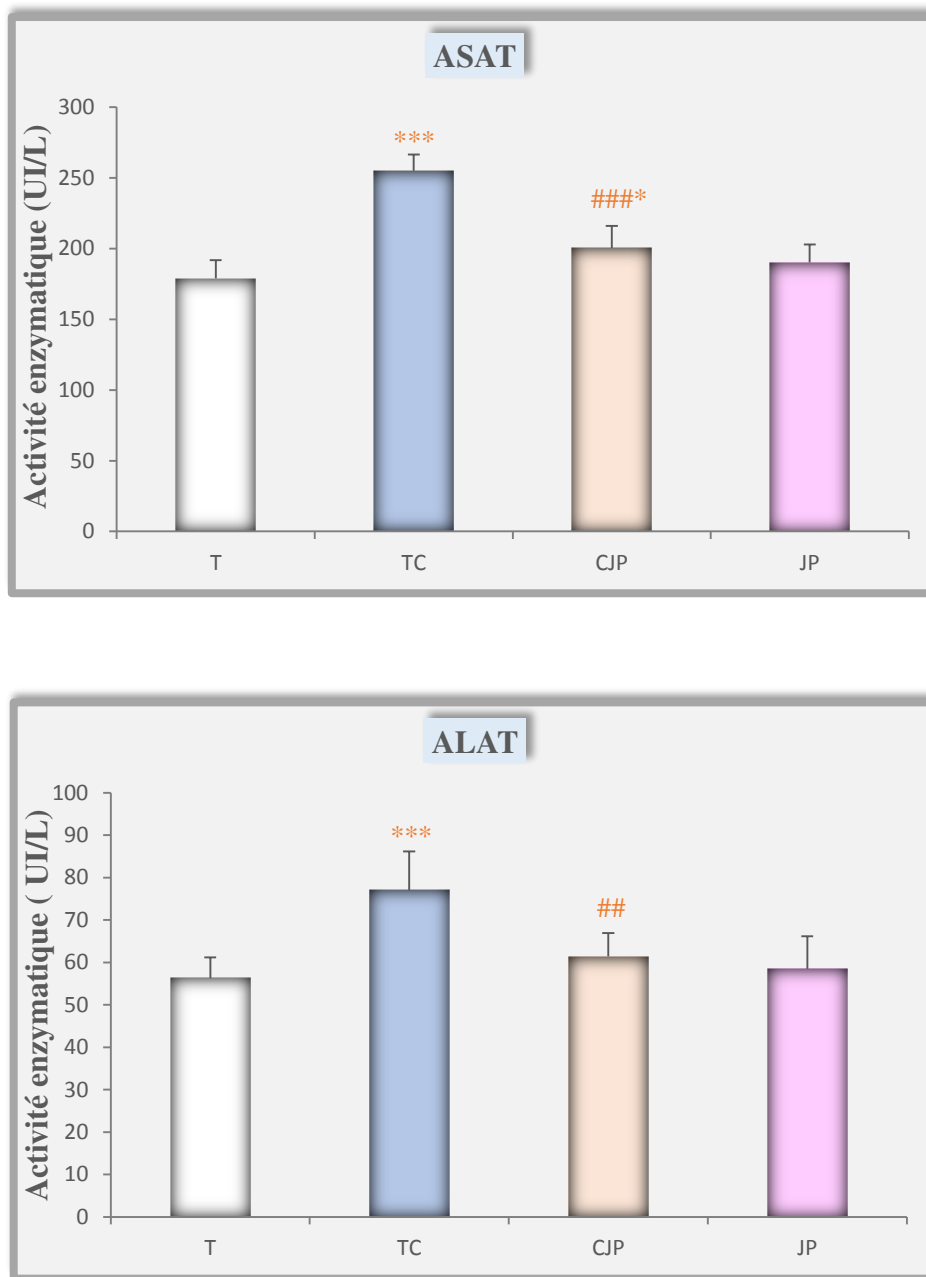


**Figure 40.** Variation de la concentration plasmatique en protéines totales, albumine (g/l) et bilirubine totale (mg/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

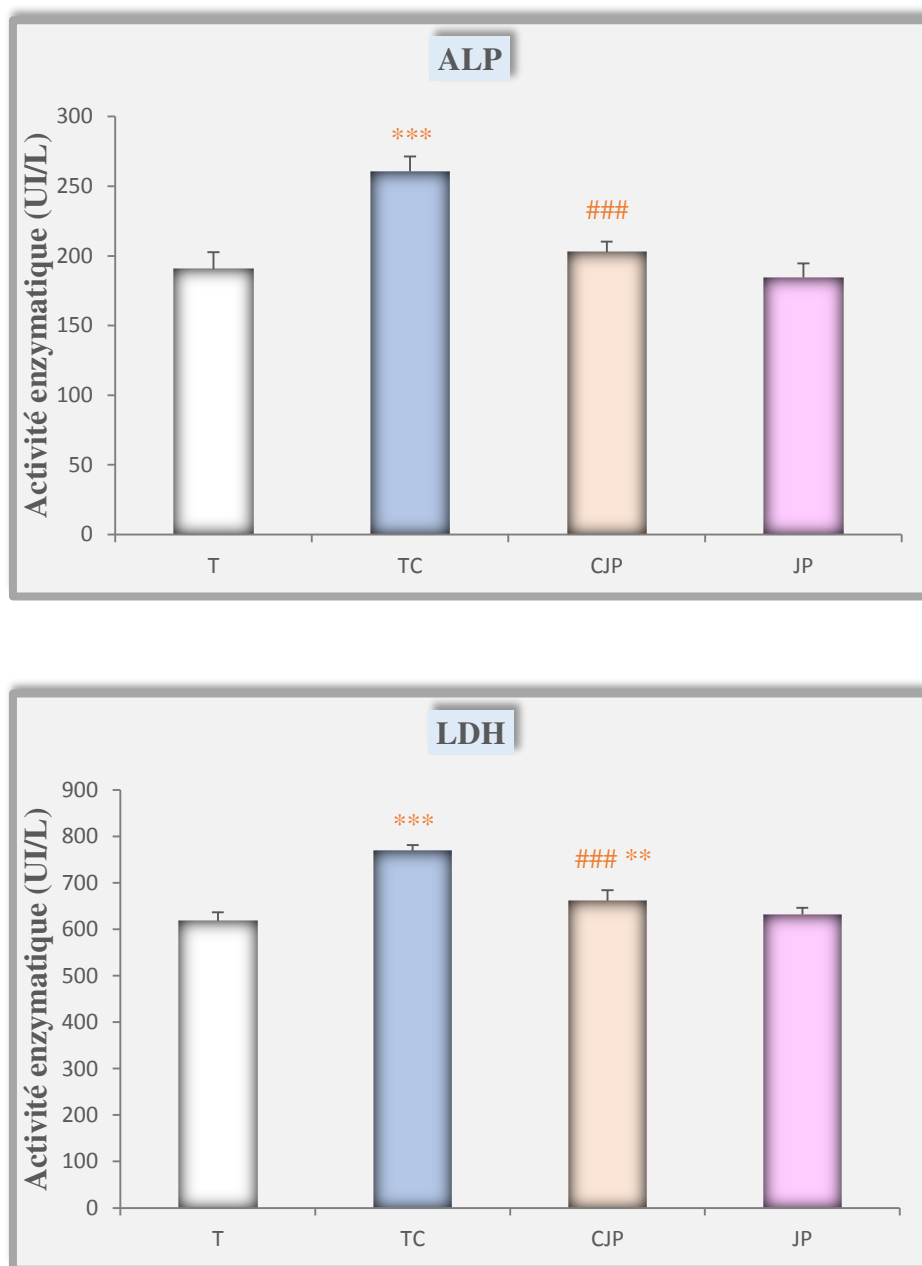


**Figure 41.** Variation de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO) et de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) (UI/L) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

##  $P \leq 0,01$  DH vs, ###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

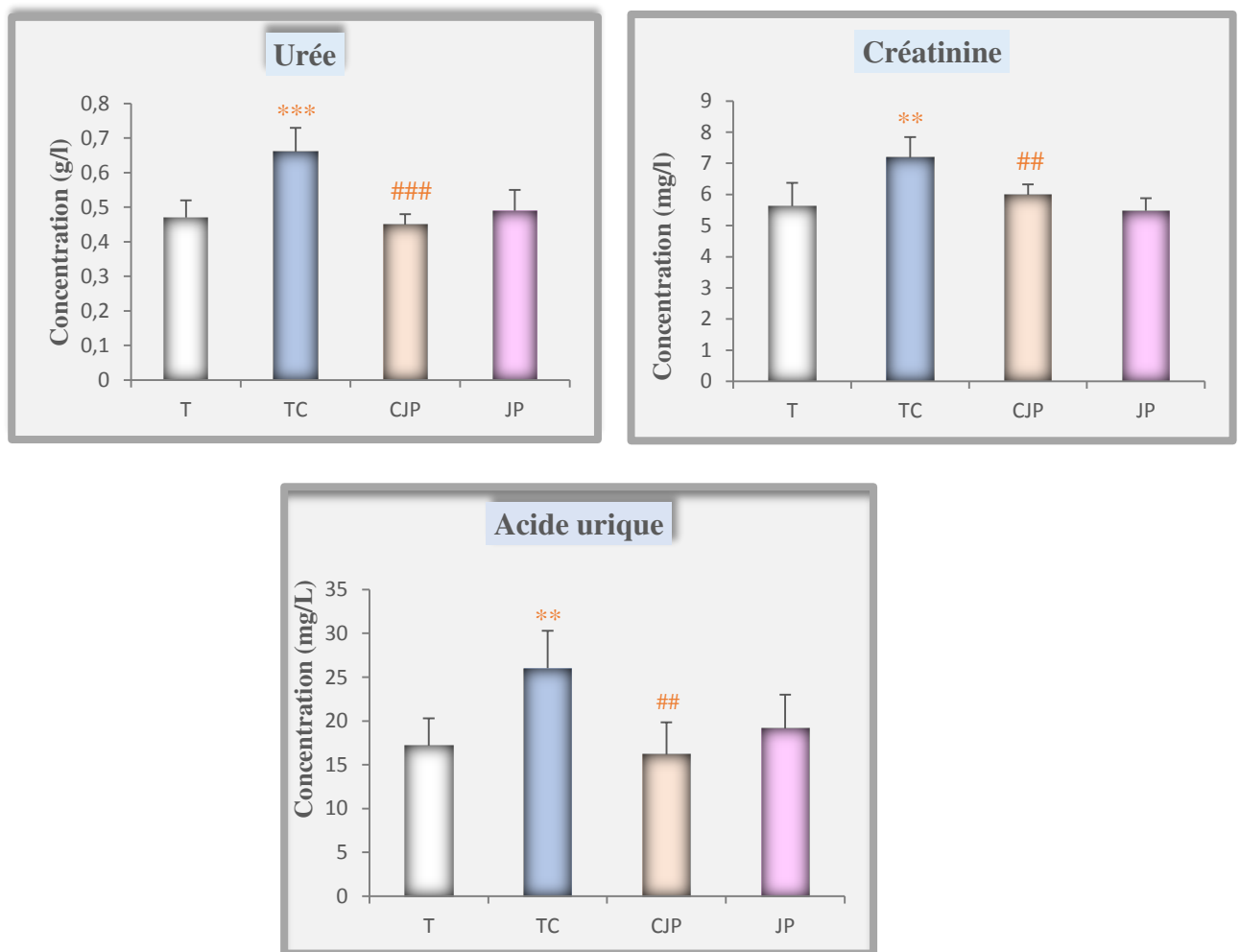
P : Seuil de signification.



**Figure 42.** Variation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) et du lactate déshydrogénase (LDH) (UI/L) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

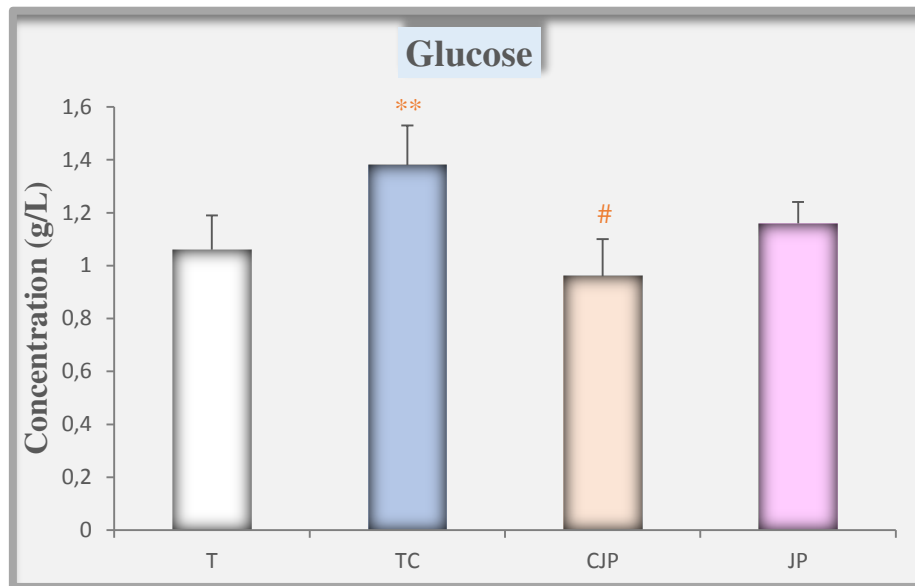


**Figure 43.** Variation de la concentration plasmatique en urée (g /l), créatinine et acide urique (mg/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

##  $P \leq 0,01$  DH vs, ###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.



**Figure 44.** Variation de la concentration plasmatique glucose (g/l) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*\*  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

## II. 4. Paramètres du stress oxydant

### II. 4.1. Glutathion réduit (GSH)

Nos résultats montrent que la teneur cellulaire en GSH décroît d'une façon hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans le foie, très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans les reins, et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les testicules et le cœur chez les rats du lot TC comparativement aux rats du lot T. Cette chute considérable s'est améliorée d'une façon hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans le foie et les reins et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans le cœur et les testicules chez les animaux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  et traités par l'EAJP par rapport aux animaux du lot TC. Aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 10, figure 45).

### II. 4. 2. Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) du taux de MDA dans le foie et les reins chez les animaux du lot TC par rapport aux témoins. Tandis qu'une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) a été notée dans les testicules et le cœur chez les animaux du lot TC comparativement

aux témoins. Par ailleurs l'administration orale de l'EAJP a diminué ce taux d'une façon significative ( $P \leq 0,05$ ) dans le foie et les testicules et hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans les reins et le cœur par rapport aux rats du lot TC. Tandis qu'aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins (tableau 10, figure 46).

#### II.4.3. Glutathion peroxydase (GPx)

D'après le tableau 10 et la figure 47, on constate que le traitement des rats par le  $\text{CCl}_4$  provoque une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans le foie et le cœur et hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans les reins et testicules par rapport aux témoins. En revanche, on enregistre une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de cette activité dans le foie et significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les reins des animaux du lot CJP par rapport à ceux du lot TC. On n'enregistre aucune variation significative de l'activité enzymatique de la (GPx) dans le cœur et les testicules des animaux CJP par rapport aux TC. De même, aucune différence significative n'a été enregistrée chez les animaux du lot JP par rapport aux témoins.

#### II.4.4. Glutathion - S- transférase (GST)

Concernant l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST), nous constatons une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans le foie et hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) dans les reins des rats intoxiqués par le  $\text{CCl}_4$  par rapport aux rats témoins. Le traitement des rats intoxiqués par le  $\text{CCl}_4$  par l'EAJP a augmenté l'activité de la GST d'une façon significative ( $P \leq 0,05$ ) dans les reins et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) dans le foie comparativement aux animaux du lot TC. Alors qu'aucune variation significative n'a été observée de cette activité dans les organes (foie et reins) chez les rats traités uniquement par l'EAJP par rapport aux témoins. De même, aucune différence significative de l'activité de la (GST) n'a été marquée dans le cœur et les testicules chez les animaux des quatre lots expérimentaux (tableau 10, figure 48).

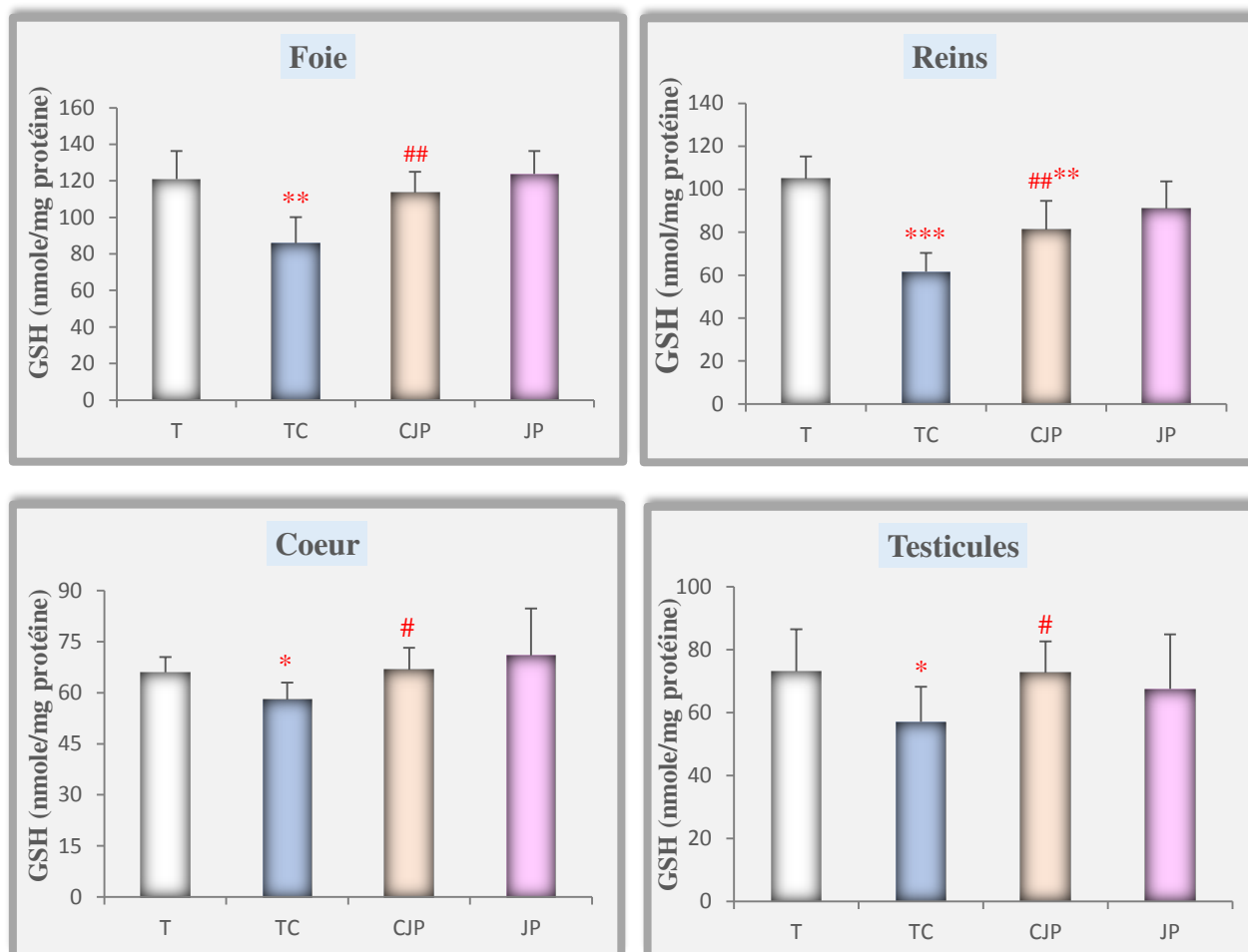
**Tableau 10.** Variation de glutathion (GSH), malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg protéine), glutathion peroxydase (GPx) ( $\mu\text{molGSH/mg}$  protéine) et de glutathion-S-transférase (GST) (nmol GST/min/mg protéine) dans les organes (foie, reins, testicules et cœur) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

Paramètres	Organes	Témoin	TC	CJP	JP
GSH (nmol/mg protéine)	Foie	120,87±15,38	85,70±14,42**	113,66±11,36##	123,70 ±12,54
	Reins	104,91±10,32	61,64±8,77***	81,14±13,41###**	91,08±12,63
	Testicules	73,13 ± 13,36	57,02 ±11,17*	72,73 ± 9,87 #	67,48 ±17,41
	Cœur	65,98 ± 4,50	58,01 ± 5,00*	66,73 ± 6,48 #	70,97 ± 13,82
MDA (nmol/mg protéine)	Foie	0,39 ± 0,10	0,56 ± 0,09**	0,44 ± 0,07#	0,38 ± 0,03
	Reins	0,78 ± 0,08	1,05 ± 0,11***	0,87 ± 0,10 ##	0,73 ± 0,09
	Testicules	0,60 ± 0,10	0,78 ± 0,12 *	0,64 ± 0,08 #	0,52 ± 0,12
	Coeur	0,57 ± 0,04	0,64 ± 0,06 *	0,51 ± 0,07 ##	0,54 ± 0,11
GPx ( $\mu\text{molGSH/mg}$ protéine)	Foie	2,00 ± 0,07	1,70 ± 0,12***	1,93 ± 0,04##*	2,01 ± 0,06
	Reins	2,47 ± 0,38	1,74 ± 0,16 **	1,98 ± 0,20##*	2,24 ± 0,34
	Testicules	0,316 ± 0,02	0,23 ± 0,05**	0,25 ± 0,03**	0,29 ± 0,03
	Coeur	1,44 ± 0,26	0,79 ± 0,20***	0,82 ± 0,15***	1,31 ± 0,19
GST (nmol GST/min/mg protéine)	Foie	0,03 ± 0,003	0,01±0,003***	0,02 ±0,003###*	0,02 ± 0,001
	Reins	0,02±0,003	0,01±0,004**	0,01± 0,003#	0,02± 0,002
	Testicules	0,002 ± 0,0003	0,003 ± 0,0005	0,003 ± 0,0003	0,003 ± 0,0004
	Coeur	0,004 ± 0,0006	0,006 ± 0,0008	0,005 ± 0,0008	0,004 ± 0,0004

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs, ###  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

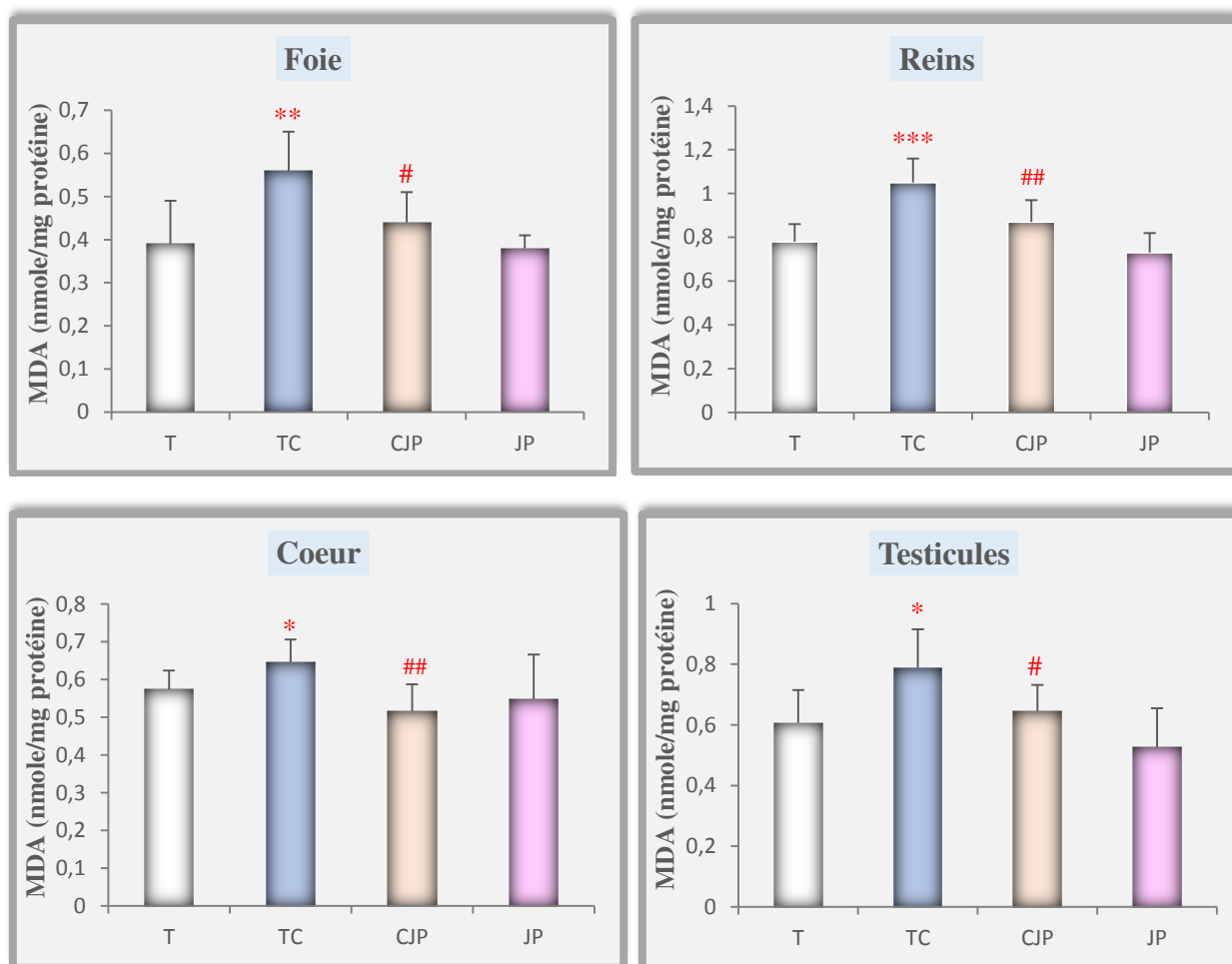


**Figure 45.** Variation de la teneur cellulaire en glutathion (GSH) (nmol/mg protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

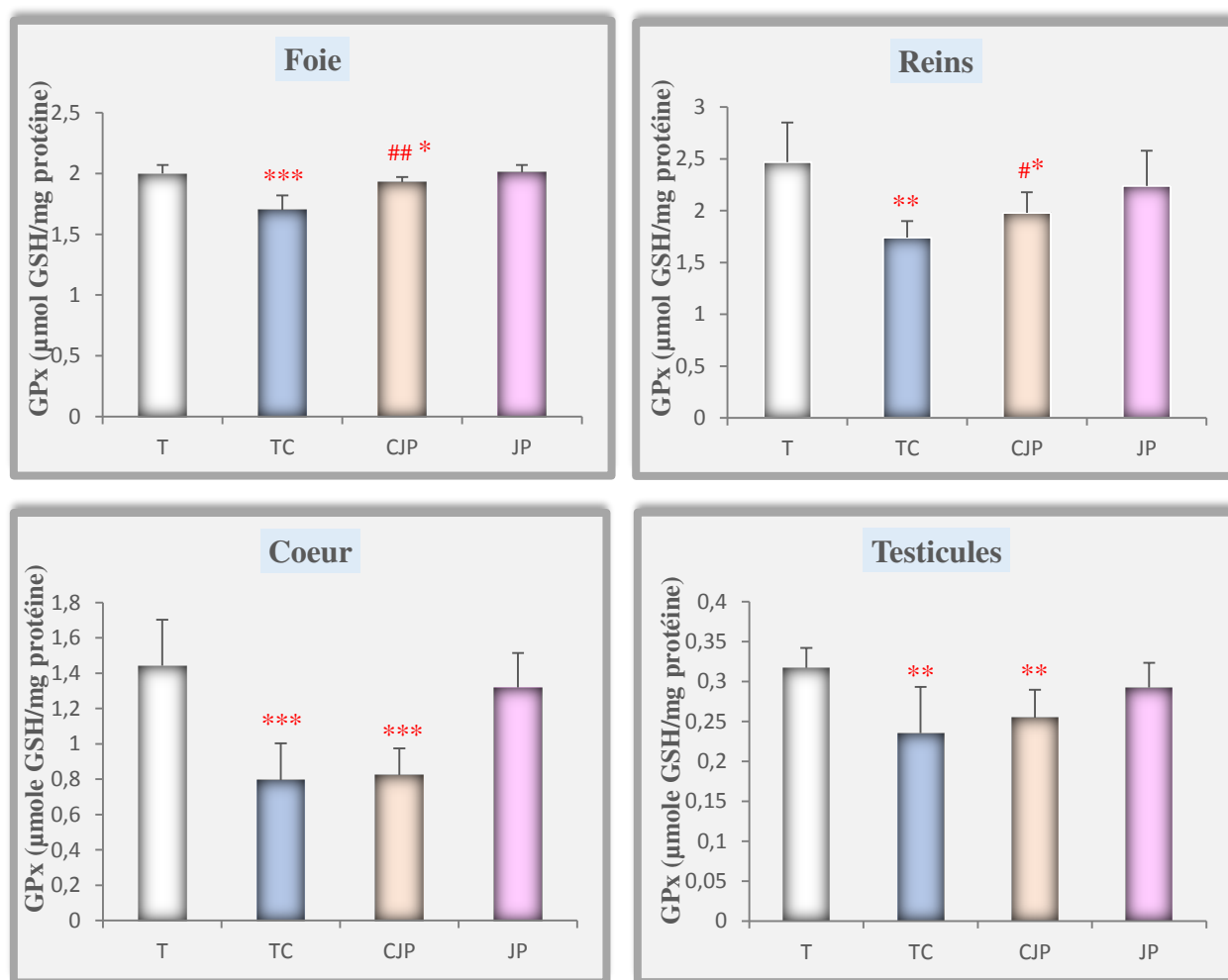


**Figure 46.** Variation de la teneur cellulaire en malondialdéhyde (n mole/mg de protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

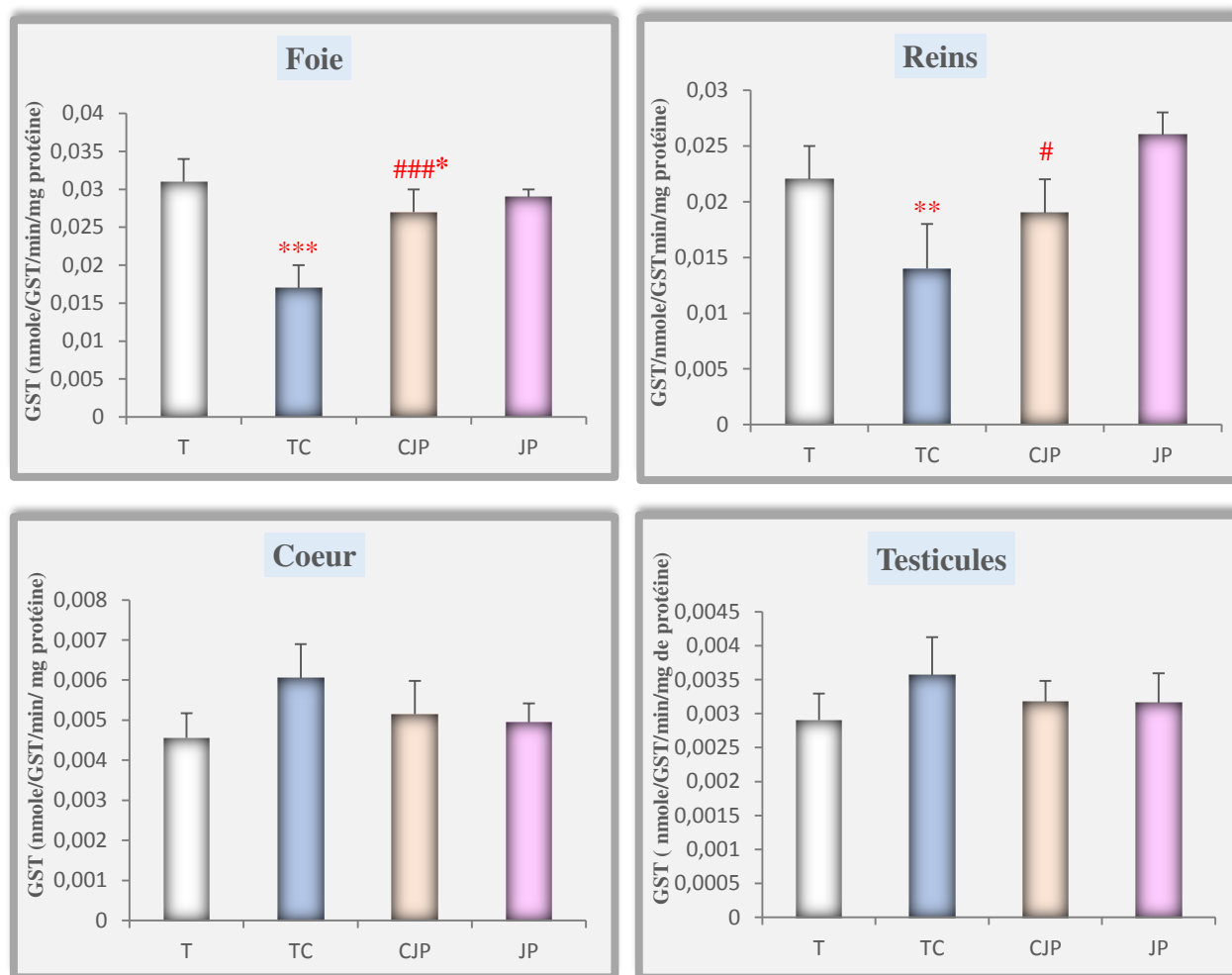


**Figure 47.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol GSH/mg}$  de protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification



**Figure 48.** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (nmole GST/min/mg protéine) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 12 jours de traitement.

\*  $P \leq 0,05$  D vs, \*\*  $P \leq 0,01$  DH vs, \*\*\*  $P \leq 0,001$  DTH vs par rapport au T.

#  $P \leq 0,05$  D vs, ##  $P \leq 0,01$  DH vs par rapport au TC.

P : Seuil de signification.

## II.5. Etude histologique

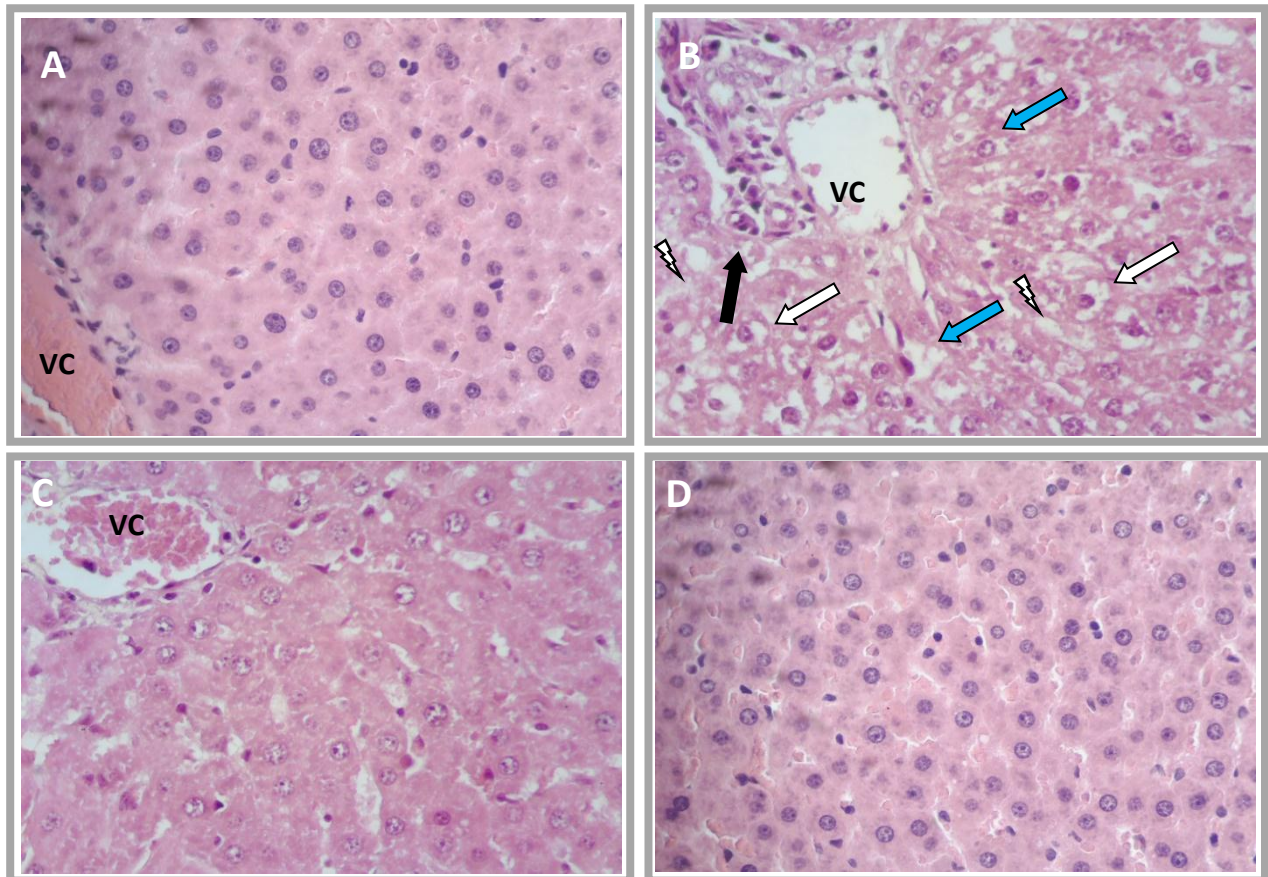
Cette étude nous a permis d'étudier les caractères histologiques du foie et des reins des rats témoins (lot T) et ceux soumis aux différents traitements (lots TC, CJP et JP).

### II.5.1. Etude histologique du foie

L'analyse histologique ( $\times 400$ ) du foie des rats témoins révèle un parenchyme hépatique sans modification histologique. Les lobules sont constitués d'hépatocytes à cytoplasme abondant et à noyau arrondi régulier et des veines centrolobulaires visibles (figure 49-A). L'observation microscopique du foie des rats traités par le  $\text{CCl}_4$  à la dose de 1 ml/kg de pc (v/v dans l'huile d'olive) révèle des sévères dégâts structurels caractérisés par une nécrose hépatocytaire massive dans la région centrolobulaire, infiltration de cellules inflammatoires, dégénérescence des hépatocytes et la dilatation sinusoidale (figure 49- B). En revanche, l'étude histologique du foie des rats intoxiqués par le  $\text{CCl}_4$  et traités par l'EAJP (250 mg / kg de pc) révèle une amélioration partielle au niveau de la structure des hépatocytes par rapport aux animaux du lot TC. L'inflammation des hépatocytes est minimale et la nécrose lobulaire est présente à moindre degré (figure 49- C). Par ailleurs aucune modification histologique n'a été observée dans les foies des animaux du lot JP par rapport au témoin (figure 49- D).

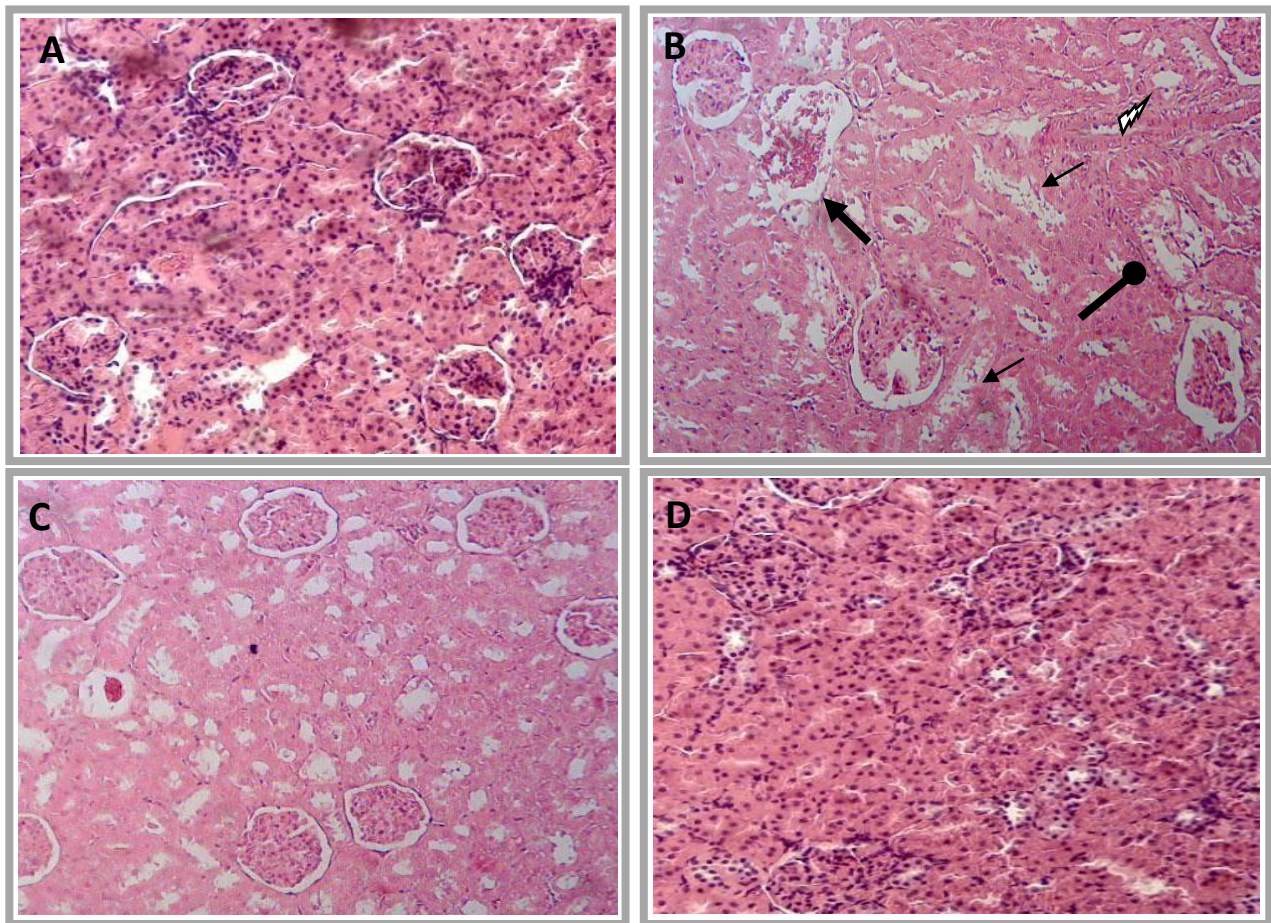
### II.5.2. Etude histologique du rein

L'observation microscopique ( $\times 100$ ) du rein des rats témoins révèle la présence d'un parenchyme rénal d'architecture normale, constitué de tubes rénaux rectilignes et des glomérules entourés d'un espace étroit et clair (figure 50- A). L'administration de  $\text{CCl}_4$  (1 ml/kg, v/v dans l'huile d'olive) provoque des modifications et une désorganisation du parenchyme rénal, caractérisées par une vaste vacuolisation, une dilatation tubulaire et une dégénérescence des glomérules rénaux (figure 50- B). Alors que, le parenchyme rénal des rats intoxiqués par le  $\text{CCl}_4$  et traités par l'EAJP à la dose de 250 mg / kg de pc présente une réduction significative des lésions rénales par rapport aux animaux du lot TC (figure 50- C). Tandis qu'aucune modification histologique n'a été observée dans les reins du groupe JP par rapport au témoin (figure 50- D).



**Figure 49.** Coupes histologiques du tissu hépatique coloré à l'Hématoxyline-Eosine/ Grossissement 400X : (A) Foie d'un rat témoin (lot T) ; (B) Foie d'un rat intoxiqué par le  $\text{CCl}_4$  (lot TC) ; (C) Foie d'un rat intoxiqué par le  $\text{CCl}_4$  et traité par l'EAJP (lot CJP) ; Foie d'un rat traité par l'EAJP (lot JP).

VC : Veine centrale ;  $\blackrightarrow$  Infiltration des cellules inflammatoires ;  $\Rightarrow$  Ballonnement cellulaire ;  $\rightarrow$  Nécrose cellulaire ;  $\nabla$  Espace sinusoidale.



**Figure 50.** Coupes histologiques du tissu rénal coloré à l'Hématoxyline-Eosine/ Grossissement 100X : (A) Rein d'un rat témoin (lot T) ; (B) Rein d'un rat intoxiqué par le  $\text{CCl}_4$  (lot TC) ; (C) Rein d'un rat intoxiqué par le  $\text{CCl}_4$  et traité par l'EAJP (lot CJP) ; Rein d'un rat traité par l'EAJP (lot JP).

● Dégénérescence de glomérules ; → Grand espace de bowman ; → Dilatation tubulaire ; ↗ Vacuolisation

# Discussion

## Discussion

Depuis l'antiquité l'humanité a utilisé diverses plantes qui existent dans leurs habitats, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir très vaste et riche en composés potentiels attribués aux «métabolites secondaires», qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structures chimiques et possédant un très large éventail d'activités biologiques.

Ces dernières années, l'attention s'est portée sur l'une des activités biologiques des plantes médicinales qui est l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques en combattant le stress oxydant (**Meddour *et al.*, 2013**).

Récemment, la recherche scientifique s'est focalisée sur l'investigation des agents antioxydants d'origine végétale particulièrement les composés phénoliques qui peuvent être des alternatives aux substances synthétiques (**Salerno *et al.*, 2014**).

La détermination de la capacité antioxydante des produits naturels peut s'orienter dans deux directions. La première direction consiste à évaluer *in vitro* le potentiel antioxydant, déterminé par la quantité relative de composés antioxydants contenus dans les extraits et les propriétés antioxydantes de chacun des constituants. La seconde direction consiste à déterminer *in vivo* les propriétés antioxydantes des extraits végétales, en mettant en jeu des systèmes biologiques.

### **I. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de *Juniperus phoenicea***

L'extraction des composés phénoliques des baies de *Juniperus phoenicea* a été effectuée par un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) à 85% pour obtenir initialement l'EBr contenant les phénols totaux. L'extraction des flavonoïdes a été réalisée par l'utilisation des solvants organiques à savoir: éther diéthylique, acétate d'éthyle et le n-butanol. Alors que l'extraction des tanins a été effectuée par des macérations successives dans l'éther de pétrole, l'éther diéthylique et le méthanol. De ce fait six différents extraits ont été obtenus successivement : l'extrait brut (EBr), l'extrait d'éther diéthylique (EEt), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc), l'extrait de n-butanol (EBu), l'extrait de la phase aqueuse (EPQ) et l'extrait des tanins (ET).

**Selon Antolovich et ses collaborateurs (2000)**, le choix d'une méthode d'extraction dépend essentiellement de la nature chimique des composés, de l'échantillon (graines, feuilles, fruits)

et de son état physique. En effet, les composés phénoliques solubles sont généralement extraits en utilisant des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone (**Bourgou et al., 2016**). Il a été constaté dans des travaux antérieurs que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les composés phénoliques d'une plante (**Sun et al., 2007**). En fait, il a été utilisé afin d'obtenir des extraits riches en flavanones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères (**Garcia-Perez, 2008**). Par ailleurs l'utilisation du mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) augmente le rendement d'extraction des composés phénoliques de manière significative par rapport à des extractions aux solvants purs (**Vazquez et al., 2008; Mussatto et al., 2011**).

Les résultats obtenus montrent que l'EBr enregistre un fort rendement égal à 31,59 % suivi par l'ET à raison de 12,29%. L'extraction des flavonoïdes révèle que l'EPQ représente le rendement le plus élevé (8,79%) suivi de l'EBu (1,59%) puis de l'EAc (0,96%). Le rendement le plus faible (0,90%) est obtenu par l'EPQ.

Afin de caractériser les extraits des baies de *Juniperus phoenicea*, un dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés a été effectué en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu, de trichlorure d'aluminium et de vanilline respectivement. Le choix de ces méthodes s'articule sur la facilité de ces techniques ainsi que la disponibilité des réactifs.

Les résultats du dosage révèlent la richesse des baies de *Juniperus phoenicea* en composés phénoliques à savoir les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins.

Les teneurs en polyphénols de l'EBr et de l'EA sont respectivement de l'ordre de  $49,43 \pm 0,88$  et  $38,86 \pm 0,23$  mg EAG/g PS. Ces valeurs varient de  $25,91 \pm 0,78$  à  $36,22 \pm 0,96$  mg EAG/g dans les autres extraits. Cette richesse a été constatée par les travaux de **Hayouni et ses collaborateurs (2007)**, effectués sur les baies de *Juniperus phoenicea* poussant en Tunisie. Cependant notre résultat est inférieure à celui de **Hayouni et ses collaborateurs (2007)** dans l'extrait brut méthanolique qui est de l'ordre de 66,10 mg EAG/g PS. Ces valeurs sont supérieures à celles reportées par **Amalich et ses collaborateurs (2016)** sur les feuilles de *Juniperus phoenicea* du Maroc dans les extraits : brut méthanolique (2,99 mg EAG/g), acétate d'éthyle (2,91mg EAG/g), n-butanol (2,16mg EAG/g) et de la phase aqueuse (1,17mgEAG/g).

De même, les différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea* enregistrent des quantités élevées en tanins. La valeur la plus élevée a été enregistrée dans l'EBr ( $23,25 \pm 0,96$ ), l'EAc ( $18,84 \pm 4,41$ ) et dans l'EA ( $15,12 \pm 0,70$ ) EC/g PS. Ces teneurs sont inférieures à celles des feuilles de *Juniperus phoenicea* ( $43,8$  mg EC/g PS) enregistrées par les travaux de **Bettaieb et ses collaborateurs (2012)**.

Concernant le dosage des flavonoïdes, on a constaté que l'EBr et l'EA ont donné des valeurs égales à  $2,88 \pm 0,10$  et  $2,09 \pm 0,37$  mg EQ/g PS respectivement. Les autres extraits enregistrent des valeurs plus élevées variant de  $7,33 \pm 0,34$  à  $11,76 \pm 0,90$  mg EQ/g PS. Ces dernières sont supérieures à celles des feuilles de *Juniperus phoenicea* reportées par **Amalich et ses collaborateurs (2016)** dans les extraits : brut méthanolique ( $0,70$  mg EQ/g), acétate d'éthyle ( $2,36$  mg EQ/g), n-butanol ( $1,86$  mg EQ/g) et de la phase aqueuse ( $0,36$  mg EQ/g PS).

Ces résultats indiquent que la teneur en polyphénols d'une espèce végétale récoltée de différents endroits n'est pas la même, car la plante est influencée par des facteurs biotiques et abiotiques, citons par exemple : les propriétés génétiques, l'état physiologique de la plante, l'environnement, le type de sol, les conditions de récolte et de stockage de la drogue.

Dans nos différents extraits, les teneurs élevées en phénols totaux par comparaison aux flavonoïdes et aux tanins sont logiques étant donné que les flavonoïdes et les tanins représentent les composés majoritaires des polyphénols. Cependant, les faibles teneurs en flavonoïdes enregistrés dans les extraits EBr et EA par rapport aux autres extraits, peuvent être attribuées à la présence des substances phénoliques et non phénoliques telles que les anthocyanines, les sucres, les protéines et les pigments, qui risquent d'interférer avec les composés polyphénoliques et les flavonoïdes. Cette réactivité chimique pourrait masquer leurs potentiels possibles ou rendre leur absorption plus difficile, ce qui influence le résultat final (**Azevedo et al., 2007; Boubekri, 2014**).

L'activité antioxydante des différents extraits des baies de *Juniperus phoenicea* a été mesurée par l'utilisation d'une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre ; c'est la méthode de DPPH, dont le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517nm. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant.

À des fins comparatives, l'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant standard, connu par son pouvoir antioxydant puissant (**Frei et al., 1990**). A une dose de 1mg/ml, Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0,26 mg/ml et une activité antiradicalaire maximale égale à 96,4 ± 2,14%. La valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique est comparable à celle rapportée auparavant (IC<sub>50</sub>=0,27mg/ml) par **Burits et Bucar (2000)**.

A une dose de 5 mg/ml, nos résultats montrent que tous les extraits des baies de *Juniperus phoenicea* ont une activité antiradicalaire concentration dépendante dont l'EBr, l'EAc et l'EA présentent la meilleure activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 92,08 ± 1,56%, 74,73 ± 1,34% et 65,77 ± 9,33% respectivement. Les valeurs d' IC<sub>50</sub> des trois extraits précédents sont de l'ordre de 2,13 mg/ml, 3,38 mg/ml et 3,71 mg/ml respectivement. Cependant nos extraits des baies de *Juniperus phoenicea* s'avèrent moins actifs en comparaison avec l'antioxydant standard «acide ascorbique». L'activité antioxydante des baies de *Juniperus phoenicea in vitro* a été constatée par les travaux de **Hayouni ses collaborateurs (2007)** en utilisant le test de blanchissement du β-carotène et de l'ABTS. Différents travaux ont mis en évidence le pouvoir antioxydant des composés phénoliques de plantes médicinales en révélant une bonne capacité à piéger le radical DPPH (**Chetoui et al., 2013**).

Les composés phénoliques peuvent réduire le stress oxydatif, il a été démontré qu'ils exercent des effets antioxydants par un certain nombre de mécanismes (**Thitimuta et al, 2017**). Leurs activités antioxydantes sont principalement dues à leurs propriétés d'oxydoréduction. En effet, les groupements hydroxyles des polyphénols peuvent accepter un électron pour former des radicaux phénoxyles relativement stables, rompant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne dans les cellules (**Garcia-Perez, 2008**).

Certains travaux ont montré que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols (**Mihai et al., 2011**). De nombreuses études ont établi la relation entre la structure et l'activité antiradicalaire des flavonoïdes en montrant que les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et un groupement 3-OH sur le cycle C (**Baba et Malik, 2015**). En effet, les polyphénols ayant un grand nombre du groupement hydroxyles (OH), présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Londhe et al., 2008**).

## **II. Etude de l'effet protecteur de *Juniperus phoenicea* contre la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone chez les rats : Effets sur la croissance pondérale, la variation des paramètres hématologiques, biochimiques, l'histopathologie de certains organes ainsi que le profil du stress oxydant.**

Notre étude est réalisée avec une concentration de 1ml/kg de CCl<sub>4</sub> de pc (v/v dans l'huile d'olive) en se référant respectivement aux travaux de **Ashton Acton (2012)**, **Raj et ses collaborateurs (2013)**, **Yang et ses collaborateurs (2015)** et **Mahli et ses collaborateurs (2015)** et une dose de 250 mg/kg de pc de l'EAJP en se référant aux travaux de **Aboul-Ela et ses collaborateurs (2005)**.

Nos résultats montrent que l'injection intrapéritonéale de CCl<sub>4</sub> (1ml/kg v/v dans l'huile d'olive) entraîne des perturbations de la croissance physiologique des animaux. En effet, on a remarqué une diminution de la croissance des rats intoxiqués par le tétrachlorure de carbone comparativement aux témoins. Ce résultat permet de suggérer que le CCl<sub>4</sub> présente des effets néfastes sur la croissance corporelle des animaux expérimentaux.

La diminution de poids est accompagnée d'une augmentation de poids relatif des organes étudiés (foie, reins, cœur et testicules) chez les rats traités par le CCl<sub>4</sub>. De ce fait, on peut déduire que ces organes représentent des tissus cibles à l'intoxication au CCl<sub>4</sub>, ce qui augmente leur taille. Ce phénomène a été constaté par de nombreux auteurs citons par exemple les travaux de **Karadeniz (2009)** ; **Rashid Khan et Siddique (2012)** ; **Karthikeyan et ses collaborateurs (2012)**; **Lin et ses collaborateurs (2012)**; **Keshk et Katary (2016)**, qui ont signalé que l'augmentation des poids absolus et relatifs des organes des animaux est un indicateur de la toxicité par les substances toxiques utilisées.

Par ailleurs, le traitement des rats intoxiqués au CCl<sub>4</sub> par l'administration orale de l'EAJP (250 mg/kg de pc) a entraîné une diminution du poids relatif des organes étudiés. Ceci pourrait s'expliquer probablement à la réduction de l'accumulation des radicaux libres induite par les antioxydants présents dans l'EAJP.

Selon les résultats, l'analyse de l'hémogramme montre que l'administration de CCl<sub>4</sub> provoque des perturbations hématologiques par rapport aux témoins. Ces perturbations sont marquées par une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine, de VGM, d'hématocrite et des

plaquettes, et sans effet significatif sur le CCMH. Cela peut révéler clairement une anémie causée par les radicaux libres générés par le CCl<sub>4</sub>.

Récemment, plusieurs travaux ont prouvé que l'exposition à certains xénobiotiques rend les globules rouges très sensibles aux produits oxydants, provoquant une hémolyse sanguine (**Saxena et Flora, 2004 ; Goel et al., 2006; Allagui et al., 2014**). Cette dernière est probablement due aux effets des radicaux libres sur les parois des globules rouges en augmentant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, ayant pour conséquence des dommages membranaires de ceux-ci, expliquant ainsi l'anémie hémolytique. Nos constatations sont en accord avec celles des travaux antérieurs de **Nacoulma et ses collaborateurs (2006)**. En revanche, on a enregistré une augmentation considérable des globules blancs chez les animaux intoxiqués par le CCl<sub>4</sub>. Selon **Teeter et Franciscus (2004)**, le nombre élevé de globules blancs indique que l'organisme lutte contre les dommages causés par la présence des xénobiotiques dans l'organisme. Ce qui confirme l'importance des globules blancs dans la défense immunitaire contre les substances toxiques telles que le CCl<sub>4</sub>. Par ailleurs, le traitement par l'EAJP a révélé l'effet protecteur de cette plante contre l'action néfaste du CCl<sub>4</sub>.

Au regard des résultats obtenus, il en ressort que le CCl<sub>4</sub> entraîne des perturbations des paramètres biochimiques et enzymatiques. En effet, on a enregistré une augmentation très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de l'activité enzymatique de l'ALAT, ASAT, LDH et la PAL chez les rats exposés au CCl<sub>4</sub> par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité de ces enzymes dans le sang peut être due pratiquement à des lésions tissulaires en raison de l'augmentation de la perméabilité membranaire d'où fuient les enzymes membranaires des tissus vers le sang (**Beaudeau et Durand, 2011**).

Le taux des enzymes ASAT et ALAT constituent un indicateur majeur et fiable des lésions hépatocellulaires, telles que la nécrose et l'inflammation. L'élévation de leur activité chez les animaux du lot TC par rapport au T, rend compte de la fuite enzymatique induite par l'altération des membranes cellulaires et intracellulaires des cellules hépatiques induite par le tétrachlorure de carbone.

L'effet toxique du CCl<sub>4</sub> dépend de la dose et de la voie d'administration dont l'injection intrapéritonéale et le gavage représentent les deux voies les plus fréquemment employées en expérimentation animale (**Oberti et al., 2000**). Il exerce son action hépatotoxique à travers le

cytochrome P450 et après sa bioactivation conduisant au radical  $\text{CCl}_3^*$  très réactif puis au radical  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$  encore plus destructeur (Mahli *et al.*, 2015). En effet, sa toxicité est essentiellement due à l'apparition de radicaux libres ou des formes toxiques de l'oxygène qui induisent une peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des membranes cellulaires (Sangare *et al.*, 2012).

Nos résultats concordent avec ceux de Dong et ses collaborateurs (2016), qui ont démontré que l'intoxication des rats avec une dose de 1ml de  $\text{CCl}_4$  par kg de pc, a provoqué l'augmentation de l'activité enzymatique de l'ASAT, ALAT, ALP ainsi que la LDH au niveau du sérum.

La diminution du taux plasmatique de ces enzymes chez les animaux traités par l'EAJP, est un indicateur de la régénérescence du processus de réparation des lésions du tissu hépatique due au  $\text{CCl}_4$  (Mistry *et al.*, 2013). Ces résultats peuvent être comparés avec les données de différents travaux réalisés dans le même contexte (Attia *et al.*, 2012; Thanh *et al.*, 2015).

Les tendances de baisse de taux des enzymes (ASAT, ALAT, ALP et LDH) chez les animaux traités par l'EAJP devraient être prises en compte car la richesse en composés phénolique de cet extrait milite en faveur de son utilisation comme substances hépato-protectrices à activité antitoxique.

Selon Cassettari de Carvalho et ses collaborateurs (2011), les composés phénoliques protègent les systèmes biologiques par divers mécanismes. Sur des systèmes d'hépatocytes isolés en culture, Hikino (1983) a obtenu des résultats positifs contre la cytotoxicité du  $\text{CCl}_4$  en utilisant l'ombelliférone (dérivés coumariniques) et la glycyrrhizine (un saponoside) isolées des écorces d'*Artemisia capillaris*. Quant aux feuilles de *Combretum glutinosum*, elles contiennent des hétérosides flavonoïques, des anthocyanosides (leucocyanidol et leucodelphinidol) et des tanins (acides galliques, ellagiques et féruliques). Les tanins, les flavonoïdes et les anthocyanes sont également des piègeurs de radicaux libres. Ils revêtent de ce fait des potentialités dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Ouattara *et al.*, 2003).

Selon Szafer et ses collaborateurs (2004), l'effet protecteur des composés phénoliques est probablement dû à leur capacité d'inhiber certaines enzymes de la phase I et de stimuler d'autres de la phase II. Des études antérieures ont rapporté l'effet protecteur de certains flavonoïdes, tels que l'hespérétine en inhibant sélectivement les cytochromes P450, réduisant ainsi la métabolisation des composés toxiques (Doostdar *et al.*, 2000).

Selon d'autres auteurs **Surai et Abourashed (2015)**, l'effet hépatoprotecteur des composés naturels peut être attribué à leurs capacités d'inhiber la synthèse de certains médiateurs de l'inflammation, grâce à leurs effets antioxydants.

Dans ce contexte, les travaux de **Aboul-Ela et ses collaborateurs (2005)** menés sur un modèle animal de fibrose hépatique induite par le thioacétamide, montrent une diminution significative des cytokines TNF $\alpha$  et TGF- $\beta_1$  chez des rats ayant reçu l'extrait aqueux des baies de *Juniperus phoenicea* récoltées de Lybie et d'Arabie saoudite. L'effet hépatoprotecteur de l'EAJP peut être expliqué par son effet anti-inflammatoire réduisant ainsi l'effet délétère de la production excessive des deux cytokines pro-inflammatoires, impliquées dans la pathogenèse de la fibrose hépatique.

Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études rapportant une diminution de la concentration de TNF $\alpha$  et TGF- $\beta_1$  en réponse à d'autres antioxydants de synthèse tels que la vitamine E et N l'acétylcystéine (**Parola et al., 1992; Victor et al., 1999**).

Nos résultats sont soutenus par l'étude *in vivo* de **Alqasoumi et ses collaborateurs (2013)**, rapportant l'effet hépatoprotecteur des terpènes et des flavonoïdes isolés de différentes fractions à partir des parties aériennes de *Juniperus phoenicea* récoltées d' Arabie saoudite.

De plus, nous avons enregistré une réduction de la concentration des protéines totales et d'albumine chez les animaux intoxiqués par CCl $_4$ . Cela pourrait être dû à une diminution de la libération des protéines en raison de l'altération de la fonction de synthèse hépatique (**Fizanne et al., 2010**). D'autre part, selon **Mira (2008)**, la diminution d'albumine peut être attribuée, à son pouvoir neutralisant des radicaux libres et des toxines. Vu sa grande quantité, l'albumine peut être considérée comme étant un des antioxydants majeurs du plasma (**Roche et al., 2008; Guerin-Dubourg et al., 2012**). Ses effets antioxydants sont liés à sa conformation biochimique avec de nombreux résidus thiols permettant d'agir comme un puissant capteur de radicaux libres (**Evans, 2002 ; Quinlan et al., 2005; Wong, 2007**); Ce qui en résulte des changements conformationnels et structuraux de la molécule (**Miller et al., 2010**). Plusieurs études *in vitro* ont souligné les propriétés antioxydantes de l'albumine; ainsi, il a été montré que l'albumine exerce une action protectrice en cas de l'exposition aux substances toxiques tels que le CCl $_4$  en limitant le développement des lésions hépatiques (**Quinlan et al., 2005**).

Nous avons enregistré également une augmentation du taux de la bilirubine totale chez les animaux traités par le CCl<sub>4</sub> par rapport aux témoins. La bilirubine est le produit de dégradation final de l'hème. La majorité de l'hème circulant est issue de l'hémoglobine des érythrocytes sénescents (**Zhang, 2011**). En effet, cette accumulation de la bilirubine totale reflète un mauvais fonctionnement du foie et de la vésicule biliaire que l'on peut expliquer par l'altération des mécanismes de biotransformation résultant des métabolites produits par le CCl<sub>4</sub>, ou par une destruction accrue des globules rouges du sang (**Tehoua et al., 2011**). Cette deuxième hypothèse est révélée par l'analyse hématologique indiquant que le CCl<sub>4</sub> diminue le taux d'hémoglobines. En revanche, les résultats obtenus montrent qu'il existe une amélioration des paramètres précédents (protéines totales, albumine et bilirubine) chez les rats intoxiqués au CCl<sub>4</sub> et traités par l'EAJP. Ceci témoigne l'amélioration de la fonction du foie et de la vésicule biliaire.

Il a été démontré que dans toutes les agressions par les xénobiotiques, le métabolisme hépatique des protéines est modifié vers la production des systèmes de défense et vers la néoglucogénèse. Ceci a été constaté dans notre travail dont on a enregistré une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) de la concentration du glucose plasmatique chez les rats traités par le CCl<sub>4</sub>. L'hyperglycémie enregistrée chez les animaux du lot TC pourrait être expliquée par l'accumulation des acides aminés tels que l'alanine et l'acide glutamique résultant de la dégradation des protéines somatiques. Ces acides aminés se transforment sous l'action des aminotransférases en corps cétoniques puis en glucose (néoglucogénèse) (**Saka et al., 2011**). En conséquence, l'hyperglycémie enregistrée confirme le résultat précédent concernant l'élévation des aminotransférases ASAT et ALAT chez les rats traités par le CCl<sub>4</sub>.

Le traitement des rats intoxiqués au CCl<sub>4</sub> par l'EAJP a entraîné une amélioration de la concentration plasmatique de glucose. L'activité hypoglycémisante de l'EAJP peut être attribuée à ses propriétés antioxydantes qui assurent le bon fonctionnement de la machinerie enzymatique intracellulaire en améliorant la glyco-génogénèse favorisant ainsi le stockage de glucose. Nos constatations ont été confirmées par les travaux de **Aboul-Ela et ses collaborateurs (2005)**, en montrant une augmentation de la teneur hépatique en glycogène chez les rats intoxiqués au thioacétamide et traités par l'extrait aqueux des baies de *Juniperus phoenicea*.

D'autres mécanismes peuvent également intervenir dans l'amélioration du taux de glucose ; des études avaient rapporté l'effet hypoglycémiant de composés de type flavonoïde (extraits bruts ou molécules purifiées) sur différents modèles d'étude du diabète (**Coskun et al., 2005**). Plus récemment, il a été montré que les extraits de plantes riches en flavonoïdes auraient des propriétés stimulantes sur la libération d'insuline et serait à l'origine de l'effet hypoglycémiant chez des souris présentant un diabète expérimental (**Sy et al., 2008**). Néanmoins, les travaux de **Aboul-Ela et ses collaborateurs (2005)** suggèrent que l'administration de l'EAJP à une dose de 250mg/Kg de pc chez les rats diabétique à la streptozotocine, induit une augmentation de la biosynthèse du glycogène hépatique sans aucune stimulation de la sécrétion d'insuline.

Le rein est un organe dynamique qui intervient dans le maintien de l'homéostasie du corps. Le tissu rénal peut être affecté par divers médicaments et produits chimiques, y compris les xénobiotiques (**Ajith et al., 2007**).

La néphrotoxicité de CCl<sub>4</sub> a été clairement révélée par l'altération du parenchyme rénal au niveau des coupes histologique et l'augmentation du taux d'urée, créatinine et d'acide urique chez les rats du lot TC par rapport aux témoins. Ces paramètres sont considérés comme des biomarqueurs de la fonction rénale. Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **Ozturk (2003)**, **Ahmed Ali et ses collaborateurs (2010)** ainsi que ceux de **Keshk et Katary (2016)**, qui ont montré que les cellules rénales ne sont plus capables de contrôler le processus d'excrétion urinaire, car les reins sont parmi les organes cibles et les plus sensibles au CCl<sub>4</sub>. L'augmentation du taux d'urée et créatinine peut être expliquée par l'augmentation de la dégradation des composés protéiques en acides aminés puis en urée et créatinine. Ainsi, ces acides aminés formés peuvent se transformer sous l'action des transaminases plasmatiques en composés carboxyliques tels que l'acide pyruvique (**Forêt, 2012**). Ceci implique la forte activité enzymatique de l'ASAT et de l'ALAT chez les rats traités par le CCl<sub>4</sub>. De plus, l'accumulation du pyruvate peut expliquer l'augmentation de la LDH qui catalyse la réduction de ce dernier en lactate (**Boukerche et al., 2007**).

L'hyperuricémie enregistrée chez les rats du lot intoxiqué au CCl<sub>4</sub> peut être expliquée par un excès de dégradation des purines ou un défaut d'élimination urinaire d'acide urique (**El Aissaoui, 2014**).

Par ailleurs, le traitement des rats intoxiqués au CCl<sub>4</sub> par l'EAJP a diminué les taux plasmatiques des paramètres du bilan rénal. Ceci peut être dû à l'effet antioxydant de l'EAJP

qui protège les reins contre l'effet néfaste du  $\text{CCl}_4$  en augmentant ainsi les processus de défense cellulaire vis-à-vis des effets cytotoxiques des radicaux libres. L'effet néphroprotecteur de l'extrait aqueux des feuilles de *Juniperus phoenicea* contre la toxicité induite au  $\text{CCl}_4$  a été rapporté par les travaux de **Ahmed Ali et ses collaborateurs (2010)**. Ces derniers ont constaté une diminution des concentrations sérique d'urée et de créatinine chez les animaux intoxiqués au  $\text{CCl}_4$  par rapport aux témoins.

L'appréciation de l'importance du stress oxydant dans de nombreuses pathologies rend nécessaire l'utilisation de différents dosages dont le plus utilisé est celui du MDA, un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres (**Ben Saad *et al.*, 2017**). Nos résultats montrent une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA) dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les animaux traités par le  $\text{CCl}_4$ . Ceci confirme des dommages oxydatifs tels que la peroxydation des lipides membranaires, en raison de la production de radicaux peroxydes. L'oxydation des acides gras insaturés des phospholipides membranaires est susceptible de déformer la structure des membranes et de provoquer en conséquence sa perméabilité et la mort cellulaire (**Kebièche *et al.*, 2011**). La diminution du taux de MDA chez les animaux du lot CJP par rapport à ceux du lot TC témoigne l'effet de l'EAJP contre la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres.

La cellule dispose pour sa protection le GSH, porteur d'une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la CAT et la SOD (**Saka *et al.*, 2011**). La GPx est la seule séléno-enzyme dans les cellules des mammifères, sa molécule contient quatre atomes de sélénium dans le centre actif sous forme de séléno-cystéine. Elle catalyse les réactions de réduction des peroxydes organiques et inorganiques, en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons, ce qui provoque l'oxydation de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et la production d'alcool primaire non toxique. Les résultats de la présente étude ont montré la présence d'un déséquilibre dans le statut redox cytosolique en faveur des pro-oxydants mettant les cellules des organes (foie, reins, cœur et testicules) des animaux traités par le  $\text{CCl}_4$  dans un état de stress oxydatif. En effet une diminution de la concentration de GSH a

été enregistrée au niveau des organes étudiés (foie, reins, testicules et cœur) chez les animaux du lot TC par rapport aux témoins. Cette baisse de GSH peut être expliquée par sa participation dans les réactions de détoxication des radicaux libres, ce qui provoque une déplétion accrue de sa teneur intracellulaire (**Kebièche et al., 2011**). Cependant, le traitement des rats du lot CJP par l'EAJP a entraîné une augmentation du taux de GSH par rapport aux animaux du lot TC. Autrement dit, l'EAJP possède un effet scavenger, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par le CCl<sub>4</sub> se neutralisent par le GSH, ils vont plutôt être captés par les composés phénoliques en augmentant le taux de glutathion dans les organes étudiés.

L'évaluation biochimique de l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants a mis en évidence une réduction significative de l'activité cytosolique de la GPx dans les organes (foie, reins, cœur et testicules) chez les animaux traités par le CCl<sub>4</sub> comparativement aux témoins. Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs de **Ben Hsouna et ses collaborateurs (2011)**, **Ben Amara et ses collaborateurs (2011)**, **Ganie et ses collaborateurs (2011)**, **Jain et ses collaborateurs (2012)**, **Yang et ses collaborateurs (2013)**, **Klibet et ses collaborateurs (2015)**, effectués sur des rats traités avec le CCl<sub>4</sub>, des métaux lourds (arsenic) et des pesticides (le diméthoate). Ces auteurs ont attribué cette diminution à l'effet du stress oxydatif, aboutissant principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement du sélénium et de GSH. En effet, l'augmentation de la peroxydation lipidique affaiblit aussi bien le fonctionnement des membranes par la baisse de leur fluidité que l'activité des enzymes membranaires et cytoplasmiques (**Ben Saad et al., 2017**).

La GST représentent une importante famille enzymatique dont la fonction est de conjuguer le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles par formation d'un pont thio-éther. Les produits sont ensuite métabolisés en mercapturates puis excrétés dans la bile ou l'urine (**Amiard et Amiard-Triquet, 2008**). Nos résultats montrent une diminution de l'activité de cette enzyme dans les organes (foie et reins) des animaux traités par le CCl<sub>4</sub> par rapport aux témoins. Ces résultats conforment avec ceux obtenus par **Ganie et ses collaborateurs (2011)** ainsi que les travaux de **Adewale et ses collaborateurs (2014)**, qui ont constaté que les glutathions transférases sont impliquées dans la détoxification de nombreux polluants chimiques tels le CCl<sub>4</sub>, les hydrocarbures et les insecticides organochlorés.

Au même moment, le traitement des rats intoxiqués par le CCl<sub>4</sub> et traités par l'EAJP a pu restaurer les activités de ces enzymes dans la plupart des organes étudiés, en empêchant ainsi la perte de l'équilibre redox pro-oxydants/antioxydants constaté chez ces animaux. Il a été démontré que l'effet de certains extraits sur l'activité de la GST peut être expliqué par une augmentation de la transcription du gène codant pour cette enzyme, rapportant que les gènes codant pour les enzymes de la phase II sont fortement induits par les composés antioxydants (**Sotelo-Felix et al., 2002**).

Pour confirmer les données biochimiques, un examen histologique des organes (foie et reins) a été réalisé. L'observation histologique nous a permis de révéler des lésions tissulaires au niveau des organes étudiés. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (**Elgawish et al., 2015**). De nombreuses recherches ont affirmé que les radicaux libres sont capables d'entraîner des modifications chimiques qui altèrent les structures lipidiques, protéiques, glucidiques, ainsi que les nucléotides (**Gauche et Hauswirth, 2006**).

Au niveau du foie, les altérations histologiques chez les animaux traités par le CCl<sub>4</sub> sont indiquées par des nécroses hépatocytaires massives dans la région centrolobulaire, infiltration de cellules inflammatoires, dégénérescence des hépatocytes et une dilatation sinusoidale comparativement aux témoins.

Les changements histopathologiques des hépatocytes ont été signalés par de nombreux auteurs à la suite de l'injection de CCl<sub>4</sub>. Les études de **Shi et ses collaborateurs (1998)** ont rapporté que l'injection de CCl<sub>4</sub> génère des dommages oxydants au niveau des cellules hépatiques aboutissant à la nécrose des hépatocytes dans la région centrolobulaire. Les infiltrats inflammatoires observés sur les coupes de foies des animaux du lot TC représentent des réactions du foie suite à la nécrose hépatocytaire induite par le CCl<sub>4</sub>.

L'examen histologique des reins a montré également une vaste vacuolisation, une dilatation tubulaire et une dégénérescence des glomérules rénaux chez les rats traités au CCl<sub>4</sub> par rapport aux témoins. En revanche, le traitement des rats par l'EAJP a provoqué une réduction significative des lésions hépatiques et rénales par rapport aux animaux du lot TC.

Dans le même ordre d'idées, **Ahmed Ali et ses collaborateurs (2010)**, **Ben Hsouna et ses collaborateurs (2011)** ainsi que **Barkat et ses collaborateurs (2015)** ont constaté l'effet protecteur des extraits de plantes médicinales contre les agents induisant des lésions du tissu hépatique et rénal. Les effets protecteurs de l'EAJP semblent être principalement associés à sa richesse en composés phénoliques, qui sont connues pour leurs effets antioxydants, capables de protéger plusieurs composants cellulaires contre les dommages oxydatifs (**Asif, 2015**).

Le constat tiré de l'observation des résultats de la présente étude est que l'EAJP (250 mg/kg de pc), administré aux animaux intoxiqués par le tétrachlorure de carbone, a maintenu l'équilibre de la balance antioxydant/pro-oxydant des cellules hépatiques et rénales. Cet équilibre est maintenu sous l'effet antioxydant des composés phénoliques contre les radicaux libres générés par le CCl<sub>4</sub>.

La richesse de l'EAJP en composés phénoliques et le pouvoir antiradicalaire de ce dernier sont déjà démontrés dans notre étude phytochimique et dans notre étude *in vitro* avec le DPPH.

Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années, grâce aux thérapeutiques et bienfaits qu'elles procurent.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, il est réalisé sur une plante appartenant à la famille des Cupressaceae: *Juniperus phoenicea*, reconnue par ses vertus thérapeutiques en Algérie.

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des baies de *Juniperus phoenicea*. L'extraction des composés phénoliques nous a permis de calculer le rendement de tous les extraits à savoir: l'EBr, EEt, EAc, EBU, EPQ et ET. L'EBr enregistre le rendement le plus élevé avec une valeur de 31,59 %.

Le dosage des composés phénoliques dans les différents extraits par des méthodes spectrophotométriques révèle la richesse de ces derniers en phénols totaux, flavonoïdes et tanins. De même, l'EA enregistre des teneurs égales à  $38,86 \pm 0,23$ mg EAG/g PS,  $2,09 \pm 0,37$ mg EQ/g PS et  $15,12 \pm 0,70$ mg EC/g PS respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits montre une capacité plus ou moins importante à piéger le radical libre DPPH au seuil de 5 mg/ml. L'EBr, EAc et l'EA représentent les extraits les plus actifs avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2,13, 3,38 et 3,71mg/ml respectivement. En comparaison avec l'acide ascorbique, nos extraits paraissent moins actifs que ce dernier qui enregistre une IC<sub>50</sub> égale à 0,26mg/ml à la concentration de 1mg/ml.

Dans la deuxième partie de ce travail, nos résultats révèlent que l'administration du CCl<sub>4</sub> à la dose de 1ml/kg de pc (v/v dans l'huile d'olive) par injection intrapéritonéale chez les rats mâles adultes pendant 12 jours, a provoqué des perturbations de la plupart des paramètres biochimiques étudiés, à savoir: biomarqueurs hépatiques, rénales et métaboliques, ce qui confirme l'effet hépatotoxique et néphrotoxique de CCl<sub>4</sub>.

En ce qui concerne la croissance corporelle, nos résultats ont montré une diminution significative du poids corporel des animaux traités par le CCl<sub>4</sub> par rapport aux témoins et une augmentation de poids relatif des organes étudiés (foie et reins, cœur et testicules).

L'étude des paramètres hématologiques révèle que l'administration de CCl<sub>4</sub> a provoqué une augmentation des globules blancs et une diminution d'hémoglobine, de plaquettes, du taux d'hématocrite, de VGM et des globules rouges par rapport aux témoins ; ce qui confirme l'installation d'une anémie de type hémolytique.

L'étude de quelques paramètres de stress oxydatif nous a permis de confirmer l'effet pro-oxydant de CCl<sub>4</sub> via l'augmentation de la peroxydation lipidique, la diminution du taux de GSH réduit et la diminution de l'activité enzymatique de la GPx et de la GST au niveau des organes étudiés.

L'étude histologique des organes (foie et reins) montre que le CCl<sub>4</sub> a provoqué des lésions cellulaires et des altérations hépatiques et rénales clairement révélées au niveau des coupes histologiques. Ceci témoigne l'effet cytotoxique de CCl<sub>4</sub> sur ces deux organes.

A travers notre étude, nos résultats montrent que l'administration de l'EAJP (250mg/kg de pc) aux animaux traités par le CCl<sub>4</sub> entraîne l'amélioration de la plupart des paramètres étudiés. Cet effet se manifeste par le maintien de l'équilibre redox malgré l'effet pro-oxydant et cytotoxique de CCl<sub>4</sub>.

Les résultats de cette étude semblent suggérer que l'EAJP a assuré un effet protecteur contre la toxicité hépatique et rénale induite par le CCl<sub>4</sub>, et ceci grâce à sa composition en polyphénols et en flavonoïdes responsables du potentiel antioxydant de cette plante.

Les résultats de notre travail ouvrent d'autres nouvelles voies de recherches scientifiques vers :

- La réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés phénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.
- La confirmation de nos résultats par le dosage d'autres paramètres, citant parmi eux les enzymes de stress oxydatif (Catalase et SOD).
- L'évaluation de l'effet protecteur des composés phénoliques sur des cellules mises en culture «*in vitro*».
- La détermination des composés phénoliques par des méthodes chromatographiques (HPLC).

# Références bibliographiques

**Références bibliographiques**

- **Attia, A.A., ElMazoudy, R.H., El-Shenawy, N.S.** (2012). Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 103 : 87–93.
- **Aboul-Ela, M., El-Shaer, N., Abd El-Azim, T.** (2005). Chemical constituents and hypoglycemic effect of *Juniperus phoenicea* : part I. *Alex.J. Pharm.Sci.* 19(2): 109-117.
- **Aboul-Ela, M., El-Shaer, N., Abd-El-Azim, T.** (2005). Chemical constituents and anti hepatotoxic effect of the berries of *Juniperus phoenicea* Part II. *Natural product sciences*.11 (4): 240-247.
- **Adewale, O.B., Adekeye, A.O., Akintayo, C.O., Onikanni, A., Sabiu, S.** (2014). Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatic damage in experimental Sprague Dawley rats: Antioxidant potential of *Xylopiya aethiopica*. *The Journal of Phytopharmacology*. 3(2): 118-123.
- **Ahmed Ali, S., Zaki Rizk, M., Ali Ibrahim, N., Shafik Abdallah, S., Mohamed Sharara, H., Mohamed Moustafa, M.** (2010). Protective role of *Juniperus phoenicea* and *Cupressus sempervirens* against CCl<sub>4</sub>. *World journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 1(6): 123-131.
- **Aiache, J.M., Beyssac, E., Cardot, J.M., Hoffart, V., Renoux, R.** (2008). *Initiation à la connaissance du médicament*. Elsevier Masson. pp : 36.
- **Ajith, T.A., Nivitha, V., Usha, S.** (2007). Zingiber of *ficinale Roscoe* alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatininduced acute renal failure. *Food Chem Toxicol*. 45: 921–927.
- **Anne, S., Nogaret, E.** (2003). *La phytothérapie*. Ed. Eyrolles. pp: 21-25.
- **Alejandro, F.B., José, F.Q.D.M., Herrador, M.M., Mohamed, A., Ahmed, B., Said, A., et al.** (2004). Oxygenated diterpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *Africana*. *Phytochemistry*. 65: 2507-2515.
- **Alexandre, S.** (1985). *Les forets circumméditerranéennes et ses problèmes*. Ed. Maisonneuve & Larose. pp : 220.
- **Allagui, M.S., Feriani, A., Bouoni, Z., Alimi, H., Murat, J.C., El Feki, A.** (2014). Protective effects of vitamins (C and E) and melatonin co-administration on hematological and hepatic

- functions and oxidative stress in alloxan- induced diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 70 : 713-723.
- **Alqasoumi, S.I., Farraj, A.I., Abdel-Kader, M.S.** (2013). Study of the hepatoprotective effect of *Juniperus phoenicea* constituents. *Pak. J. Pharm. Sci.* 26 (5) : 999-1008.
  - **Amalich, S., Fadili, K., Fahim, M., EL Hilali, F., Zair, T.** (2016). Polyphenols content and antioxidant power of fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L. from Tounfite (Morocco). *J Chem.* 4 (1) : 177-186.
  - **Amiard J.C., Amiard-Triquet, C.** (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier. pp : 23-24.
  - **Amzal, H.** (2010). Etude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de Doctorat. Université de Rabat.
  - Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryana, D.** (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst.* 125 : 989-1009.
  - **Anne, S., Nogaret, E.** (2003). La phytothérapie. Ed. Eyrolles. pp : 21-25.
  - **Arista, M., Ortiz, P.L., Talavera, S.** (1997). Reproductive isolation of two sympatric subspecies of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in southern Spain. *Plant Systematic and Evolution.* 208. 3(4): 225-237.
  - **Ashton Acton, Q.** (2012). Monokines- Advances in research and application. Ed Scholarly. pp: 82.
  - **Asif, M.** (2015). Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chemistry International.* 1 (1) : 35-52.
  - Aschbacher, K.1., O'Donovan, A., Wolkowitz, O.M., Dhabhar, F.S., Su, Y., Epel, E.** (2013). Good stress, bad stress and oxidative stress : insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology.* 38 (9) : 1698-708.
  - **ATSDR.** (2004) Toxicological Profiles for Carbon Tetrachloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.
  - **Auberval, N.** (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.
  - **Azevedo, L., De Lima, P.L.A., Gomes, J.C., Stringheta, P.C., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M.F.** (2007). Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum*

- melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. Food and Chemical Toxicology. 45 : 852–858.
- **Baba, S.A., Malik, S.A.** (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. J Taibah Univ Sci. 9 (4) : 449-454.
  - **Bagard, S., Simon, N.** (2008). Physique chimie. Ed Bréal. pp: 127.
  - **Barkat, L., Boumendjel, A., Saoudi, M., El Feki, A., Messarah, M.** (2015). *Artemisia campestris* leaf aqueous extract alleviates methidathion-induced nephrotoxicity in Rats. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 32 (2): 200-209.
  - **Bauchart, D., Picard, B.** (2010). Ed Quae. pp : 199.
  - **Baudin, B.** (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. Mt cardio. 2 (1) : 43-52.
  - **Beaudeau, J.L., Durand, G.** 2011. Biochimie médicale- Marqueurs actuels et perspectives. Lavoisier. pp : 130-301.
  - **Bellakhder, J.** (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris : Ed Ibis Press. pp : 271-272.
  - **Ben Amara, I., Soudani, N., Hakim, A., Troudi, A., Zeghal, K.M., Boudawara, T et al.** (2011). Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate induced neurotoxicity. Pest Biochem Physiol. 101: 165– 174.
  - **Bettaieb, A., Moujahed, N., Ksouri, R.** (2012). Secondary compounds characterization in some autochthonous species from a Northeastern region of Tunisia. Option Méditerranéennes. 102: 371-374.
  - **Ben Hsouna, A., Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Jaoua, S., et al.** (2011). Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl4 induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. Food Chem Toxicol. 49 (12): 3183-3191.
  - **Ben Saad, H., Kammoun, T., Zeghal, K.H.M., Ben Amara, I., Magné, C., Hakimi, A.** (2017). Effets du selenium sur le stress oxydant au niveau des reins de rats traités par le tebuconazole. J.I. M. Sfax. 27 : 35 – 42.
  - **Bidie, P., N’guessan, B.B., Yapo, F.A, N’guessani, J.D., Djamani, A.J.** (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature. 8 (1): 1 – 11.

- **Boelsterli, U.A.** (2007). Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. CRC Press. pp : 117.
- **Boizot, N., Charpentier, J.P.** (2006). Charpentier Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières. Laboratoire d'Analyses Biochimiques. 79-82.
- **Botineau, M.** (2015). Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques. Lavoisier. pp : 128.
- **Boubekri, C.** (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider – Biskra.
- **Boukerche, S., Aouacheri, W., Saka, S.** (2007). Toxicological effects of nitrate: biological study in human and animal. Ann Biol Clin. 65 (4) : 385-91.
- **Bourgou, S., Serairi B.R., Medini, F., Ksouri, R.** (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d' *Euphorbia helioscopia*. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology. 28 (12) : 1649-1655.
- **Boulaacheb, N., Clement, B., Djellouli, Y., Gharzouli, R., Laouer, H.** (2007). Les plantes médicinales du Djebel Megriss (Algérie, Nord Afrique) : Famille des Lamiaceae. Revue des régions arides. 2 : 550-557.
- **Boust, C.** (2011). Institut national de recherché et de sécurité- Fiche solvants. ED 4223 : 1-8.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebens.Wissenschaft. Tech. 28 : 25-30.
- **Bradford, M.** (1976). Arapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein binding. Anal Biochem. 72 : 248-254.
- **Brooker, C.** (2000). Le corps humain : Etude, structure et fonction. De Boeck Supérieur. pp. 16.
- **Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4<sup>e</sup> Ed). Lavoisier. pp: 307-589.
- **Burtis, A et al.** (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC.
- **Burits, M., Bucar F.** (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother. Res. 14 : 323-328.

- **Cano, N., Bernoud, D., Schneider, S.M., Vasson, M.P., Hasselmann, M., Leverve, X.** (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer Science & Business Media. pp : 254.
- **Cassettari de Carvalho, N., Corrêa-Angeloni, M.J.F., Leffa, D.D., Moreira, J., Nicolau, V., Amaral, P.A, et al.** (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. Genet Mol Biol. 34 (2) : 290-297.
- **Causse, C.** (2004). Les secrets de santé des antioxydants : plus jeune, plus longtemps avec les antioxydants. Ed Alpen. pp : 44.
- **Chemouny, B.** (2012). Soigner le stress par l'homéopathie et la phytothérapie. Odile Jacob. pp: 34.
- **Chèze, C., Vercauteren, J., Verpoorte, R.** (2013). Polyphenols, Wine and Health: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Bordeaux, France, 14th–16th. Springer Science & Business Media. pp : 05.
- **Clos, J.** (2012). L'immunité chez les animaux et les végétaux. Lavoisier. pp : 186.
- **Chetoui, I., Messaoud, C., Boussaid, M., Zaouali, Y.** (2013). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content variation among Tunisian natural populations of *Rhus tripartita* (Ucria) Grande and *Rhus pentaphylla*. Industrial Crops and Products. 51: 171– 177.
- **Collin, S., Crouzet, J.** (2011). Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Lavoisier.
- **Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S.** (2005). Quercetin, flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res. 51: 117–23.
- **Cheriti, A., Rouissat, A., Sekkoum, K., Balansard, G.** (1995). Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie). Fitoterapia. LXVI (6) : 525-53
- **Dananché, B., Févotte, J.** (2009). Éléments techniques sur l'exposition professionnelle à cinq solvants chlorés -Invs. pp : 1-28.
- **Debuigue, G.** (1984). Larousse des plantes qui guérissent. Ed. Larousse. pp : 5-6.
- **Demoly, P., Bousquet, J.** (2002). La rhinite allergique. John Libbey Eurotext. pp : 38.
- **Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C.** (2003). Biochimie pathologique, aspect cellulaire et moléculaire. Flammarion médecine-sciences. pp : 59-81.
- **Dong S., Chen Q.L., Song Y.N., Sun Y., Wei B., Li X.Y., et al.** (2016). Mechanisms of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. J Toxicol Sci. 41(4) : 561-72.

- **Doostdar, H., Burke, D., Mayer, R.T.** (2000). Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*. 144 : 31–38.
- **Doumas, B.T.** (1971). *Clin Chem, Acta*. 31 : 87-96.
- **Dubois, B.** (2015). Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique. Thèse de doctorat. Université de Claude - Bernard - Lyon I.
- **Dufresne, C.** (2000). Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. International labour organisation. pp : 332- 333.
- **Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., Lemhadri, A.** (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*. 5 : 194-203.
- **El Aissaoui, M.** (2014). L'hyperuricémie dans l'insuffisance cardiaque : prévalence, physiopathologie et implications cliniques. Thèse de Doctorat en médecine. Université Paris Descartes.
- **Elgawish, R.A.R., Abdel Rahman, H.G., Abdelrazek, H.M.A.** (2015). Green tea extract attenuates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury in male hamsters via inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis. *Toxicology Reports*. 2 : 1149-1156.
- **Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G.** (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med*. 13 : 341.
- **Evans, T.W.** (2002). Review article: albumin as a drug–biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*. 16 : 6-11.
- **Favier, A.** (2006). Oxidative stress in human diseases. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 (6) : 390-396.
- **Feknous, S., Saidi, F., Mohamed, S.R.** (2014). Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L). *Nature & Technologie*. 11 : 07-13.
- **Frei, B., Stocher, R., Angletterre, I., Ames, B.N.** (1990). Ascorbate : Antioxydant le plus efficace dans le plasma sanguine humain. *Exp. Médi. D 'Adv*. 264 : 63-155.
- **Fizanne, L., Oberti Beneficial, F.** (2010). Effects of albumin on vascular dysfunction during cirrhosis: antioxidant action. *Hépatogastro et Oncologie digestive*. 17 (6) : 503-508.
- **Flohe, L., Gunzler, W.A.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105 : 114–121.
- **Fossati, P et al.** (1980). *Clin Chem*. 26 : 227-231.
- **Forêt, R.** (2012). *Dico de Bio. De Boeck Supérieur*. pp : 331.

- **Garnier, J.P., Le Moel, G., Beaudoux, J.L.** (2005). Actualité en pharmacie et biologie clinique, pathologie cardiaques et vasculaires. John Libbey. Eurotext. pp : 86.
- **Ganie, S.A., Haq, E., Hamid, A., Qurishi, Y., Mahmood, Z., Zargar, B.A, et al.** (2011). Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. doi: 10.1186/1472-6882-11-17.
- **Garcia-Perez, M.E.** (2008). Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : Etude de leur capacité antioxydante. Thèse de doctorat. Université Laval-Québec.
- **Garait, B.** (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier.
- **Gauche, E., Hausswirth, C.** (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. Science & Motricité. (2) 58 : 43-66.
- **Gazengel J.M., Orecchioni, A.M.** (2013). Le préparateur en pharmacie- Guide théorique et pratique. Lavoisier. pp : 1038- 1176.
- **Gendler S. Uric acid. Kaplan A et al.** (1984). Clin Chem. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1268-1273 and 425.
- **Germosén-Robineau, L., Weniger, B., Carballo, A., Lagos-Witte, S.** (1999). Pharmacopée caribéenne. Ed. IRD. pp : 264.
- **Goel, A., Dani, V., Dhawan, D.K.** (2006). Role of zinc in mitigating the toxic effects of chlorpyrifos on hematological alterations and electron microscopic observations in rat blood. Bio Metals. 19 : 483–492.
- **Goetz, P.** (2004). Plaidoyer pour la tisane médicinale. Phytothérapie. 1: 8-15.
- **Guerin-Dubourg, A., Catan, A., Bourdon, E., Rondeau, P.** (2012). Structural modifications of human albumin in diabetes. Diabetes & Metabolism. 38 : 171-178.
- **Guerre, P., Bailly, J.D., Benard, G., Burgat, V.** (2000). Excrétion lactée des mycotoxines : quels risques pour le consommateur ?. Revue Méd. Vét. 151 (1) : 7-22.
- **Guillaume, J.** (1999). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Ed Quea. pp : 372.
- **Gupta, R.C.** (2011). Reproductive and developmental toxicology. Academic Press. pp : 304.
- **Gutowski, M., Kowalczyk, S.** (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. Acta Biochimica Polonica. 60 (1) : 1–16.
- **Ghedira, K.** (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. 3(4) : 162-169.

- **Habbout, A.** (2012). Etude des conséquences métaboliques, oxydatives et cardiovasculaires de la suralimentation postnatale chez le rat et la souris. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.
- **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacobi, W.B.** (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.* 249 : 7130-7139.
- **Hould, R.** (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine. pp : 19-21, 225-227.
- **Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi M.** (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry.* 105: 1126-1134.
- **Hébuterne, X., Alix, A., Raynaud- Simon, A., Vellas, B.** (2009). Traité de nutrition de la personne âgée : Nourrir l'homme malade. Springer Science & Business Media. pp : 8.
- **Henanei, I., Tlili, I., R'him, T., Ben Ali, A., Jebari, H.** (2015). Effet du stade de maturité sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante hydrophilique chez des variétés locales de melon (*Cucumis melo* L.) cultivées en Tunisie. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology.* 22 (2) : 1002-1006.
- **Hikino H.** (1983). Antihepatotoxic principles in oriental medicinal plants in natural products drug development. *Proceedings of the Alfred Benzon 20 th symposium.* Ed. Munksgaard, Copenhagen : 375-390.
- **Hopkins, W.G.** (2003). *Physiologie végétale.* De Boeck Supérieur. pp : 280-284.
- **Hugues, B.** (2001). *Sorcellerie en Auvergne.* Ed. Borée. pp : 111-117.
- **IARC.** (1982). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans.* Supplément 4. Lyon : Centre international de recherche sur le cancer : 74-75.
- **Ineris.** (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Tétrachlorure de carbone. Version n° 2-1. pp : 3-52.
- **Iserin, P.** (2001). *Larousse Encyclopédie des plantes médicinales.* Ed. Larousse. pp : 10-17.
- **Jean, C.** (2012). *Guide de sous traitance des traitements de surface et de la peinture industrielle.* Lavoisier. pp : 52-56.
- **Jacques, B.** (2000). *Larousse des arbres et des arbustes.* Ed. Larousse. pp : 231.
- **Jacqueline, L., James, V.** (1980). Hepatic microsomal lipid damage induced by carbon tetrachloride. University of California. San Francisco. pp : 67.

- **Jadot, G.** (1994). Antioxydants et vieillissement. John Libbey Eurotext. pp : 38.
- **Jain, S., Jain, D.K., Balekar, N.** (2012). *In-vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of *Mentha pulegium* leaf against CCl<sub>4</sub> induced toxicity in rats. Asian Pac J Trop Biomed. 2(2): S737-S740.
- **Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Jana, M.** (1999). Etude de la toxicité aigüe de dix plantes marocaines réputées hypoglycémiantes. Thérapie. 54: 701-706.
- **Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.H., Journet, M.** (1995). Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Ed Quae. pp : 56-58.
- **Joel, R.** (2002). La flore du pharmacien. Ed. Tec & Doc. pp : 115.
- **Joseph, J.A., Radhakrishnan, U., Mutyala, S., Goudar, K.S., Ayyappan, U.P., Agarwal, A.** (2015). Antioxidant and protective effects of Phytocee (™) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress. J Nat Sci Biol Med. 6 (1) : 183-7.
- **Julkunen-Tiitto, R.** (1985). Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. J Agric Food Chem. 33 (2) : 213-217.
- **Kabaissi, H.** (2002). Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Maison du livre pédagogique Beirout (liban). pp : 228.
- **Kaplan A.** (1984). Urea. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton : 1257-1260 and 437 and 418.
- **Kaplan, A et al.** (1984). Bilirubin. Clin Chem. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1238-1241. 436 and 650.
- **Kaplan, L.A. Glucose. Kaplan A et al.** (1984). Clin Chem. The C.V. Mosby Co. St Louis.
- **Karadeniz, A., Yildirim, A., Karakoc, A., Kalkan, Y., Celebi, F.** (2009). Protective effect of *Panax ginseng* on carbon tetrachloride induced liver, heart and kidney injury in rats. Revue Méd. Vét.160 (5) : 237-243.
- **Karthikeyan, R., Anantharaman, P., Chidambaram, N., Balasubramanian, T., Somasundaram, S.T.** (2012). *Padina boergessenii* ameliorates carbon tetrachloride induced nephrotoxicity in Wistar rats. Journal of King Saud University – Science. 24 : 227–232.
- **Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R.** (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. Phytothérapie. 9 (5) : 274–282.

- **Keshk, W.A., Katary, M.A.** (2016). Transforming Growth Factor b1/Smad3 Signaling and Redox Status in Experimentally Induced Nephrotoxicity: Impact of Carnosine. *Ind J Clin Biochem.* DOI 10.1007/s12291-016-0564-y.
- **Kintz, P.** (1998). Toxicologie et pharmacologie médicolégales. Elsevier Masson. pp : 50-55.
- **Klibet, F., Boumendjel, A., Khiari, M., El Feki, A., Abdennour, C., Messarah, M.** (2016). Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite : alleviation by *Pistacia lentiscus* oil. *Pharm Biol.* 54 (2) : 1-10.
- **Koller, A. Kaplan A et al. Total serum protein.** (1984). *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Torondo. Princeton* : 1316-1324 and 418.
- **Kpètèhoto, W.H., Hessou, S., Dougnon, V.T., Johnson, R.C., Boni, G., Houéto, E.E., et al.** (2017). Étude ethnobotanique, phytochimique et écotoxicologique de *Ocimum gratissimum* Linn (Lamiaceae) à Cotonou. *Journal of Applied Biosciences.* 109 : 10609-10617.
- **Krief, S.** (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Museum national d'histoire naturelle- MNHN Paris.
- **Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleih, B., Loirand, G., Pinet, F., Samuel, J.L.** (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext, Paris. pp. 310-325.
- **Ladoh Yemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo Mpondo, et al.** (2014). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences.* 84 : 7636– 7643.
- **Le Floch, E.** (1983). Contribution a une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Ed. Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.
- **Lehucher-Michel, MP., Lesgards, J.F, Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M.** (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. Bilan et perspectives préventives. Catalogue et Index des sites médicaux de langues française. 21(30) : 1076-81.
- **Lin, X., Zhang, S., Huang, Q., Wei, L., Zheng, L., Chen, Z., et al.** (2012). Protective effect of Fufang-Liu-Yue-Qing, a traditional Chinese herbal formula, on CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 142 : 548–556.
- **Lodovici, M.1., Bigagli, E.** (2011). Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol.* Doi : 10.1155/2011/487074.

- **Londhe, J.S., Devasagayam, T.P.A., Foo, L.Y., Ghaskadbi, S.S.** (2008). Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* Linn. Redox Report. 13 (5) : 199- 207.
- **Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A., Brink, M.** (2004). Ressources végétales de l’Afrique tropicales. 7(1) : 364.
- **Mahli, A., Koch, A., Czech, B., Peterburs, P., Lechner, A., Haunschild, J., et al.** (2015). Hepatoprotective effect of oral application of a silymarin extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Clinical Phytoscience. 1 : (5). DOI 10.1186/s40816-015-0006-z.
- **Malloy, H.T. et al.** (1937). The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem. 112 (2) : 481-491.
- **Mann, M.I.** (1962). Méthodes artisanales de tannage. Food & Agriculture. Org. pp : 53.
- **Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., El Ghadraoui, L, Aafi, A.** (2011). Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. lycia et *Juniperus phoenicea* ssp. turbinata du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15 (3) : 415-424.
- **Marie, M.** (2001). Le préparateur en pharmacie (botanique, pharmacognosie, phytothérapie, homéopathie). Ed. Tech & Doc. pp : 100-102.
- **Marieb, E., Hoehn, K.** (2014). Anatomie et physiologie humaines. Pearson Education France. pp : 100.
- **Markham, K.R.** (1982). Technics of flavonoids identification. Academic Press, 1982.
- **Maurice, S.** (2012). Chimie bioorganique. Lavoisier. pp : 125.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. pp : Vii- 07.
- **Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi, A.** (2013). Etude de l'activité Antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. Lebanese Science Journal. 14 (1) : 49-60.
- **Mégarbane, B., Deye, N., Baud, F.** (2007). Toxic hepatitis: Mechanisms of toxicity and specific pharmacological agents. Réanimation. 16 : 632-642.
- **Mhirit, O., Blérot, P.** (1999). Le grand livre de la forêt marocaine. Ed Mardaga. pp : 79.

- **Mihai, C.M., Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Bărnuțiu, L.** (2011). Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of Propolis from Transylvania. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. 44 (2): 100-103.
- **Miller W.G., Bruns D.E., Hortin G.L., Sandberg S., Aakre K.M., Queen M.J, et al.** (2010). Données actuelles sur le dosage de l'excrétion urinaire de l'albumine. *Ann Biol Clin* 68 (1) : 9-25.
- **Mira, J.P.** (2008). L'albumine endogène : un pouvoir anti-oxydant majeur. *Réanimation*. Hors série. 3 : 7-9.
- **Mistry, S., K.R, Dutt., Jena, J.** (2013). Protective effect of *Sida cordata* leaf extract against CCl4 induced acute liver toxicity in rats. *Asian Pac J Trop Med*. 6 (4) : 280-284.
- **Mohamed, B., Hassane, M.O., Abdelkhaleq, L., Abderrahim, Z.** (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metabolism*. 10 : 33-50.
- **Moussard, M.** (2006). Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur. pp : 336.
- **Murray, R.L. Creatinine. Kaplan A et al.** (1984). *Clin Chem*. The C. V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton: 1261-1266 and 418.
- **Murray, R.** (1984). Aspartate aminotransférase. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co*. St Louis. Toronto. Princeton : 1112-1116.
- **Murray R.** (1984). Alanine aminotransférase. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co*. St Louis. Toronto. Princeton : 1088-1090.
- **Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira J.A.** (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. 83 (15) : 173-179.
- **Nacoulma, E.W.C., Sawadogo, D., Sakandé, J., Mansour, A., Hien, F.H., Sangaré, A., et al.** (2006). Influence du taux d'hémoglobine foetale (HbF) sur le stress oxydant chez le drépanocytaire homozygote vivant à Abidjan, Côte-d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*. 99 (4) : 241-244.
- **Oberti, F., Vuillemin, E., Fort, J., Calès, P.** (2000). Modèles expérimentaux d'hypertension portale. *Gastroenterol Clin Biol*. 24 : 896-901.
- **Ouattara Y., Sakandé B., Simporé J., Issiaka Z. K., Guissou I.P., Sawadogol, L.** (2003). Evaluation de l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux de plantes médicinales face à une hépatotoxicité létale induite chez la souris. *Annales de l'Université de Ouagadougou - Série C*. 001 : 16- 40.

- **Ozturk, F., Ucar, M., Ozturk, I.C., Vardi, N., Batcioglu, K.** (2003). Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology*. 62 (2) : 353-6.
- **Parola, M., Leonarduzzi, G., Biasi F.** (1992). Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*. 16 : 1014-1021.
- **Paschal, A.** (2006). Diabète et médecine traditionnelle. *Diabetes voice*. 51 (3) : 24-26.
- **Paul, F.** (1999). Plantes médicinales. Ed. *CMH SNHF*. pp : 240.
- **Paul, I.** (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. *Larousse*. pp : 10-31.
- **Pesce, A.** (1984). Lactate dehydrogenase. *Clin. Chem.* Toronto. Princeton. 1124-117.
- **Poisson, C.** (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de Doctorat. Université de Paris-Sud 11.
- **Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4 : 25-39.
- **Quevauviller, P.** (2010). Protection des eaux souterraines : législation européenne et avancées scientifiques. Lavoisier. pp : 19.
- **Quinlan, G.J., Martin, G.S., Evans, T.W.** (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 41 : 1211-9.
- **Quezel, P., Gast, M.** (2017). Genévrier. *Encyclopédie berbère* 20 : 1-7.
- **Rai, K.** (2012). Protective effect of *Launaea procumbens* (L.) on lungs against CCl<sub>4</sub>-induced pulmonary damages in rat. *BMC Complement Altern Med*. doi: 10.1186/1472-6882-12-133. Toronto. Princeton: 1032-1036.
- **Raj, B., Singh, S.D.J., Samual, V.J., John, S., Siddiqua, A.** (2013). Hepatoprotective and antioxidant activity of *Cassythia filiformis* against CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in rats. *J Pharm Res*. 7 : 15-19.
- **Ramade, F.** (2011). Introduction à l'écochimie : Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. Lavoisier. pp : 199.
- **Ranjbar, A., Sharifzadeh, M., Karimi, J., Tavailani, H., Baeri, M., Heidary, S.T., Abdollahi, M.** (2014). Propofol Attenuates Toxic Oxidative Stress by CCl<sub>4</sub> in Liver mitochondria and Blood in Rat. *Iran J Pharm Res*. Winter. 13 (1) : 253-62.

- **Rashid Khan, M., Siddique, F.** (2012). Antioxidant effects of *Citharexylum spinosum* in CCl<sub>4</sub> induced nephrotoxicity in rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64: 349– 355.
- **Reitman, S., Frankel, S.J.** (1957). *Clin Path* : 28-56.
- **Russo-Marie, F.** (1998). L'inflammation. John Libbey Eurotext.pp : 560.
- **Revuz, J.** (2009). *Traité EMC : Cosmétologie et dermatologie esthétique*. Elsevier Masson. pp : 2.
- **Richter, G.** (1993). *Métabolisme des Végétaux – Physiologie et Biochimie*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Ed. Lausanne. pp : viii.
- **Rilauwerys, R., Haufroid, V., Hoet, P., Lison D.** (2007). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Masson Elsevier. pp : 44.
- **Roberfroid M.B., Coxam V., Delzenne, N.** (2008). *Aliments fonctionnels*. Lavoisier. pp : 240.
- **Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E.** (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *Letters*. 582 : 1783-1787.
- **Rolfe, D.F, Brown, G.C.** (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physio Rev*. 77 (3) : 731-58.
- **Rondeau, P.** (2009). *Stress oxydant et glycation : relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique*. Thèse de Doctorat. Université de la Réunion.
- **Rosalki S et al.** 1993. *Clin Chem* ; 39(4) : 648-652.
- **Sahreen, S.1., Khan, M.R., Khan, R.A., Alkreathy, H.M.** (2014). Cardioprotective role of leaves extracts of *Carissa opaca* against CCl<sub>4</sub> induced toxicity in rats. *BMC Res Notes*. Doi : 10.1186/1756-0500-7-224.
- **Saka, S., Bahi, A., Aouacheri, W.** (2011). The effect of oxidative stress induced by lead acetate on the glutathione enzymatic system in rats. *Ann Toxicol Anal*. 23 (3) : 139-145.
- **Salerno, L., Modica, M.N., Pittalà, V., Romeo, G., Siracusa, M.A., Giacomo, C.D, et al.** (2014). Antioxidant activity and phenolic content of Microwave Assisted *Solanum melongena* extracts : 1-6.
- **Sangare, M.M., Bayala, B., Ategbo, J.M., Loko, F., Dramane, K.L.** (2012). Effets de l'extrait aqueux de *Gomphrena celosioides* (amaranthaceae) sur les enzymes hépatiques. *Afrique Science*. 08 (3) : 107 – 115.

- **Saxena, G., Flora, S.J.S.** (2004). Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 18 (4) : 221–233.
- **Schauenberg, P.** (1977). Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation des plantes médicinales. Ed. Delachaux & Niestlé. pp : 11-16.
- **Schultz, A., Kaplan A et al. Uric acid.** (1984). Clin Chem. The C.V Mosby Co. St Louis.
- **Sekli-Belaidi, F.** (2011). Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- **Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y., Wake, K.** (1998). Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol.* 153 (2) : 515-25.
- **Siriwardena, A.K.** (2014). Reappraisal of xenobiotic- induced, oxidative stress-mediated cellular injury in chronic pancreatitis: A systematic review. *World J Gastroenterol.* 20 (11) : 3033–3043.
- **Soares, A.F.** (2005). Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon.
- **Sotelo-Félix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santilla, R.L., Castillo, D., Yahuaca, P.** (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinu officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol.* 81(2) : 145-154.
- **Stora, D.** (2013). Pharmacologie et thérapeutique 2 ème édition. Initiatives Sante.
- **Sun, T., Powers, J.R., Tang, J.** (2007). Evaluation of the antioxidant activity of *Asparagus broccoli* and their juices. *Food Chem.* 105: 101-106.
- **Surai P.F., Abourashed E.** (2015). Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants (Basel).* 4 (1) : 204-247.
- **Sy, G., Barbosa, F.S., Wele, A., Gueye, P.M., Gueye, C.D., Cisse, A, et al.** (2008). Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines. 15 : 6 – 10.
- **Szaefer, H., Cichocki ,M., Brauze, D., Baer-Dubowska, W.** (2004). Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr Cancer.* 48 : 70–77.

- **Tahar, D., Dahmane, D.** (2008). Chemical composition of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. from Algeria. *Journal of essential oil research*. 20 (1) : 15-20.
- **Teeter, T., Franciscus, A.** (2004). Comment interpréter un rapport de laboratoire : notions élémentaires. HCSP Publications., [www.hcvadvo.org](http://www.hcvadvo.org). 28- 07- 2010.
- **Tehoua, L., Datté, Y.J., Offoumou, A.M.** (2011). Alcoolisation chronique des rats (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar à une eau-de-vie traditionnelle produit en Côte d'Ivoire (Koutoukou). *Journal of Applied Biosciences*. 41 : 2772 - 2779.
- **Thanh, T.B., Thanh, H.N., Thi Minh, H.P., Le-Thi-Thu, H., Thi Ly, H.D., Duc, V.L.** (2015). Protective effect of *Tetracera scandens* L. leaf extract against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5 (3) : 221-227.
- **Thiebault, C.M., Sprumont, P.** (1997). L'enfant et le sport : Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. De Boeck Supérieur. pp : 145.
- **Thitimuta S., Pithayanukul P., Nithitanakool S., Bavovada R., Leanpolchareanchai J., et al.** (2017). *Camellia sinensis* L. Extract and Its Potential Beneficial Effects in Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Hepatotoxic, and Anti-Tyrosinase Activities. *Molécules*. 4 : 22 (3). Doi : 10.3390/molecules22030401.
- **Thivolet, J., Claudy, A.** (1999). Progrès en dermato-allergologie. John libbey Eurotext.
- **Tortora, G.J., Derrickson, B.** (2017). Manuel d'anatomie et de physiologie humaines. De Boeck Supérieur. pp : 609.
- **Trachte, S.** (2012). Matériau, matière d'architecture soutenable : Choix responsable des matériaux de construction, pour une conception globale de l'architecture soutenable. Presses Univ. pp : 168.
- **Trinder, P.** (1969). *Ann Clin Biochem*. 6 : 24-33.
- **UVMT.** (2002). Université virtuelle de médecine de travail. Tétrachlorure de carbone.
- **Vazquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M.S., Gonzalez A.J., Antorrena, G.** (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*. 28 (3) : 279-285.
- **Verschuere, S., De Smet, R., Allais, L., Cuvelier, C.A.** (2012). The effect of smoking on intestinal inflammation: What can be learned from animal models? *J Crohns Colitis*. 6 (1) :1-12.
- **Viala, A., Botta, A.** (2005). Toxicologie. Lavoisier. pp : 72-555.
- **Victor, V.M., Guayerbas, N., Garrote, D.** (1999). Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors*. 10 : 347- 367.

- **Wassan, M., Arrack, H., Arrack, J.K.** (2014). Protective Role of *Pomegranate Peel* Extract on Testis in Adult Male Rabbits Treated with Carbon Tetrachloride. *The Iraqi journal of Veterinary Medicine*. 38 (1) : 74 – 82.
- **Waterman P.G., Mole. S.** (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- **Weckbeker, G., Cory, J.G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathion–depleted mouse leukemia L 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters*. 40 : 257-264.
- **Wenger, C.** (1984). *Alkaline phosphatase*. Clin. Chem. Toronto. Princeton.1094-1098.
- **Wong, F.** (2007). Drug insight: the role of albumin in the management of chronic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 4 : 43-51.
- **Woodward, A., Reed, J.D.** (1989). Bulletin du CIPEA n° 35. Centre international pour l'élevage en Afrique. ILRI (aka ILCA and ILRAD). pp : 3.
- **Wu, T., Li, J., Li, Y., Song, H.** (2017). Antioxidant and Hepatoprotective Effect of Swertiamarin on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity via the Nrf2/HO-1 Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 41(6) : 2242-2254.
- **Yang, C.C., Fang, J.Y., Hong, T.L., Wang, T.C., Zhou, Y.E., Lin, T.C.** (2013). Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Int Immunopharmacol*. 15(1) : 106-113.
- **Yang, H., Sung, S.H., Kim, Y.C.** (2015). The ethanolic extract of *Juglans sinensis* leaves and twigs attenuates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic oxidative stress in rats. *Pharmacogn Mag*. 11 (43) : 533-539.
- **Yurt, B., Celik, I.** (2011). Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 49 : 508–513.
- **Zydzorczyk, C.** (2011). Rôle du stress oxydant en période néonatale dans l'hypertension artérielle et la dysfonction vasculaire et métabolique de l'adulte. Thèse en vue de l'obtention du grade de PhD en Sciences Biomédicales. Université de la Montréal.
- **Zhang, L.I.** (2011). *Heme Biology: The secret life of heme in regulating diverse biological processes*. World Scientific. pp: 19.

## Références bibliographiques

- **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.** (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 (4) : 555-559.
- **Zimmerman, H.J.** (1999). *Hepatotoxicity : The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver.* Lippincott Williams & Wilkins. pp: 375-410.

# Annexes

## Annexe 1

## 1.1. Courbe d'étalonnage des polyphénols

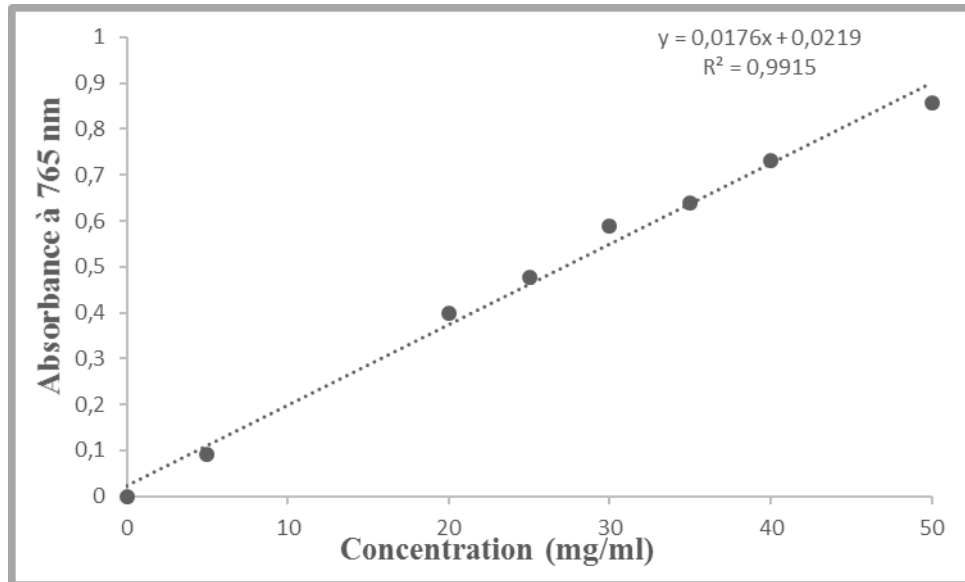


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

## 1.2. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

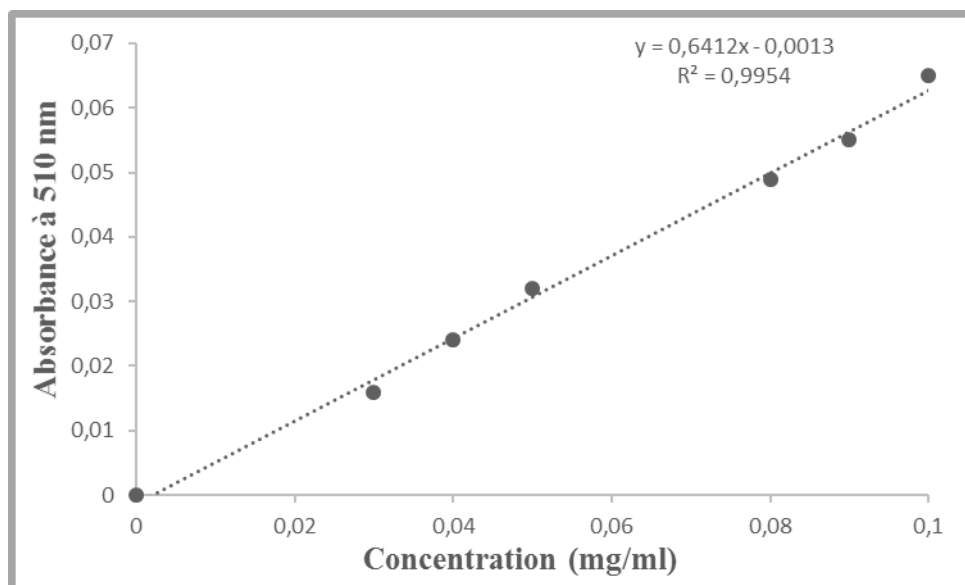


Figure 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

### 1.3. Courbe d'étalonnage des tannins

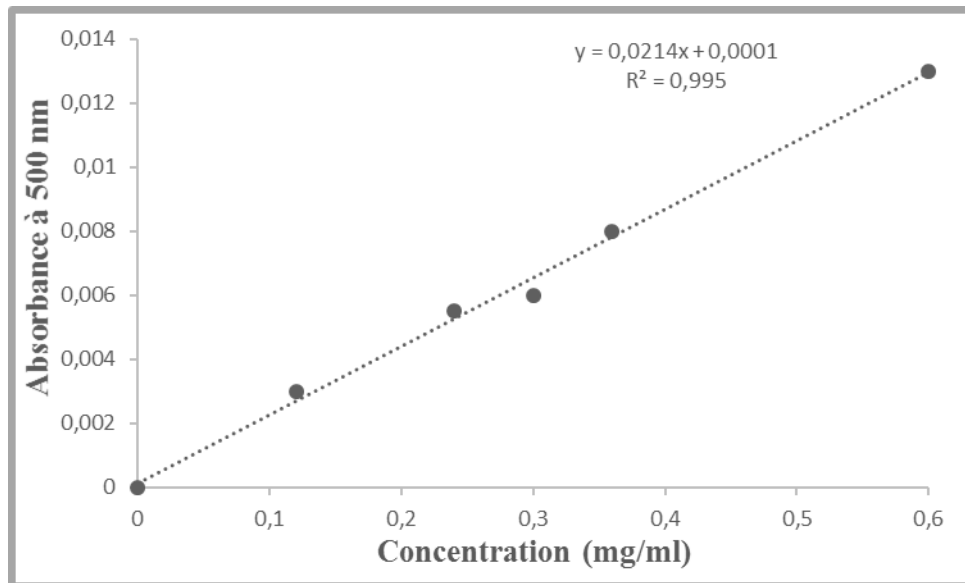


Figure 3. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins

### 1.4. Courbe d'étalonnage des protéines

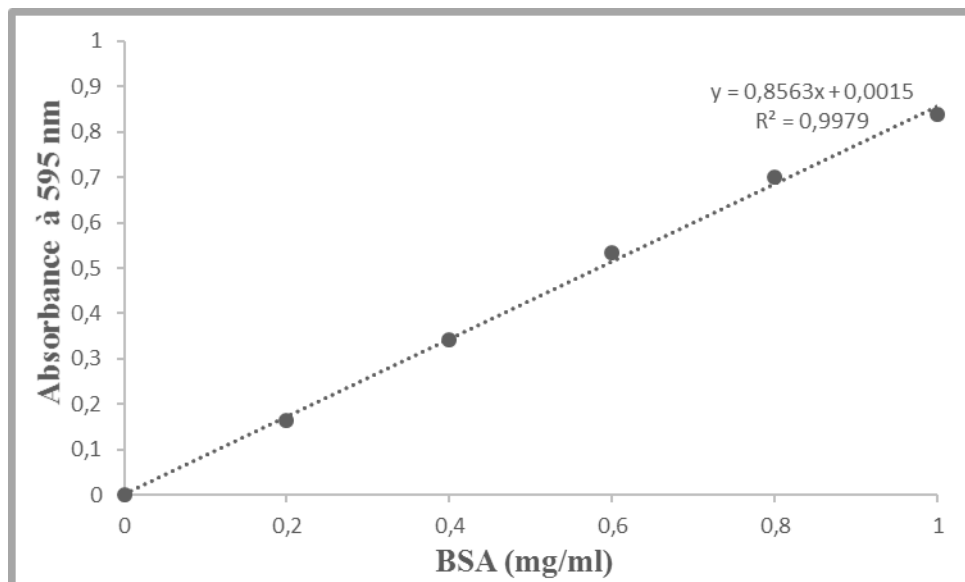


Figure 4. Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin (mg/ml).

## Annexe 2

### 2.1. Activité de l' aspartate aminotransférase (ASAT/TGO)

#### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	TRIS pH 7,8 L- Aspartate	80 mmol/L 200 mmol/L
R2 Substrat	NADH Lactate déshydrogenase (LDH) Malate déshydrogenase (MDH) $\alpha$ -cétoglutarate	0,18 mmol/L 800 U/L 600 U/L 12 mmol/L

#### • Préparation du réactif de travail

Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2 - 8°C ou 72 heures à 15-25°C.

#### • Mode opératoire

Réactif (ml)	1,0
Échantillon ( $\mu$ l)	100

Mélanger, incuber les tubes préparés pendant 1 min à la température de 37°C et lire l'absorbance (A) à 340 nm, avec trios répétitions (chaque 1 min d'incubation).

#### • Calcul

$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

Où  $\Delta A$  c'est la valeur moyenne des trois lectures.

## 2.2. Activité de l'alanine Aminotransférase (ALAT/TGP)

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	TRIS pH 7,8 L- Alanine	100 mmol/L 500 mmol/L
R2 Substrat	NADH Lactate déshydrogenase (LDH) Oxoglutarate	0,18 mmol/L 1200 U/L 15 mmol/L

### • Préparation du réactif de travail (RL)

Dissoudre le contenant de R2 dans le flacon R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2 - 8°C.

### • Mode opératoire

Réactif (ml)	1,0
Échantillon (µl)	100

Mélanger, incuber les tubes préparés pendant 1 min à la température utilisée pour l'essai et lire l'absorbance (A) à 340 nm, avec trios répétitions (chaque 1 min d'incubation).

### • Calcul

$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

Où  $\Delta A$  c'est la valeur moyenne des trois lectures

### 2.3. Dosage des protéines totales

- Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R du Biuret	Tartrate de sodium potassium	15 mmol/L
	Iodide de sodium	100 mmol/L
	Iodide de potassium	5 mmol/L
	Sulfate de cuivre	19 mmol/L
Calibrant des protéines totales	Solution standard de sérum albumine bovine	7 g/dl

Le réactif est prêt à l'utilisation.

- Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25

Mélanger, et incuber pendant 5 minutes à 37°C ou 10 min à (15- 25°C). On lit la densité optique « DO » des échantillons et du standard contre le blanc à 540 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

- Calcul

$$\text{Protéines (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 7 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

## 2.4. Dosage d'albumine

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif 1	Vert de bromocrésol Tompon succinate PH 4,2 Brige 35	0,14 g/L 75 mmol/L 7 ml/L
Calibrant	Sérum albumine bovine (standard)	50 g/L

Le réactif est prêt à l'utilisation.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	5,0	5,0	5,0
Étalon (µl)	-	20	-
Échantillon (µl)	-	-	20

Mélanger, et incuber pendant 5 minutes à 37°C. On lit la densité optique « DO » des échantillons et du standard contre le blanc à 630 nm. La coloration est stable pendant 1 heure à température ambiante.

### • Calcul

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (50g/l)}$$

## 2. 5. Dosage de la bilirubine totale

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif 1 : Bilirubine totale	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique	50 mmol/L
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mmol/L
Réactif 2	Nitrite de sodium	29 mmol/L.
Calibrant	Il est sous la référence :	1002250

Les réactifs sont prêts à l'utilisation.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon
Réactif 1 : BL totale (ml)	1,5	1,5
Réactif 2 : (µl)	-	50
Échantillon/Calibrant(µl)	100	100

Mélanger et lire la densité optique après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde 555 nm.

### • Calcul

La concentration de la bilirubine est calculée par la formule suivante :

$$\text{Bilirubine totale (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échant}}{\text{DO calibrant} - \text{DO blanc calibrant}} \times \text{Concentration de calibrant}$$

## 2.6. Dosage d'urée

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	TRIS pH 7,8 $\alpha$ - cétoglutarate	80 mmol/L 6 mmol/L
R2 Enzymes	Uréase Glutamate déshydrogénase (GLDH) NADH	3750 U/L 6000 U/L 0,32 mmol/L
Calibrant d'urée	Solution standard d'Urée	50 mg/dl

### • Préparation du réactif de travail

Dissoudre le contenu de R2 dans le flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable 6 semaines à 2 - 8°C ou 7 jours à 15-25°C.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon ( $\mu$ l)	-	10	-
Échantillon ( $\mu$ l)	-	-	10

Mélanger et lire la densité optique « DO » des échantillons à 340 nm (A1) après 30 seconde et (A2) après 90 seconde de l'incubation, puis on fait le calcul :  $\Delta A = A1 - A2$

### • Calcul

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{(\Delta A) \text{ échantillon}}{(\Delta A) \text{ étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

## 2.7. Dosage de créatinine

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mmol/L
R2 Réactif Alcaline	Hydroxyde de sodium	0,29 mol/L
Calibrant de Créatinine	Solution standard de créatinine	2 mg/dl

### • Préparation du réactif de travail

Mélanger un volume de R1 dans un même volume de R2. Ce réactif est stabilisé 10 jours à 15 - 25°C.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	100	-
Échantillon (µl)	-	-	100

Mélanger et lire la densité optique « DO » des échantillons et du standard à 492 nm après 30 secondes (A1) et 90 secondes (A2) de l'incubation. On fait le calcul :  $\Delta A = A2 - A1$ .

### • Calcul

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}}{\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

## 2.8. Dosage d'acide urique

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Phosphate pH 7.4 Sulfonate - 2-4 dichlorophénol (DCPS)	50 mmol/L 4 mmol/L
R2 Enzymes	Uricase peroxydase (POD) Ascorbate d'oxydase 4-aminophenazone (4-Ap)	60 U/L 660 U/L 200 U/L 1 mmol/L
Calibrant d'acide urique	Solution standard d'acide urique	6 mg/dl

### • Préparation du réactif de travail

Dissoudre le contenu de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable un mois à 2-8°C ou 10 jours à 15-25°C.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25

Mélanger et incuber pendant 5 minutes à 37°C ou minutes à 15- 25°C. Lire la densité optique (DO) de l'échantillon et du standard contre le blanc à 520 nm. La coloration est stable pendant 30 minutes.

### • Calcul

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{(\text{DO}) \text{ échantillon}}{(\text{DO}) \text{ étalon}} \times 6 (\text{concentration de l'étalon})$$

## 2.9. Dosage de la phosphatase alcaline

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif 1 Tampon	Diethanolamine (DEA) pH10,4	1 mmol/L
	Chlorure de magnésium	0,5 mmol/L
Réactif 2 Substrat	P-nitrophényl phosphate (pNPP)	10 mmol/L

- **Préparation du réactif de travail**

Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

- **Mode opératoire**

Réactif (ml)	1.2
Échantillon (µl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes ( $\Delta$  Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- **Calcul**

Pour estimer l'activité enzymatique de la PAL, on utilise la formule suivante :

$$\text{PAL (UI/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300.$$

## 2.10. Dosage de l'activité du lactate déshydrogénase

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif 1 Tampon	Imidazole	65 mmol/L
	Pyruvate	0,6 mmol/L
Réactif 2 Substrat	NADH	0,18 mmol/L

### • Préparation du réactif de travail

Dissoudre un comprimé de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1) et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 15 jours à 2-8°C ou 5 jours à 15-25°C.

### • Mode opératoire

Température	37°C
Réactif de travail (ml)	3,0
Echantillon (µl)	50

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance à 340 nm avec trois répétitions (chaque 1 min d'incubation).

### • Calcul

$$\text{Activité LDH (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

Où  $\Delta A$  c'est la valeur moyenne des trois lectures.

## 2.11. Dosage de Glucose

### • Réactifs

Réactifs	Composition	Concentration
R1	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
Tampon	Phénol	0,3 mmol/L
R2	glucose oxydase (GOD)	15000U/L
Enzymes	Péroxydase (POD)	1000U/L
	4- aminophénazone (4-AP)	2,6 mmol/L
Calibrant Glucose	Solution standard de Glucose	100 mg/dl

### • Préparation du réactif de travail

Dissoudre le contenu de R2 dans le flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant un mois à 2- 8°C ou pendant 7 jours entre 15- 25°C.

### • Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, incuber 10 min à 37°C ou alors 15 à 20 min à (15- 25°C). Lire la densité optique « DO » de l'échantillon et du standard contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes.

### • Calcul

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times 100 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

### Annexe 3

#### 3.1. Dosage des protéines hépatiques

##### ● Préparation de Réactif de Bradford

Dissoudre 100 mg de la poudre du bleu de Coomacie (BBC) dans 50 ml d'éthanol à 95%. Agiter la solution pendant 2 heures, ensuite ajouter 100 ml d'acide phosphorique à 85%, compléter le volume à 1 litre par l'eau distillée. La solution résultante sera filtrée et protéger de la lumière. Le réactif est stable pendant deux semaines à 4°C.

#### 3.2. Dosage de glutathion (GSH)

##### ◆ Préparation des solutions

##### ❖ Solution de Tris 0.4 M + (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique)(EDTA) 0.02M

Dissoudre 12,114 g de Tris et 1,8612 g d' EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le PH à 9.6.

##### ❖ Solution d'acide Salicylique à 0.25 M

Dissoudre 0,25g de l'acide Salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

##### ❖ Solution de DTNB à 0,01M

Dissoudre 79 mg de DTNB dans 20 ml de méthanol absolu.

##### ❖ Solution d'acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) à 0.02 M

Dissoudre 1,8612g d'EDTA dans 250 ml d'eau distillée.

#### 3.3. Dosage du MDA

❖ **TBS ; Tris (50mM), NaCL (150mM) et pH 7,4** : Dissoudre 8,775 g NaCL dans 1L d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1L par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.

❖ **TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)** : Dissoudre 20 g TCA dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution TCA 20% puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.

❖ **HCl 0,6 M** : Prélever 51,56 ml d'HCl et compléter le volume à 1 L par l'eau distillée.

❖ **Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM)** : Dissoudre 3,149 g Tris dans 1 L d'eau distillée, puis poser 17,299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution Tris (26 mM).

**3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)**

- ❖ **GSH (0.1 mM)** : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- ❖ **TCA (1%)** : Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- ❖ **DTNB (1,0 mM)** : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

**3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST)**

- ❖ **CDNB (0,02 M)** : Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.
- ❖ **Solution GSH (0,1 M)** : Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

HOSTED BY



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: <http://ees.elsevier.com/apjtm>Original research <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.005>Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in ratsAmel Laouar<sup>1</sup>, Fahima Klibet<sup>2</sup>, Ezzeddine Bourogaa<sup>3</sup>, Amel Benamara<sup>4</sup>, Amel Boumendjel<sup>1</sup>, Azzedine Chefrour<sup>5,6</sup>, Mahfoud Messarah<sup>1</sup>✉<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba 23000, Algeria<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biological Cellular and Molecular, Faculty of Sciences, University of Mentouri, BP 25000 Constantine, Algeria<sup>3</sup>Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra Road-Km 3.5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisia<sup>4</sup>Department of Applied Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Larbi Tebessi, Tebessa 12000, Algeria<sup>5</sup>Laboratory of Pharmaceutical Preparations for Hospital Use, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Badji, Mokhtar-Annaba 23000, Algeria<sup>6</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mohamed Cherif Mesaadia, Souk Ahras 41000, Algeria

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 Dec 2016

Received in revised form 16 Jan 2017

Accepted 17 Feb 2017

Available online 7 Mar 2017

## Keywords:

*Juniperus phoenicea*

Oxidative stress

Antioxidant

Lipid peroxidation

Hepatoprotective

Biochemical parameters

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the antioxidant and hepatoprotective properties of *Juniperus phoenicea* (*J. phoenicea*) berries against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats.**Methods:** Hepatotoxicity was induced in albino Wistar rats by single dose of CCl<sub>4</sub> dissolved in olive oil (1 mL/kg BW, 1/1 in olive oil, *i.p.*). Aqueous extract of *J. phoenicea* berries (AEJP) was administered at the dose of 250 mg/kg/day by gavage for 12 days.**Results:** Obtained results revealed that administration of CCl<sub>4</sub> caused a significant increase in plasma ASAT, ALAT, ALP and LDH activities and total bilirubin concentration, compared to the control group. While, albumin and total protein concentration were significantly lower. Additionally, a significant decrease in the level of hepatic GSH, GPx and GST activities associated with a significant increase of MDA content in CCl<sub>4</sub> group than those of the control. However, the treatment of experimental rats with AEJP prevented these alterations and maintained the antioxidant status. The histopathological observations supported the biochemical evidences of hepatoprotection.**Conclusions:** The results of the present investigation indicate that *J. Phoenicea* possesses hepatoprotective activity and this effect was may be due to its antioxidant properties.

## 1. Introduction

The liver as a vital organ has a wide range of functions in the body, including detoxification, plasma protein synthesis, and glycogen storage. Oxidative stress is considered as the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and

antioxidant protective mechanism. It is principal cause of the development of hepatic disorders [1]. Various types of liver disorders are characterized by cirrhosis, jaundice, tumors, metabolic and degenerative lesions and liver cell necrosis *etc* [2]. The management of liver disorders is still a challenge to the modern medicine [3]. Conventional or synthetic drugs used in the treatment of liver diseases are sometimes inadequate and can have serious adverse effects [4]. Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a highly toxic chemical and a well known hepatotoxin used extensively to investigate the hepatotoxicity in animal models [5]. CCl<sub>4</sub> by itself does not have cytotoxic effects on the liver but its metabolic products such as generated trichloromethyl free radicals are responsible for the toxicity and the production of lipid peroxidation [6]. It has

First author: Amel Laouar, Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba 23000, Algeria.

✉Corresponding author: Mahfoud Messarah, Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

Tel/Fax: +213 38 87 61 10

E-mails: [mmessarahdz@yahoo.fr](mailto:mmessarahdz@yahoo.fr), [mahfoud.messarah@univ-annaba.dz](mailto:mahfoud.messarah@univ-annaba.dz)

Peer review under responsibility of Hainan Medical University.

been reported that antioxidants appear to act against disease processes by increasing the levels of endogenous antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation [7]. Lots of studies indicate that natural substances from edible and medicinal plants exhibited strong antioxidant activity that could act against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage, because they contain lots of free radical scavenger such as phenolic acids and flavonoid compounds [8].

The genus *Juniperus* belongs to the Cupressaceae family, comprising about 67 species all over the world [9]. Plants from the *Juniperus* genus have found application in different European cuisines as a spice, flavouring for alcoholic drinks, as well as in cosmetics [10]. Furthermore, these plants have an extensively history of use in global folk medicine for various disorders, such as common colds, urinary and kidney infections and dermatological disorders [11]. Among their species, *Juniperus phoenicea* (*J. phoenicea*) is an evergreen tree indigenous to the North Africa. In Algeria, *J. phoenicea* grows on the steppes, commonly known as 'Arar'. This plant is considered as an important medicinal plant largely used in the Algerian folk medicine as a diuretic, stimulative, stomach tonic, pulmonary and depurative disinfectant. A decoction of the leaves and berries has been used to treat diarrhea, rheumatism, and diabetes. Previous phytochemical studies reveal that *J. phoenicea* contains a large variety of compounds, mainly diterpenoids, biflavonoids, lignans, phenyl propane glucosides, two furanone glucosides, norterpene and sesquiterpene glucosides [9]. There are many papers report on the chemical composition of leaves and berries essential oils of *J. phoenicea* grown in north Mediterranean basin [12]. However, little attention has been given to the phenolic contents, antioxidant and biological activities of *J. phoenicea* berries. Therefore; the aim of the present study was to evaluate the antioxidant and hepatoprotective properties of *J. phoenicea* berries against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Carbon tetrachloride and all other chemicals and reagents used in the study were obtained from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri, USA).

### 2.2. Plant material

The plant material consisted of mature 'berries' of *J. phoenicea*, collected in month of March 2013, from Aouinet province of Tebessa (Algeria). The identity of plant was confirmed by Professor A. Chefrour in the botany laboratory, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria. The berries were cleaned, dried in shade and powdered then stored in air tight container.

### 2.3. Preparation of plant extracts

#### 2.3.1. Preparation of aqueous extract

Five grams of the dried berries powder of *J. phoenicea* were boiled in 50 mL of distilled water and heated for 15 min. The extract was then filtered through Whatman filter paper and

directly administered orally by gavage to the animals at a volume of 250 mg/kg body weight (BW).

#### 2.3.2. Preparation of methanol extract

Twenty grams of the dried berries powder of *J. phoenicea* were extracted at room temperature for 72 h, in 100 mL methanol (85%) three times. The hydro-alcoholic extract was filtered through Whatman filter paper, and stored at 4 °C. The filtrate was concentrated under reduced pressure at 60 °C. The extract was weighed and stored at 4 °C in storage vials.

## 2.4. Chemical characterization

### 2.4.1. Total phenolic contents

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method of Waterman and Mole [13]. A volume of 10 µL of the AEJP and MEJP was mixed with 50 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 150 µL of 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and the mixture was shaken once again for 1 min. Finally, the solution was brought up to 790 µL by adding distilled water. After 90 min, the absorbance was measured at 760 nm and the total phenolic content was calculated from the calibration curve using gallic acid as a standard. The results were expressed as mg of gallic acid equivalent per g (mg GAE/g) of dry weight DW of extract.

### 2.4.2. Total flavonoid contents

Total flavonoid contents were measured by a colorimetric assay according to the method of Zhishen *et al* [14], and quercetin was used as a standard to construct the calibration curve. Briefly 250 µL of extracts were mixed with 1.25 mL of distilled water and 75 µL of 5% NaNa<sub>2</sub> solution. After 6 min, 150 µL of 10% AlCl<sub>3</sub> solution were added. 6 min later, 0.5 mL of 1M NaOH solution were added and then the final volume was adjusted to 2.5 mL with distilled water and mixed thoroughly. The absorbance was measured at 510 nm versus a blank prepared without extract and data were expressed in mg quercetin equivalent per g (mg QE/g) of DW of extract.

### 2.4.3. Total condensed tannin contents

Condensed tannins were determined according to the method of Julkunen-Tiitto [15]. A volume of 50 µL of extracts was added to 1.5 mL of 4% vanillin solution in methanol, and then 750 µL of HCl were added. The mixture was allowed to stand in the dark for 20 min, and absorbance was measured at 500 nm against methanol as a blank. Catechin was used to make the standard curve and the amount of total condensed tannins is expressed as mg catechin equivalent per g (mg CE/g) of DW of extract.

## 2.5. In vivo study

### 2.5.1. Animals and treatments

Twenty-four male albino Wistar rats (aged between 8 and 9 weeks) with an average weighing (180–200) g were provided from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). They were housed in cages at room temperature of (22 ± 2) °C and kept under standard conditions of a 12 h light/dark cycle and minimum relative humidity of 40%. The rats were fed with a standard food supplied by (ONAB, El harrouch, Algeria) and water was offered *ad*

*libitum*. After acclimation for 2 weeks, the rats were divided into four groups each containing six rats.

Group I (control group): animals served as normal control.

Group II (CCl<sub>4</sub>-treated group): animals served as toxic control, received intraperitoneal administration (*i.p.*) of CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg BW, 1/1 in olive oil).

Group III (CCl<sub>4</sub>+ AEJP-treated group): animals treated with AEJP at a dose of 250 mg/kg BW via oral gavage.

Group IV (AEJP-treated group): animals received AEJP alone (250 mg/kg BW).

The experimental procedures were carried out according to the National Institute of Health Guidelines for Animal Care and approved by the Ethics Committee of the University. At the end of the 12 days experiments, the rats were sacrificed by cervical decapitation. Blood was collected and centrifuged at 2200 g for 15 min. Plasma samples were stored at 20 °C for biochemical analysis of ASAT, ALAT, ALP, LDH, total bilirubin, albumin and total protein.

### 2.5.2. Tissue preparation

Liver samples were dissected out and washed immediately in 0.9% NaCl solution, and then were homogenized on ice in buffer solution of phosphate-buffered saline 1: 3 (w/v; 1 g tissue with 3 mL PBS, pH 7.4) and centrifuged at 10000 ×g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were used to determine antioxidant enzyme activities, reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) contents.

### 2.5.3. Plasma biochemical parameters

Biochemical parameters were assayed according to standard methods. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, albumin and total proteins were estimated using commercial kits from Spinreact laboratories, Spain (AST, ref. 1001160 and 1001161; ALT, ref. 1001170 and 1002171; ALP, ref. 1001130 and 1001131; LDH, ref. 1001260; total bilirubin, ref. 1001044; albumin, ref. 1001020–1001023; total proteins, ref. 1001291).

### 2.5.4. Tissue biochemical parameters

#### 2.5.4.1. Estimation of lipid peroxidation levels

Lipid peroxidation process is determined in supernatant of homogenate liver tissue by the thiobarbituric acid (TBA) method which estimates the malondialdehyde formation (MDA) according to Buege and Aust [16]. Absorbance of TBA-MDA complex was determined at 530 nm and the level of hepatic MDA was expressed as nmoL/mg protein.

#### 2.5.4.2. Estimation of reduced glutathione levels

Reduced glutathione (GSH) was estimated by the method of Ellman [17] modified by Jollow *et al* [18]. Determination of GSH is based on the reaction of DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] with GSH and yield a yellow color with a maximum absorbance at 412 nm. Reduced glutathione concentration was expressed as nmoL/mg protein.

#### 2.5.4.3. Estimation of antioxidant enzymes activities

Glutathione peroxidase (GPx) activity was assessed by a modification of the colorimetric method of Flohe and Günzler [19] using hydrogen peroxide as a substrate in the presence of

GSH. The absorbance was recorded at 420 nm and specific activity of this enzyme is expressed as μmoL GSH/mg protein.

Glutathione-S-transferase (GST) activity was assayed by following the conjugation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm as described by Habig *et al* [20]. The enzyme activity was expressed as nmoL CDNB conjugate/min/mg protein.

### 2.5.4.4. Protein determination

Protein content of liver homogenates was determined according to Bradford [21], using bovine serum albumin as a standard.

### 2.5.5. Histopathological examination

A portion of the liver was fixed in 10% formalin for at least 24 h and then embedded in paraffin. Sections of 5 μm in thickness were cut, deparaffinized, dehydrated, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) according to method of Hould [22]. The histopathological changes in the liver were observed under a light microscope.

## 2.6. Statistical analysis

The data were expressed as mean ± SEM. Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *t*-test. The results were considered significant if  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Phenolic contents

Phytochemical analysis of the AEJP and MEJP showed high content of total phenolics (38.86 ± 0.23) and (49.43 ± 0.88) mg of GAE/g of DW of extracts respectively. Flavonoids are a group of polyphenolic compounds with various chemical structures and characteristics. The total flavonoid content of the AEJP was (2.09 ± 0.37) mg of QE/g, while MEJP contained (2.88 ± 0.10) mg of QE/g. Finally, values obtained for the condensed tannins contents of AEJP and MEJP were (15.12 ± 0.70) and (23.25 ± 0.96) mg of CE/g, respectively.

### 3.2. Effects of AEJP on blood biochemical parameters

The results of blood biochemical parameters are presented in Table 1. Administration of CCl<sub>4</sub> induced significant increase in the enzymatic activities of AST, ALT, ALP, LDH and total bilirubin levels when compared with those of the normal control group. Conversely, animals treated with AEJP exhibited significant decrease in the activities of the enzymes AST, ALT, ALP, LDH and total bilirubin as compared to CCl<sub>4</sub> group. Albumin and total protein concentration were decreased in CCl<sub>4</sub>-treated group compared to the control and also to the CCl<sub>4</sub>+ AEJP group. Moreover, no significant differences in these biochemical parameters were found between control group and AEJP-treated group.

### 3.3. Effects of AEJP on lipid peroxidation

Lipid peroxidation of biomembranes is one of the principal degenerative effects of free radicals. As shown in Table 2, the

**Table 1**

Changes in biochemical parameters of control and treated rats.

Parameters	Control	CCL <sub>4</sub>	CCL <sub>4</sub> + AEJP	AEJP
AST (U/L)	179.04 ± 12.70	255.12 ± 11.45 <sup>***</sup>	200.53 ± 15.66 <sup>###*</sup>	190.20 ± 12.74
ALT (U/L)	56.27 ± 4.93	77.05 ± 9.13 <sup>***</sup>	61.41 ± 5.51 <sup>##</sup>	58.45 ± 7.71
ALP (U/L)	190.39 ± 12.36	260.61 ± 10.84 <sup>***</sup>	202.65 ± 7.67 <sup>###</sup>	184.54 ± 9.97
LDH (U/L)	618.16 ± 18.60	768.50 ± 12.54 <sup>**</sup>	661.50 ± 22.47 <sup>###*</sup>	631.83 ± 14.4
Total protein (g/L)	81.09 ± 5.81	68.18 ± 4.25 <sup>***</sup>	76.87 ± 2.70 <sup>##</sup>	78.89 ± 3.42
Albumin (g/L)	41.22 ± 7.48	29.83 ± 2.06 <sup>**</sup>	36.40 ± 7.23 <sup>#</sup>	40.73 ± 2.85
Total bilirubin(mg/L)	1.37 ± 0.33	2.33 ± 0.44 <sup>**</sup>	1.92 ± 0.13 <sup>***</sup>	1.52 ± 0.19

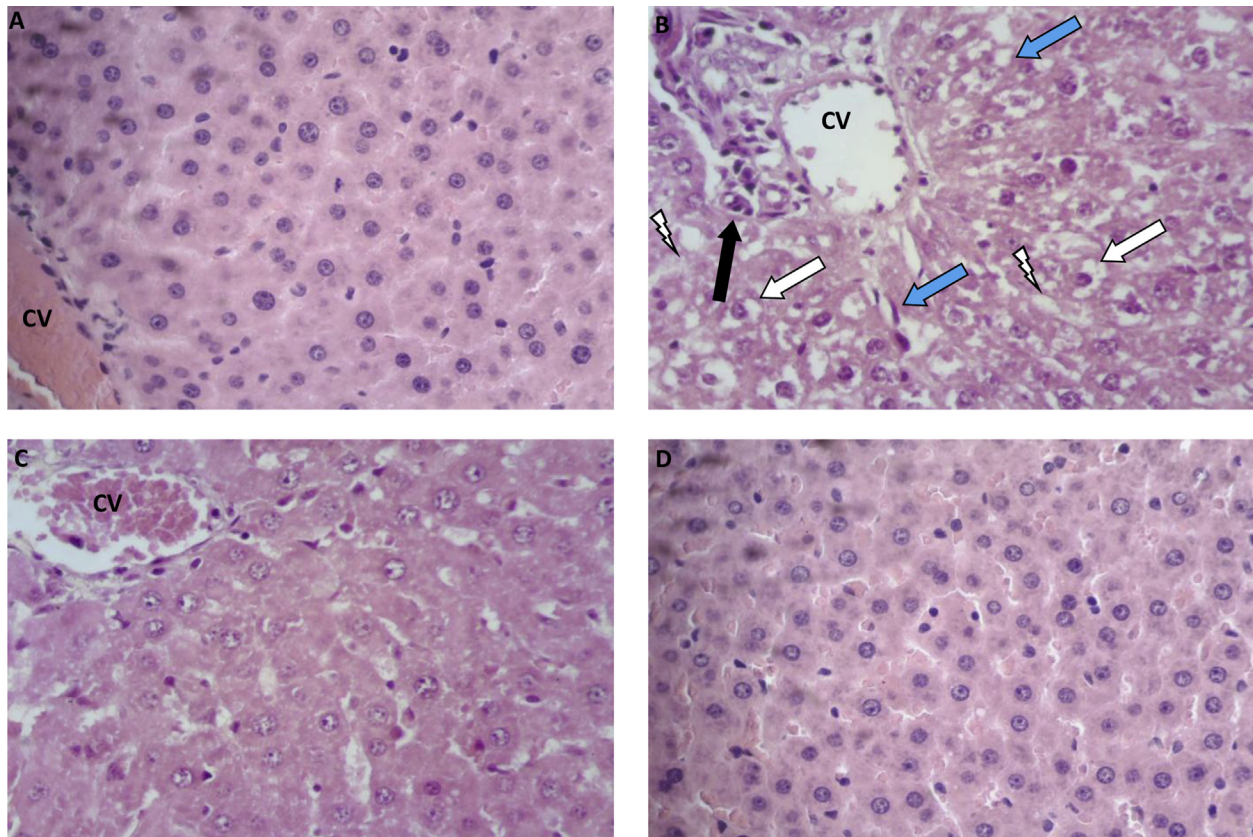
Values are given as mean ± SEM for groups of six animals each. \* $P \leq 0.05$  compared with control group; \*\* $P \leq 0.01$  compared with control group; \*\*\* $P \leq 0.001$  compared with control group. # $P \leq 0.05$  compared with CCL<sub>4</sub> group; ## $P \leq 0.01$  compared with CCL<sub>4</sub> group; ### $P \leq 0.001$  compared with CCL<sub>4</sub> group.

**Table 2**

Effect of AEJP on liver tissue MDA, GSH levels and antioxidant enzyme activities of control and treated rats.

Parameters	Control	CCL <sub>4</sub>	CCL <sub>4</sub> + AEJP	AEJP
GSH $\Delta$	120.870 ± 15.380	85.700 ± 14.420 <sup>**</sup>	113.660 ± 11.360 <sup>##</sup>	123.700 ± 12.540
MDA $\Delta$	0.390 ± 0.100	0.560 ± 0.090 <sup>**</sup>	0.440 ± 0.070 <sup>#</sup>	0.380 ± 0.030
GPx $\blacktriangle$	2.006 ± 0.070	1.700 ± 0.128 <sup>***</sup>	1.930 ± 0.040 <sup>###*</sup>	2.010 ± 0.060
GST $\Delta$	0.031 ± 0.003	0.017 ± 0.003 <sup>***</sup>	0.027 ± 0.003 <sup>####*</sup>	0.029 ± 0.001

Values are given as mean ± SEM for groups of six animals each.  $\Delta$ : nmol/mg protein;  $\blacktriangle$ :  $\mu\text{mol}$  GSH/mg protein. \* $P \leq 0.05$  compared with control group; \*\* $P \leq 0.01$  compared with control group; \*\*\* $P \leq 0.001$  compared with control group. # $P \leq 0.05$  compared with CCL<sub>4</sub> group; ## $P \leq 0.01$  compared with CCL<sub>4</sub> group; ### $P \leq 0.001$  compared with CCL<sub>4</sub> group.



**Figure 1.** Photomicrograph of H&E stained sections of liver from a control rat showing normal histological structure (Figure 1A,  $\times 400$ ). CCL<sub>4</sub>-treated rats liver showing necrosis around the central vein (blue arrow), inflammatory cell infiltration (black arrow), ballooning degeneration (white arrow) and sinusoidal dilatation (bolt) (Figure 1B,  $\times 400$ ). Liver sections of the animals administered AEJP showed moderate degree of liver damage and inflammatory cell, protection from hepatocyte degradation and centrilobular necrosis (Figure 1C,  $\times 400$ ). AEJP-treated rat liver showing normal appearance of hepatocytes (Figure 1D,  $\times 400$ ).

MDA level was significantly increased in the CCl<sub>4</sub>-treated animals compared to the normal. AEJP significantly caused diminution of CCl<sub>4</sub>-elevated MDA level compared to those of CCl<sub>4</sub> group.

### 3.4. Effects of AEJP on GSH contents

GSH constitutes the first line of defense against free radicals. The toxicity of CCl<sub>4</sub> significantly decreased the hepatic GSH levels in the CCl<sub>4</sub>-treated animals compared to the normal control group (Table 2). Administration of AEJP ameliorated the GSH levels compared to that of CCl<sub>4</sub>-treated group.

### 3.5. Effects of AEJP on antioxidant enzyme activities

The activities of GST and GPx of the liver tissue are shown in Table 2. Injection of CCl<sub>4</sub> led to a lower GST and GPx activities compared to the normal control group. However, animals treated with AEJP showed significant increase in GPx and GST as compared to CCl<sub>4</sub> group.

### 3.6. Histopathological studies

The liver section in normal control animals indicated the presence of normal hepatic cells with well preserved cytoplasm prominent nucleus and visible central veins (Figure 1A). In contrast, the CCl<sub>4</sub>-treated rats showed liver sections with severe structural damage characterized by necrosis around the central vein, inflammatory cell infiltration, ballooning degeneration and sinusoidal dilatation (Figure 1B). However, the liver sections of the animals administered AEJP at the dose of 250 mg/kg (BW) showed moderate degree of liver damage and inflammatory cell, protection from hepatocyte degradation and centrilobular necrosis (Figure 1C). Whereas, the histopathological examination of the liver AEJP-treated group showed normal hepatocytes comparable to the normal control group (Figure 1D).

## 4. Discussion

Plants rich in secondary metabolites, including phenolic compounds, have antioxidant activity due to their redox properties and chemical structures. The results indicate that our extracts of *J. Phoenicea* berries contained high levels of total phenolic compounds, tannins and flavonoids. However, the results of phenolic contents (38.86 ± 0.23) and (49.43 ± 0.88) mg of GAE/g of DW of AEJP and MEJP respectively, were lower than that reported by Hayouni et al [23] for *J. phoenicea* from Tunisia, which ranged from (66.10 ± 1.20) to (202.00 ± 0.43) mg GAE/g of dry material. In another recent work, Amalich et al [24] recorded 5.35 mg GAE/g of total phenolic compounds of *J. phoenicea* berries from Morocco. Such variation in composition can be attributed to the diversity of geographical environments (soil, sunlight, temperature, precipitation, etc). Many studies suggest that antioxidant substances block the action of free radicals which have been implicated in the pathogenesis of many diseases including atherosclerosis, Alzheimer, cancer and liver disorders [25]. It has been reported that the antioxidant activity of flavonoids and condensed tannins depends on the presence of free OH groups, especially 3-OH [26].

Results of our phytochemical analysis suggest that *J. phoenicea* berries contain phytochemical constituents that are capable of donating hydrogen to a free radical to scavenge the potential damage. Many extracts from plants have been investigated for hepatoprotective and antioxidant effects against hepatotoxin-induced liver damage [27]. Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is one of the most commonly used hepatotoxins in experimental study of liver diseases. Among the various mechanisms involved in the hepatotoxic effect of CCl<sub>4</sub>, one is oxidative damage through free radical generation. CCl<sub>4</sub> is biotransformed by cytochrome P450 to the trichloromethyl free radical (CCl<sub>3</sub>) that induces membrane lipid peroxidation and disturbs Ca<sup>2+</sup> homeostasis to produce hepatocellular injury [28]. In our study *in vivo*, we examined the hepatoprotective activity of AEJP against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. Results showed that administration of CCl<sub>4</sub> developed significant hepatic damage and oxidative stress as evidenced by substantial increases in the plasma activities of AST, ALT, ALP, LDH, and total bilirubin. These findings are in agreement with those reported by [4,5,29]. Administration of AEJP significantly prevented hepatocyte injury induced by CCl<sub>4</sub>. Reduction in the level of AST, ALT and LDH is an indication of the hepatic cell regeneration process. While, reduction in the level of ALP with the concurrent depletion with the raised bilirubin level suggests the stability of the biliary function [4]. In addition, the level of total protein and albumin were significantly reduced in CCl<sub>4</sub> treated rats compared to normal rats. AEJP has increased the levels of plasma total protein and albumin, which indicates hepatoprotective activity. Stimulation of protein synthesis has been advanced as a contributory hepatoprotective mechanism which accelerates the regeneration process and the production of liver cells [30].

Among the many secondary products during lipid peroxidation, MDA is a commonly used biomarker for the assessment of lipid peroxidation [4,31]. Its elevated levels could reflect the degrees of lipid peroxidation injury in hepatocytes [32–34]. In the present study, we found that the level of MDA was increased in the liver of CCl<sub>4</sub> treated rats compared to normal rats. Treatment with AEJP significantly reversed these changes. Hence it may be possible that the mechanism of hepatoprotection of extract is due to its antioxidant effect.

Antioxidant enzymes can detoxify free radicals by converting them back to more stable molecules within the cell [30]. GPx belongs to a class of enzymes that catalyze the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydro peroxides to non-toxic products [35]. It has been reported that CCl<sub>4</sub> produces an decreased liver GPx activity [29,36,37]. Our results confirm this effect which showed that GPx activity was significantly decreased in the liver of CCl<sub>4</sub> treated animals compared with control group rats. CCl<sub>4</sub> administration also significantly decreased the activity of GST, which plays an important role in protecting cells against ROS mediated injury by detoxification of lipid hydro peroxides formed due to oxidative damage [38]. However, GPx and GST activity was significantly elevated by administration of AEJP to CCl<sub>4</sub>-treated rats. The decrease in the activity of antioxidant enzymes suggested that the balance between the oxidant and pro-oxidant was disturbed by CCl<sub>4</sub>, and treatment of experimental rats with *J. Phoenicea* effectively reverts this imbalance and restores the level of antioxidant enzymes. The effect of *J. Phoenicea* on GST activity can be explained by an increase in the transcription of the gene encoding GST, since it has been

reported that genes encoding phase II enzymes are highly induced by antioxidant compounds [39].

Regarding non-enzymic antioxidants, GSH is an intracellular reductant and protects cells against free radicals, peroxides and other toxic compounds. In addition, GSH is central to the cellular antioxidant defenses and acts as an essential cofactor for antioxidant enzymes including GPx and GST [40,41]. Depletion of hepatic GSH has been shown to be associated with an enhanced toxicity to chemicals, including CCl<sub>4</sub> [42]. In the present study, a decrease in hepatic tissue GSH level was observed in the CCl<sub>4</sub>-treated group compared to normal group. It has been demonstrated that in free radical-mediated hepatic cell injury, consumption of hepatocellular GSH is associated with the initiation of cell injury with lipid peroxides formation [6]. The increase in hepatic GSH level in the rats treated with AEJP may be due to a novo GSH synthesis or GSH regeneration.

Furthermore, the histopathological findings of liver samples are in agreement with the results of biochemical studies. CCl<sub>4</sub> caused damage to the hepatic architecture and produced histological changes such as inflammatory cell infiltration, necrosis of hepatocytes and sinusoidal dilatation. These results are in accordance with those obtained by Ben Hsouna *et al* [29] and Kale *et al* [43] which indicate that CCl<sub>4</sub> cause histopathological liver changes in rats. Administration of AEJP improved the structure of hepatic cells, confirming the hepatoprotective effect of AEJP. In fact, the relatively high polyphenol content of the AEJP is indicative of antioxidative properties *in-vivo*.

Our results were in line with previous studies on hepatoprotective activity of *J. phoenicea* berries due to their folkloric use against liver diseases in some countries. In a study of Alqasoumi *et al* [44], the petroleum ether, chloroform and methanol fractions obtained from the aerial parts of *J. phoenicea* growing in Saudi Arabia showed significant hepatoprotective activity against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. The authors showed that hinokiflavone isolated from the aerial parts of *J. phoenicea* exhibited significant hepatoprotective activity comparable with the standard drug silymarin in reducing the elevated liver enzymes and restoring normal appearance of hepatocytes. On the other hand, the AEJP berries growing in Libya was tested against thioacetamide-induced hepatocytotoxicity in rats. They found that the extract cause a significant anti-hepatotoxic effect as compared to silymarin used as reference drug [45]. The authors claimed that the antihepatotoxic activity of *J. phoenicea* berries against thioacetamide might be due to their polyhydroxylated flavonoids, quinic acid derivative and polyunsaturated fatty acids.

The results of this study suggest that *J. phoenicea* protected rats against CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity. The hepatoprotective effects of *J. phoenicea* may be due to its antioxidant and free radical scavenging properties. However, further investigations are essential to elucidate the precise mechanism of active agents of *J. phoenicea* protection against CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity.

### Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

### Acknowledgements

The first author would like to thank the Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria and the University of Larbi Tebessi, Tebessa,

Algeria, for the permission to utilize the facilities to make this work. This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the research Laboratory 'Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology' Faculty of sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

### References

- [1] Galicia-Moreno M, Gutiérrez-Reyes G. The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterol Mex* 2014; **79**(2): 135-144.
- [2] Raj B, Singh SDJ, Samuel VJ, John S, Siddiqua A. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Cassia filiformis* against CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in rats. *J Pharm Res* 2013; **7**: 15-19.
- [3] Bouasla I, Bouasla A, Boumendjel A, Messarah M, Abdennour C, Boulakoud MS, et al. *Nigella sativa* oil reduces aluminium chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. *Biol Trace Elem Res* 2014; **162**(1–3): 252-261.
- [4] Mistry S, Dutt KR, Jena J. Protective effect of *Sida cordata* leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced acute liver toxicity in rats. *Asian Pac J Trop Med* 2013; **6**(4): 280-284.
- [5] Ponmari G, Annamalai A, Gopalakrishnan VK, Lakshmi PTV, Guruvayoorappan C. NF-κB activation and proinflammatory cytokines mediated protective effect of *Indigofer acaerulea* Roxb. On CCl<sub>4</sub> induced liver damage in rats. *Int Immunopharm* 2014; **23**(2): 672-680.
- [6] Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, Garoui EM, Boudawara T, Zeghal N. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *Eur J Phar* 2011; **668**(1–2): 133-139.
- [7] Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D. Protective role of Vitamin E pre-treatment on *N*-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem Biol Interact* 2005; **156**(2–3): 101-111.
- [8] Cheng N, Ren N. Properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. *Eur J Pharm* 2011; **668**: 133-139.
- [9] Tahar D, Dahmane D. Chemical composition of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. from Algeria. *J Essent Oil Res* 2008; **20**(1): 15-20.
- [10] Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem* 2007; **105**(2): 572-578.
- [11] Allen DE, Hatfield G. *Medicinal plants in folk tradition, an ethnobotany of Britain & Ireland*. Cambridge: Timber Press; 2004.
- [12] Ramdani M, Lograda T, Silini H, Zeraib A, Chalarid P, Figueredo G, et al. Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *J Appl Pharm Sci* 2013; <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2013.31105>.
- [13] Waterman PG, Mole S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
- [14] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; **64**(4): 555-559.
- [15] Julkunen-Tiitto R. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 1985; **33**(2): 213-217.
- [16] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 302-310.
- [17] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Bioch Biophys* 1959; **82**(1): 70-77.
- [18] Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 1974; **11**(3): 51-57.
- [19] Flohe L, Günzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 114-121.

- [20] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; **249**(22): 7130-7139.
- [21] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- [22] Hould R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Maloine* 1984.
- [23] Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 2007; **105**(3): 1126-1134.
- [24] Amalich S, Fadili K, Fahim M, EL Hilali F, Zair T. Polyphenols content and antioxidant power of fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L. from Tounfite (Morocco). *J Chem* 2016; **4**(1): 177-186.
- [25] Chanda S, Dave R, Kaneria M. *In vitro* antioxidant property of some Indian medicinal plants. *Res J Med plant* 2011; **5**(2): 169-179.
- [26] Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J Taibah Univ Sci* 2015; **9**(4): 449-454.
- [27] Tiwari P, Ahirwae D, Chandy A, Ahirwar B. Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla*. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; **4**(1): 81-86.
- [28] Arun M, Asha VV. Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; **111**(1): 110-114.
- [29] Ben Hsouna A, Saoudi M, Trigui M, Jamoussi K, Boudawara T, Jaoua S, et al. Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food Chem Toxicol* 2011; **49**(12): 3183-3191.
- [30] Yang L, Wang CZ, Ye JZ, Li HT. Hepatoprotective effects of polyphenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 2011; **82**(6): 834-840.
- [31] Messarah M, Saoudi M, Boumendjel A, Kadeche L, Boulakoud MS, El Feki A. Green tea extract alleviates arsenic-induced biochemical toxicity and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Ind Health* 2013; **29**(4): 349-359.
- [32] Yuan LP, Chena FH, Ling L, Doub PF, Bob H, Zhong MM, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *J Ethnopharmacol* 2008; **116**(3): 539-546.
- [33] Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barkat L, Bouasla I, Abdennour C, et al. Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol Ind Health* 2013; **29**(1): 77-88.
- [34] Djeflal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, El Feki A. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicol Ind Health* 2015; **31**(1): 31-43.
- [35] Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol* 2013; **55**: 234-240.
- [36] Jain S, Jain DK, Balekar N. *In-vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of *Mentha pulegium* leaf against CCl<sub>4</sub> induced toxicity in rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(2): S737-S740.
- [37] Yang CC, Fang JY, Hong TL, Wang TC, Zhou YE, Lin TC. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Int Immunopharmacol* 2013; **15**(1): 106-113.
- [38] Ritesh KR, Suganya A, Dileepkumar HV, Rajashekar Y, Shivanandappa T. A single acute hepatotoxic dose of CCl<sub>4</sub> causes oxidative stress in the rat brain. *Toxicol Rep* 2015; **2**: 891-895.
- [39] Sotelo-Félix JI, Martínez-Fong D, Muriel P, Santilla RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinu officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol* 2002; **81**(2): 145-154.
- [40] Attia AA, El Mazoudy RH, El-Shenawy NS. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pestic Biochem Physiol* 2012; **103**(2): 87-93.
- [41] Klibet F, Boumendjel A, Khiari M, El Feki A, Abdennour C, Messarah M. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: alleviation by *Pistacia lentiscus* oil. *Pharm Biol* 2016; **54**(2): 1-10.
- [42] Sanmugapriya E, Venkataraman S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in experimental rats. *J Ethnopharmacol* 2006; **105**(1-2): 154-160.
- [43] Kale I, Khan MA, Irfan Y, Goud VA. Hepatoprotective potential of ethanolic and aqueous extract of flowers of *Sesbania grandiflora* (Linn) induced by CCl<sub>4</sub>. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(2): S670-S679.
- [44] Alqasoumi SI, Farraj AI, Abdel-Kader MS. Study of the hepatoprotective effect of *Juniperus phoenicea* constituents. *Pak J Pharm Sci* 2013; **26**(5): 999-1008.
- [45] Abou-Ela M, El-Shaer N, Abd El-Aziz T. Chemical constituents and hepatotoxic effect of the berries of *Juniperus phoenicea* Part 2. *Nat Prod Sci* 2005; **11**(4): 240-247.