



République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

**Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
DEPARTEMENT Biologie Physico-Chimie
2^{ème} année en Master Pharmacologie moléculaire**

Mémoire de Master

Thème

*Optimisation de l'extraction des antioxydants par
micro onde des feuilles de Ficus carica en utilisant le
model Box Behnken et étude de la toxicité sub-
chronique in vivo sur les souris swiss albinos*

Réalisé par :
M^{lle} AZZOUGUEN Dihia
M^{lle} BENHAMA Nadia

Membres du jury :

Président : M_r MADANI K.

Promoteur : M_r BOUKHALFA F.

Examineurs : M_r TACHERFIOUT M.

M^{me} BELHAMICHE N.

Grade :

Professeur

M.A.A

M.A.A

M.A.A

Promotion 2013/ 2014



REMERCIEMENTS

✎ Au terme de notre travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

✎ Nous tenons tous particulièrement à adresser nos remerciements les plus vifs d'abord à notre promoteur Mr Boukhalfa Farid, qui nous a fait l'honneur de nous inspirer ce sujet et nous guider tout au long de son élaboration, pour ses conseils, son sérieux dans le travail et surtout sa patience.

✎ Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury : Mr MADANI K qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury, Mr TACHERFIOUT M et Mme BELHAMICHE N qui ont accepté d'examiner ce travail et de consacrer de leurs temps pour leur évaluation.

✎ Enfin, nos remerciements s'adressent à tous les enseignants et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

✎ Dihia et Nadia ✎



DÉDICACES

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

✎ A ceux qui sont mon exemple de la réussite, que j'ai tant aimée et respectée, qui m'ont donné de l'amour ; de la tendresse et de la force, ma très chère mère et mon très cher père ; que Dieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie.

✎ Mes dédicaces sont adressées à mes six chers frères : Abd alhalim, Abd alrahman, Ibrahim, ahmed, Abd alrahim, Mohamed.

✎ A toute ma famille, mes voisins, et tous mes amis (es) qui m'ont toujours encouragés et souhaités la réussite.

✎ A mes adorables copines : Souad, Charihane, Salima ,fatima et Ilham que j'aimerai pour toujours.

✎ A mes chers amis : Halim, Khaled, abdou et Lounes qui m'ont donné de la force ; leur soutien, leur aide et leur présence. Que Dieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie.

✎ A ma binôme Nadia, ensemble nous avons pu faire et achevé ce travail, nous avons partagé d'agréables moments tout au long de notre cursus universitaire.

✎ A Toute la promotion de pharmacologie moléculaire et Biochimie appliquée, promotion 2013-2014.

✎ Dilia ✎

Dédicaces

Au terme de toutes ces années d'étude je dédie ce modeste travail en signe de respect et de remerciement

A la mémoire de mes grande parents, que j'aurais tant espéré de me voir réussir un jour.

A ce qui ont donnée un sens pour mon existence, qui mon soutenu jours et nuits durant tout mon parcours.

A vous mes très chère et adorable parents.

A qui j'ai partagé avec eux tout les moments de ma vie :

A mes chères sœurs : Bidida, Souad et Samira.

A mes chères frères : Belka, Bachir, Hammad, Zaki et Djalalou

A ma nièce et neveux : Sylia, Gaya, Ghilass, Ilimasse, Anir, Illass et Dylan

A ma chère copine Hanan

A toi Dihia de m'avoir partagé les moments de ce travail ensemble

*A tout la promotion de pharmacologie moléculaire
2013/2014*

∞ Nadia ∞

Liste des Figures

Figure	Titre de Figure	Page
Figure N°01	Aspect morphologique de <i>Ficus carica</i> .	04
Figure N°02	Illustration du plan Box-Behnken pour trois facteurs.	08
Figure N°03	Facteurs affectant l'expérimentation animale.	11
Figure N° 04	Origine des différentes enzymes présentes dans le sérum humain.	13
Figure N° 05	Photographie des feuilles du <i>Ficus carica</i> et de la poudre obtenue.	16
Figure N°06	Photographie des souris wister albinos dans une cage transparente.	22
Figure N°07	Photographie de l'Administration orale de l'extrait du <i>Ficus carica</i> .	23
Figure N°08	Photographie du prélèvement du sang des souris.	23
Figure N°09	Photographie de la collecte du sang dans les tubes héparines vides et remplie du sang.	24
Figure N°10	photographie d'un cadavre d'une souris fixé en décubitus dorsal.	27
Figure N°11	Photographie des cassettes en plastique.	28
Figure N°12	Photographie de l'appareille de l'inclusion au niveau de l'anapath.	28
Figure N°13	Photographie des lames après coloration.	29
Figure N° 14	Teneur en humidité résiduelle de la poudre de feuille étudiée.	31
Figure N°15	Plan de prédiction réelle de la poudre étudiée.	34
Figure N°16	Surface de réponse pour l'interaction Temps- rapport (M/S).	37
Figure N°17	Surface de réponse pour l'interaction Temps-solvant.	37
Figure N°18	Teneur en polyphénols totaux de l'extrait étudié.	39
Figure N°19	teneur en flavonoïdes de l'extrait étudié.	41
Figure N°20	teneur en tannins de l'extrait étudié.	42
Figure N°21	pourcentage de réduction de chlorure ferrique.	44
Figure N° 22	pourcentage de réduction de phosphomolybdate de l'extrait étudié.	45
Figure N°23	pourcentage d'inhibition du radical DPPH* de l'extrait étudié.	46
Figure N°24	pourcentage d'inhibition du radical ABTS de l'extrait étudié.	47

Figure N°25	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ * par l'extrait étudié (6mg/ml).	48
Figure N°26	La variation du poids corporel des différents lots au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (LT:0 mg/kg ; L1: 200 mg/kg ; L2: 400 mg/kg et L3: 800 mg/kg).	49
Figure N°27	Poids des organes (Foie et reins) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg). Lot 1 (200 mg/kg); Lot 2 (400 mg/kg); Lot 3 (800 mg/kg).	50
Figure N°28	paramètres sériques d'évaluation de la fonction hépatique (ALAT, ASAT, bilirubine,) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg). Lot 1 (200 mg/kg); Lot 2 (400 mg/kg); Lot 3 (800 mg/kg).	51
Figure N°29	paramètres sériques d'évaluation de la fonction rénale (urée et créatinine) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg). Lot 1 (200 mg/kg) ; Lot 2 (400 mg/kg) ; Lot 3 (800 mg/kg).	52
Figure N°30	Photographie de parenchyme hépatique d'une souris témoin GX100	53
Figure N°31	photographie de parenchyme hépatique d'une souris du lot 1 (200 mg/kg/jour) GX100.	54
Figure N°32	parenchyme hépatique d'une souris du lot 2 (400 mg/kg/jour) GX100	54
Figure N° 33	photographie de parenchyme hépatique d'une souris du lot 3 (800 mg/kg/jour) GX100	55
Figure N°34	photographie de parenchyme rénal d'une souris témoin GX200.	56
Figure N°35	photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 1 (200mg/kg/j) GX100.	56
Figure N°36	photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 2 (400mg/kg/jour) GX100.	57
Figure N°37	photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 3 (800mg/kg/jour) GX100.	57

Liste des tableaux

Liste des tableaux	Titre	page
Tableau I	La classification botanique du figuier .	03
Tableau II	Composition chimique de la feuille du figuier.	04
Tableau III	Les niveaux des facteurs codés pour un plan Box-Behnken à trois facteurs.	09
Tableau IV	Les différents sorts de toxicité.	10
Tableau V	Les niveaux des paramètres choisis.	17
Tableau VI	Le model expérimental du plan de Box-Behnken utilisé.	18
Tableau VII	plan et résultats d'optimisation des conditions d'extraction par le plan BBD.	33
Tableau VIII	Analyse de la variance du plan Box-Behnken étudié.	35
Tableau IX	Les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré.	36
Tableau X	Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.	39
Tableau XI	Analyses biochimiques de traitement sub-chronique des souris femelles par l'extrait méthanolique de <i>Ficus carica</i> avec les doses Lot T (0 mg/kg), Lot 1 (200 mg/kg), Lot 3 (400mg/kg), Lot 3 (800 mg/kg).	50

Liste des abréviations

ABTS : sel d'ammonium de L'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ABTS⁺ : Le radical ABTS

ADP : adénosine-5-phosphate

ALT : Alanine aminotransférase

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

BBD: Box-Behenken Design

BH : Bilan hépatique

C ° : Degré Celsius.

DPPH: Radical 1,1-Diphényle-2-PicrylHydrazyle.

EAO : espèces réactives de l'oxygène

Eop : Extrait optimisé

g : Gramme, **mg**: Milligramme, **µg** : Microgramme.

ml : Millilitre, **µl** : Microlitre, **L** : litre

mM : Millimolaire, **mmol** : Millimol

ml : Millilitre, **µl** : Microlitre,

MS : Matière Sèche

nm : Nanomètre, **cm** : Centimètre.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

R²:Coefficient de corrélation

Sec : Seconde

T.C.A : Acide Trichloro-Acétique

UV : Ultra-violet.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1-2

Partie théorique

I. Généralités sur le figuier

I-1-Historique.....3

I-2-Description botanique3

I-3-Composition phytochimique de la feuille du figuier4

I-4- Utilisation thérapeutique de la feuille du figuier4-5

II- Les plans d'expériences

II-1-Historique.....6

II-2-Principe6

II-3-Terminologie.....7

II-4-Plan de surface du répons(RMS).....7

II-5-Les Plan de Box-Behnken (BBD).....8

II-6 Quelques applications des plans Box-Behnken.....9

III. La toxicité

III-1 Les différents types de toxicité.....	10
III-2 Toxicité des plantes.....	10
III-3 Études de la toxicologie conventionnelle réalisées en expérimentation animale.....	11
III-4 Hépatotoxicité.....	
III-4.1 Tests hépatiques.....	12
III-4.1.1 Bilirubine.....	12
III-4.1.1.1. Signification clinique.....	12
III-4.1.2. Transaminases.....	13
III-5 Néphrotoxicité.....	14
III-5.1 Bilan sanguin.....	14
III-5.1.1 Créatinine.....	14
III-5.1.1.1 Créatinine plasmatique en clinique.....	14
III-5.2. Uré.....	15
III-5.2.1. Urée en clinique.....	15

Partie pratique

Matériel et méthode

IV-1 Matériel végétal	16
IV-1.1 Test d'humidité.....	16
IV-2 La méthode d'extraction des antioxydants.....	17
IV-2.1 Optimisation des conditions de l'extraction par le plan de Box-Behenken.....	17
IV-3 Dosage des antioxydants.....	19
IV-3.1 Dosage des polyphénols totaux	
IV- 3.2 Dosage des flavonoïdes	19
IV-3.3 Dosage des tannins.....	19
IV-4 Détermination de l'activité antioxydant.....	20
IV-4.1 Le pouvoir réducteur.....	20
IV-4.1.1 Le test de chlorure ferrique (FeCl ₃).....	20
IV-4.1.2 Le test de phosphomolybdate.....	20
IV-2-Le pouvoir anti radicalaire.....	20
IV-2-1-Le test de DPPH*.....	20
IV-1-2-Le test d'ABTS ^{o+}	21

IV-5 Matériel animal.....	22
IV-5.1 Animaux.....	22
IV-5.2 Etude de la toxicité sub-chronique	22
IV-6 Bilan biochimique sanguin.....	23
IV-7 Bilan rénale.....	24
IV-7.1 Dosage de l'urée.....	24
IV-7.2 Dosage de la créatinine.....	25
IV-8 Bilan hépatique.....	25
IV-8.1 Dosage des transaminases ALAT et ASAT	25
IV-8.2 Dosage de la bilirubine	26
IV-9 Etudes histopathologies.....	27
IV-9.1 Prélèvement d'organe	27
IV-9.2 Fixation.....	28
IV-9.3 L'inclusion.....	28
IV-9.4 Enrobage à la paraffine.....	29
IV-9.5 Confection des blocs.....	29
IV-9.6 Réalisation des coupes au microtome.....	29
IV-9.7 Coloration	29
IV-9.8 L'étude microscopique.....	30
V-Résultats et discussions	
V-1 Humidité.....	31
V-2 Optimisation des conditions d'extraction.....	32
V-2.1 Analyse des résultats.....	32
V-2.2 Validation du model.....	34
V-2.2.1 Coefficient de détermination (R^2)	34
V-2.2.2 Model global et manque d'ajustement.....	35
V-2.2.3 Effet des facteurs (coefficients).....	35
V-2.2.4 Analyse du modèle mathématique.....	38
V-2.2.5 Paramètres optimaux.....	38
V-3 Dosage des antioxydants.....	39
V-3.1 Les polyphénols totaux	39
V-3.2 Les flavonoïdes.....	40
V-3.3 Les tannins.....	41
V-4 Evaluation des activités antioxydantes	42
V-4.1 Pouvoir réducteur.....	43

V-4.1.1 Réduction du chlorure ferrique.....	43
V-4.1.2 Réduction de phosphomolybdate.....	44
V-4.2 Pouvoir anti-radicalaire	45
V-4.2.1 Neutralisation du radical DPPH*	45
V-4.2.2 Neutralisation du radical cationique ABTS ⁺ *	46
VI- Toxicité sub-chronique.....	48
VI-1-Paramètres biochimiques.....	49
VI-2-Paramètres hépatiques.....	50
VI-3- Paramètres néphrétiques.....	51
VI-4- Etude histopathologique.....	52
VI-4-1- Histologie hépatique.....	52
VI-4-2- Histologie rénale.....	54
<i>Conclusion et perspectives</i>	58-59

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.

L'effet préventif des plantes résulte de la présence d'un éventail de molécules biologiques dont les composés phénoliques, qui s'opposent à l'action néfaste des radicaux libres source de stress oxydatif ; situation impliquée dans la plupart des maladies humaines telles que le diabète, les maladies neurodégénératives, les maladies cardio-vasculaires et certains types de cancers (Evans, 2007 ; Hussain et al., 2011 ; Leandro et al., 2012).

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin, 2001). Néanmoins, des accidents de mortalité peuvent être enregistrés, due à la toxicité, et suite à une mauvaise connaissance de la plante.

La toxicité est une notion relative et varie en fonction de la partie de la plante étant extraite ou mangée et les quantités prises. Elle être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, les médicaments et les contaminants. (Saad et al. 2006). Cependant, il est essentiel que les composés de l'extrait brut soient testés pour leur toxicité, bien que la plupart des tests ne mesurent actuellement que la toxicité aiguë. Ces tests ne fournissent pas d'informations sur les réactions indésirables qui pourraient résulter de l'exposition à long terme de ces espèces (Soumyanath, 2006)

L'extraction de principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale (Jokić et al., 2010 ; Bonnaillie, et al., 2012). En raison de la composition complexe des extraits de plantes et la présence des composés bioactifs, des méthodes analytiques divers ont été rapportées pour la quantification de ces constituants (Ohkoshi et al., 2009 ; Dykes et al., 2011).

Dans notre pays, il existe plus de trois mille cinq cents espèces de plantes médicinales (Hilmi, 2004), dont le figuier *Ficus carica* est l'un des arbres fruitiers les plus importants dans le bassin méditerranéen. Ces feuilles, contenant des composés phénoliques à haute propriétés pharmacologiques (furanocoumarines, flavonoïdes, acides phénoliques, phytostérols) (Teixeira

et *al.*, 2006), sont très utilisées dans la médecine traditionnelle pour soigner les brûlures et les infections de la peau.

L'Algérie est parmi les pays méditerranéens producteurs de figes, un patrimoine qui est représenté par de nombreuses variétés, et afin de tirer bénéfice de l'aspect thérapeutique de ces feuilles et pour une meilleure valorisation, une bonne maîtrise des conditions d'extraction de ses polyphénols s'avère nécessaire, dont s'inscrit l'objectif de la présente étude qui consiste à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Ficus carica* en appliquant le modèle de plan d'expérience Box-Behnken, et également à étudier la toxicité sub-chronique de l'extrait optimisé sur un modèle animal *in vivo*, après avoir caractérisé sa composition phénolique et son pouvoir antioxydant.

Synthèse

Bibliographique

I-1 Historique

La figue, fruits très ancien, est connu partout dans le monde et dont l'histoire commence depuis l'antiquité, elle est reconnue comme fruit sacré figurant dans les livres saints, dont le coran ou citée dans la « Sourate Attine » et dans nombreux versets. La culture des figues dans leur mère patrie l'Anatolie, remonte à 3 000 - 2 000 ans avant Jésus Christ. Avec le temps, elle s'est répandue dans tout le bassin méditerranéen (**El-khaloui, 2010**).

I-2 Description botanique

Le figuier dans le nom botanique est ; à un qualificatif qui signifie Verrue pour *Ficus* (le lait de figuier pour soigner la verrue) et *carica* fait allusion à une région en Turquie. Il appartient à la famille des Moracées qui comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre *Ficus* décrit par Linné (**Rameau et al, 2008**).

Tableau I : Classification botanique du figuier (**Joseph et Raj., 2011**)

Règne	Végétal
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnolipsida
Ordre	Rosales
Famille	Moracées
Genre	<i>Ficus</i>
Espèce	<i>Ficus carica</i>

Le figuier appartient au genre *Ficus* qui possède 850 espèces différentes (**lansky et Paavilainen, 2011**). Le figuier est un petit arbre, le plus souvent de trois à quatre mètres de haut, mais qui, selon les variétés, peut atteindre jusqu'à dix mètres dans des conditions climatiques ou d'environnement près des sources d'eau. (**Haesslein et Oreiller, 2008**).

Ces feuilles sont caduques, rugueuses, finement velues, assez grandes peuvent atteindre 25cm de long. Elles sont munies d'un long pétiole et d'un limbe palmatilobé, profondément divisé en trois à sept lobes crénelés (le plus souvent cinq) de forme variable, séparés par des sinus arrondis (**Couplan, 1998**).

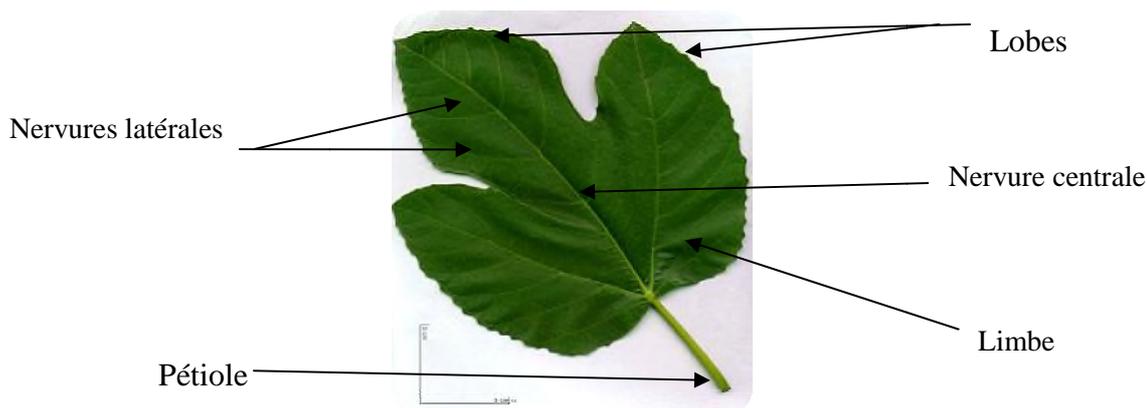


Figure N°1 : Aspects morphologiques de la feuille de *Ficus Carica* (Haesslein et Oreiller, 2008).

I-3 Composition phytochimique de la feuille du figuier

Les feuilles du figuier contiennent un nombre considérable de composés bénéfiques à savoir les polyphénols et les flavonoïdes, qui agissent en tant qu'antioxydants (El-Shobaki et al., 2010).

Tableau II : Composition chimique de la feuille du figuier (El-Shobaki et al., 2010)

Composition chimique	Feuille de figue(%)
Humidité	65.90
Cendre	5.30
Protéine	5.90
Lipide	0.81
Fibre	4.50
Hydrates de carbone	17.59

I-4 Utilisation thérapeutique de la feuille du figuier

Plusieurs études ont démontré que les feuilles du figuier ont des propriétés pharmacologiques très intéressantes.

Serraclara et al. (1998) ont rapporté qu'une décoction des feuilles de figuier exerce un effet hypoglycémique sur les patients atteints de diabète de type I.

Canal et al. (2000) ont utilisé un extrait chloroformique, obtenu également à partir d'une décoction de feuilles du figuier pour diminuer le cholestérol chez les rats atteints de diabète.

Les feuilles du figuier et les figues séchées peuvent également être utilisées comme aliment de bétail. Enfin, les précieuses feuilles réduiraient le taux des triglycérides chez les animaux, contribuant ainsi à la bonne santé des artères (**Jeddi, 2009**).

D'après **Jeddi (2009)**, les utilisations du latex sont très diverses, mais les plus remarquable, c'est son utilisation comme source de protéase pour la coagulation du lait, d'où il sert pour l'isolation d'une enzyme digestive des protéines. Cette enzyme (la ficine) peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire pour l'attendrissement des viandes (**Bruneton, 1999**).

En plus de son usage comme plante ornementale intérieure ou extérieure, certaines espèces de figuier sont cultivées pour la production de latex qui sert à fabriquer du caoutchouc, ainsi pour des applications comme lotion contre les piqûres d'insecte, les morsures et les verrues, et même contre les vers intestinaux (**Anonyme I**).

II- Les plans d'expériences

II-1 Historique

Les plans d'expériences sont issus de méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation. Les premiers scientifiques, à avoir posé le problème de l'organisation des essais, sont des agronomes. Ils avaient en effet beaucoup de paramètres à étudier, mais sans avoir la possibilité de multiplier le nombre d'expériences. De plus, la durée des expériences constituait une contrainte supplémentaire forte.

C'est Fisher qui, pour la première fois en 1925, proposa une méthode avec laquelle on étudiait plusieurs facteurs à la fois. Cette méthode fut reprise, puis développée par des statisticiens et des mathématiciens qui définirent des tables d'expériences permettant de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer sans diminuer la pertinence de la campagne d'essais.

Les grandes entreprises se sont vite intéressées à cette méthodologie dans le cadre de l'approche qualité à la suite des travaux du Docteur Taguchi, qui a fortement contribué à l'expansion de l'utilisation des plans d'expériences en milieu industriel au Japon dans les années 1960. Au cours de ces dernières années, cette méthodologie, du fait de la pertinence des informations apportées, s'est développée dans la plupart des secteurs d'activités (**Faucher, 2006**).

II-2 Principe

Il consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse (**Faucher, 2006**).

L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expériences » (**Tinsson, 2010**).

Il existe différents types de plans d'expérience, qui peuvent être toutefois regroupés en grandes familles:

1. Les plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux ;
2. Les plans factoriels à plus de deux niveaux ;
3. Les plans en blocs complets ou incomplets ;
4. Les plans de surface de réponse ;
5. Les plans de mélange ;
6. Les plans optimaux (**Chagnon, 2005_a**).

Chacun de ces plans, diffère selon ses propriétés, permet de résoudre certains problèmes particuliers. On peut cependant diviser les plans d'expériences en deux grandes catégories :

- Les plans pour étudier (estimer et comparer) les effets des paramètres ;
- Les plans pour régler les paramètres afin d'atteindre un optimum (**Faucher, 2006**).

II-3 Terminologie

Réponse : grandeur physique étudiée (**Vivier, 2002**).

Facteurs : sont les variables qui peuvent modifier la réponse (**Goupy et Creighton, 2006**).

Niveau d'un facteur : La valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience (**Goupy et Creighton, 2006**).

Domaine d'étude: domaine expérimental délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés (**Chaabouni et al., 2011**).

Plan d'expérimentation : matrice déclinant l'ensemble des conditions expérimentales, imposées aux variables naturelles pour la réalisation des différents essais, dans le cadre du plan d'expériences choisi (**Chaabouni et al., 2011**).

Matrice d'expériences : indique les niveaux pris par les variables codées aux différentes expériences (**Chaabouni et al., 2011**).

II-4 Plans de surfaces de réponse (RSM)

La méthode des surfaces de réponse (RSM) est une technique d'analyse statistique puissante, bien adaptée à la modélisation des processus complexes où la réponse est influencée par plusieurs variables et dont l'objectif est d'optimiser cette réponse. Box et Wilson sont les premiers à avoir introduit la théorie de la RSM en 1951. Aujourd'hui, elle est la méthode la plus couramment utilisée pour l'optimisation des processus.

Les RSM peuvent être utilisés pour modéliser et prédire l'effet des différents paramètres expérimentaux sur une réponse bien définie, ainsi que l'identification des interactions entre les paramètres expérimentaux que d'autres techniques peuvent négliger. La RSM est largement employée dans le domaine de l'ingénierie et de la fabrication où de nombreux paramètres sont impliqués dans un processus (**Elsayed et Lacor, 2010**).

Pour ce modèle, il existe différents types de plans, dont les plus connus et les plus utilisés sont les plans composites centrés, les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans hybrides (**Chagnon, 2005b**).

Le modèle mathématique utilisé dans la méthode des surfaces de réponse est un modèle du second degré :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

(Raissi et Farsani, 2009)

Où

y : est la réponse (la grandeur d'intérêt).

x_i, x_j : sont les variables.

$\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ii}$: sont les coefficients de polynôme.

ε : est l'erreur aléatoire.

II-5 Les plans Box-Behnken (BBD)

Ce sont des structures symétriques dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux (Chagnon, 2005_b).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. Pour quatre facteurs, ce plan est construit sur un hypercube à quatre dimensions. Les points expérimentaux ne sont pas placés aux sommets du cube ou de l'hypercube, mais au milieu des arêtes ou au centre des faces (carrés) ou au centre des cubes. Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère ou sur une hypersphère suivant le nombre de dimensions. Des points, sont ajoutés au centre du domaine d'étude (Goupy et Creighton, 2006).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est illustré par la figure suivante :

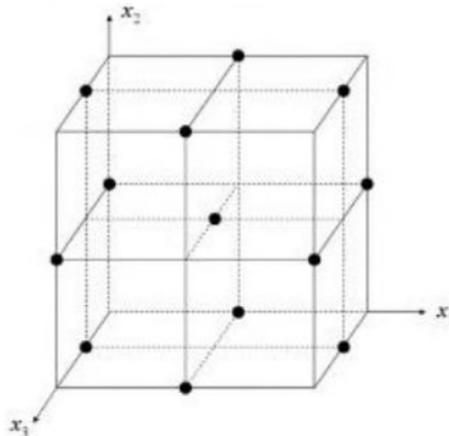


Figure N° 2: Illustration du plan Box-Behnken pour trois facteurs (Lawson, 2010).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, est un cube possédant 12 arêtes à qui sont ajoutés, habituellement trois points d'expériences, au centre du domaine d'étude. Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs possède donc 15 essais (Tableau III) (Goupy et Creighton, 2006).

Tableau III: Les niveaux des facteurs codés pour un plan Box-Behnken à trois facteurs (**Ferreira et al., 2007**).

Experiment	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
	0	0	0

II-6 Quelques applications des plans Box-Behnken

- Optimisation des processus de sorption, exemple : Yetilmezsoy et ses collègues ont optimisé l'élimination du Pb (II) de l'eau par les coques de pistache (*Pistacia vera L.*) en utilisant le plan Box-Behnken.
- Optimisation des méthodes chromatographiques, exemple : l'optimisation de l'extraction par chromatographie en phase supercritique des flavonoïdes à partir du Kouzou (*Pueraria lobata*) (**Wang et al., 2008**).
- Optimisation de l'électrophorèse sur papier, exemple : Hows et ses collègues ont optimisé une séparation simultanée des sulfamides, d'inhibiteurs de la dihydrofolate réductase et des β -lactamines par électrophorèse capillaire.
- Optimisation des fermenteurs, exemple : Optimisation de la production du biohydrogène à partir du sirop de sorgho (**Saraphirom et Reungsang, 2010**).

III- Définition de la toxicité

La toxicologie c'est une discipline scientifique qui s'occupe des toxiques, de leurs propriétés, de leurs devenir dans l'organisme, de leur mode d'action, de leurs recherches dans les différents milieux et des moyens permettent de combattre leur nocivité (**Alain, 2005**).

Un toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort (**Viala et Botta, 2007**).

La toxicité est la capacité inhérente d'une substance de produire des effets délétères sur l'organisme (altération d'un ou de plusieurs organes ou fonction). L'intensité de cette action est généralement en fonction de la dose administrée (**Robert, 2007**).

III-1 Les différents types de toxicité

Selon la durée de l'application du toxique, on distingue différentes sorte de toxicité à savoir l'aigue et la subchronique.

Tableau IV: Les différents sorts de toxicité (**Claverie et Hedde ; 2008**).

Toxicité aigue	Toxicité sub-chronique	Toxicité chronique
Le toxique est administré en une seule fois à fort dose. la toxicité relative des produits est caractérisée par une valeur, la dose létale 50.	Le toxique est administré plusieurs fois pendant une période plus longue, n'excède pas trois mois.	Le toxique est administré plusieurs fois à long terme de période de trois mois à plusieurs années.

III-2 Toxicité des plantes

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, les médicaments et les contaminants.

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables

par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques (Trevoux et al., 2000 ; Saad et al., 2006).

La toxicité est une notion relative et varie en fonction de la partie de la plante étant extraite ou mangé et les quantités prises. Cependant, il est essentiel que les composés de l'extrait brut soient testés pour leur toxicité, bien que la plupart des tests ne mesurent actuellement que la toxicité aiguë. Ces tests ne fournissent pas d'informations sur les réactions indésirables qui pourraient résulter de l'exposition à long terme de ces espèces (Soumyanath, 2006).

III-3 Études de la toxicologie conventionnelle réalisées en expérimentation animale

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition, des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques. Les facteurs propres à chaque individu peuvent modifier l'absorption, la distribution, l'excrétion, les transformations métaboliques et la sensibilité du récepteur dans l'organe cible (Tron et al, 2002).

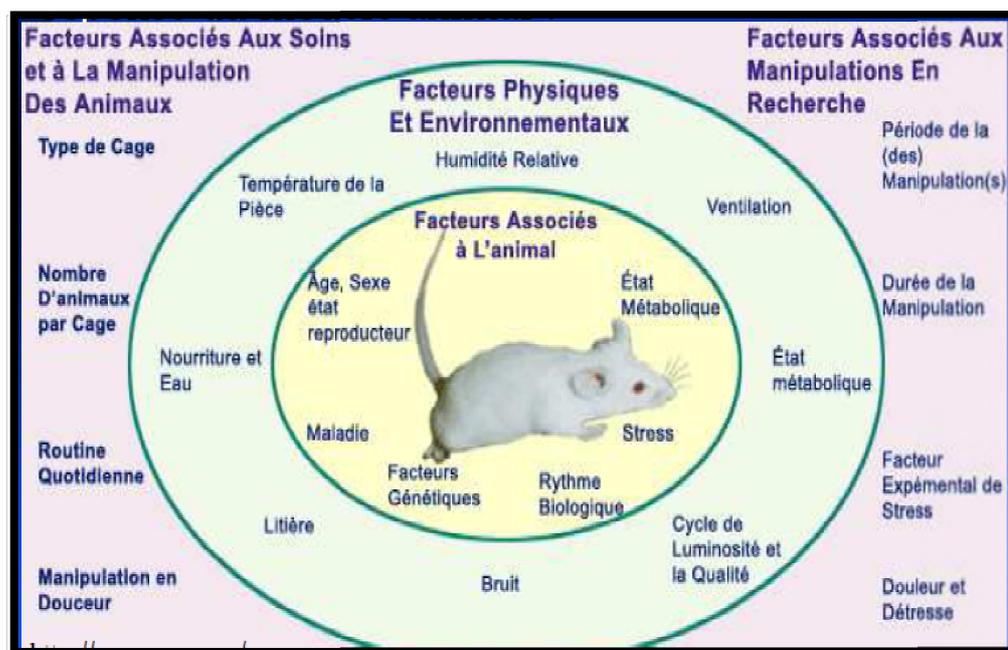


Figure N° 03 : Facteurs affectant l'expérimentation animale (Desfontis, 2008).

III-4 Hépatotoxicité

III-4.1 Tests hépatiques

Le bilan hépatique (BH) comprend des dosages de substances sanguines qui apportent simplement une orientation sur l'existence, le BH consiste à doser la bilirubine, les transaminases et la phosphatase alcaline dans un échantillon de sérum. ces analyses biochimiques peuvent aider au diagnostic différentiel des pathologies suivantes (**Gaw et al., 2004**) :

- Obstruction des voies biliaires.
- Lésions hépatocytaires aiguës.
- Maladies hépatiques chroniques.

III-4 .1.1 Bilirubine

La bilirubine conjuguée est éliminée dans la bile (**Gaw et al., 2004**) et une partie parvient dans la circulation générale « bilirubine directe » et excrétée par le rein. L'excrétion bilirubine est de 200 à 250mg par jour, dont 15% environ sont à nouveau réabsorbés par l'intestin, uniquement sous forme conjuguée (**Silbernagl et Despopoulos, 2008**).

III-4 .1.1.1 Signification clinique

La bilirubine présente dans le plasma est principalement sous forme non conjuguée (environ 95%) ; dans la mesure où elle est liée aux protéines, elle n'est donc pas filtrée par les glomérules rénaux et, chez les individus sains, elle n'est donc pas filtrée dans l'urine. Une bilirubine reflète une augmentation de la concentration plasmatique en bilirubine conjuguée, et elle est toujours pathologique (**Marchall et Bangert, 2005**). Normalement la concentration plasmatique en bilirubine est de 3 à 10mg/L environ. Lorsque cette concentration dépasse 18mg/L environ, la conjonctive de ml'œil (sclérotique) et ensuite la peau deviennent jaunes : il s'agit donc d'un ictère (**Silbernagl et Despopoulos, 2008**). Cet ictère provient lorsque les voies biliaires sont obstruées ; par conséquent la bilirubine n'est pas excrétée et sa concentration sérique augmente. de ce fait le patient devient ictérique (**Gaw et al., 2004**).

L'ictère peut provenir d'une hémolyse ou de la maladie de Gilbert, une affection héréditaire du métabolisme de la bilirubine. Dans l'hymolyse, l'hyperbilirubinémie est due à une augmentation de la prduction de bilirubine, qui dépasse les capacités de captation et de conjugaison du foie (**Valdiguié, 2000 ; Gaw et al ., 2004 ; Marchall et Bangert, 2005**).

L'hyperbilirubinémie conjuguée est associée à une baisse de l'excrétion de la bile due à des maladies du foie (hépatique ou cirrrose), ou cholestasis intrahépatique ou extrahépatique (Friedman et Young, 2001 ; Burtis *et al.*, 2005).

III-4.1.2 Transaminases

La mesure de l'activité des différentes enzymes du sérum humain a pris depuis quelques années une grande importance. Ces enzymes se trouvent normalement dans le sérum en faible quantité et à des taux bien déterminés. Dès qu'un organe ou un tissu est lésé, il libère dans la circulation générale des enzymes qui lui sont propres. Par exemple, pour déterminer l'organe lésé au lieu de faire une biopsie d'organe il est beaucoup plus facile et confortable pour le malade d'effectuer une prise de sang (Valdigué, 2000).

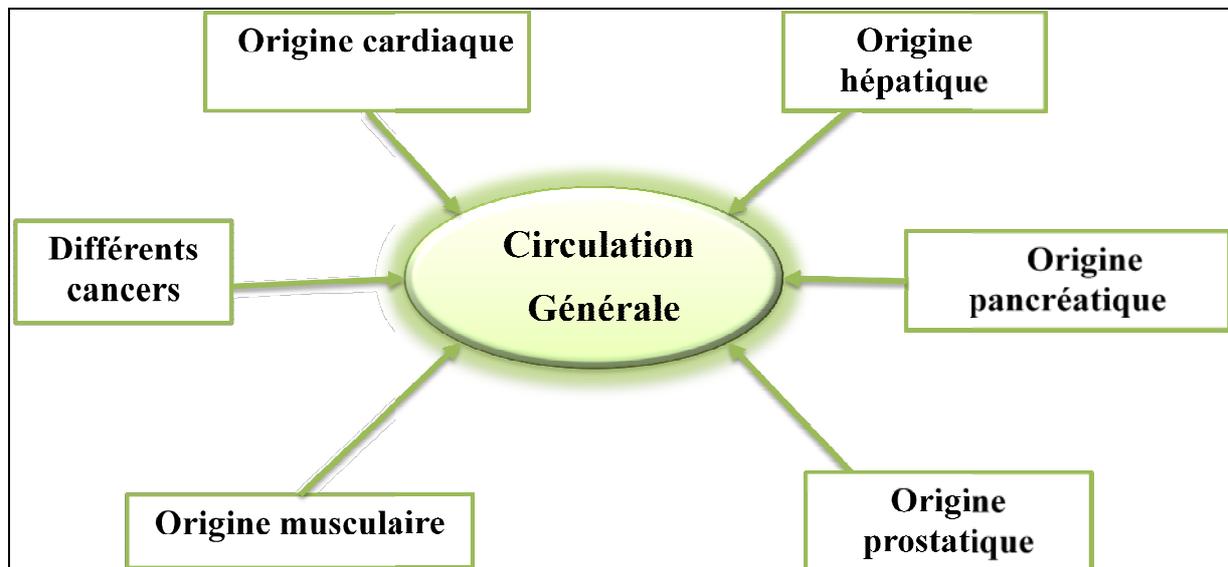


Figure n° 04: Origine des différentes enzymes présentes dans le sérum humain (Valdigué, 2000).

Les activités des deux transaminases, ALT (Alanine aminotransférase) et AST (Aspartate aminotransférase), sont largement utilisées dans la pratique clinique comme indice sensible, quoique non spécifique, de lésion hépatocytaires aiguës, indépendamment de toute considération étiologique (Gaw *et al.*, 2004). L'activité ALT est plus spécifique du foie que l'AST. L'augmentation de l'activité des aminotransférases conduit à une cytolyse ; les

activités plasmatiques peuvent être 20 fois plus élevées que la limite supérieure de la normale en cas d'hépatite (**Marchall et Bangert, 2005**). Les causes des lésions hépatiques sont l'hépatite- quelle qu'en soit l'origine- et les lésions toxiques qui peuvent accompagner un grand nombre d'agression pour le foie, dont un surdosage de médicament. Les lésions hépatiques aiguës peuvent également résulter d'un choc, d'une hypoxie sévère ou d'une insuffisance cardiaque aiguë (**Gaw et al., 2004**).

III-5 Néphrotoxicité

Le rein est l'un des principaux organes cibles de la toxicité induite par les xénobiotiques du fait de ses fonctions de filtration, transport, réabsorption et métabolisme de substances chimiques. Les néphrotoxicités d'origine iatrogène, professionnelle ou environnementale seraient l'étiologie la plus fréquente d'atteinte rénale aiguë dans la population générale. Elles sont généralement provoquées par l'usage des médicaments ou par une infection. L'exposition à ces substances néphrotoxiques peut induire des effets transitoires ou définitifs et concerner les structures glomérulaires, tubulaires et plus rarement le tissu interstitiel.

Les patients atteints de déficience rénale chronique ou aiguë souffrent de nombreuses complications pouvant conduire à une dialyse, une transplantation ou une mort prématurée.

Même si les atteintes rénales peuvent être classées en fonction du type de structure touchée ou du mécanisme mis en œuvre, chaque molécule est susceptible d'induire une néphrotoxicité par un mécanisme qui lui est propre. (**Gaw et al., 2004**).

III-6 Bilan sanguin

III-6.1 Créatinine

La créatinine (acide N-méthylguanidoacétique) et de sa forme phosphorylée, la créatinine phosphate (α guanidophosphate) servent d'un tampon ATP dans le métabolisme musculaire. Le résidu phosphate de la créatinine phosphate à un niveau élevé du potentiel chimique comme dans l'ATP et est donc facilement transférés à l'ADP. Inversement, lorsqu'il ya un excès d'ATP, le phosphate de créatinine peut provenir de l'ATP et de la créatinine. Les deux processus sont catalysés par de la créatinine kinase.

S'il n'y a pas un risque de baisse sévère du niveau de l'ATP au cours de contraction, le niveau peut être maintenu pendant un temps par synthèse de l'ATP à partir de la créatinine phosphate de l'ADP. Dans une réaction non enzymatique, de petites quantités de créatine et de la

créatine phosphate de cycliser pour former en permanence de la créatinine, qui ne peuvent plus être phosphorylée et est donc éliminé avec l'urine. (Marchall et Bangert, 2005).

III-6.1.1 Créatinine plasmatique en clinique

La créatinine est un métabolite de créatinine, excrété complètement dans l'urine par filtration glomérulaire (Frank, 1992). Le taux plasmatique et la quantité de créatinine éliminée quotidiennement dans les urines constituent des paramètres biologiques remarquablement fixes (Valdigué, 2000). Pour ces raisons la mesure de la concentration en créatinine est utilisée principalement pour l'évaluation de la fonction rénale (perfusion rénale détériorée, perte de fonction du néphron) et le contrôle des dialyses rénales (Friedman et Young, 2001 ; Burtis et al ., 2005), des données sur sa concentration sanguine et urinaire peuvent être utilisés pour estimer le taux de filtration glomérulaire (Frank, 1992).

III-6.2 Urée

L'urée est le terme ultime principal du catabolisme protéique chez l'homme. Atoxique, très soluble, elle s'élimine à 90% dans les urines, un peu dans la sueur et la salive, très peu dans les matières fécales. Le dosage de l'urée dans le sang ou azotémie et dans l'urine est le paramètre le plus ancien de la biochimie clinique ; associé aux dosages du glucose et des éléments de l'iogramme, il reste aujourd'hui l'un des plus demandés. En néphrologie pure, le dosage de l'urée plasmatique et urinaire est dépassé par celui de la créatinine, mais il reste un précieux élément d'appoint (Valdigué, 2000).

III-6.2.1 Urée en clinique

Bien que la concentration plasmatique de l'urée soit souvent utilisée comme indice de la fonction glomérulaire, le dosage de la créatinine plasmatique est un moyen d'évaluation plus précis. Un taux élevé indique généralement une atteinte glomérulaire ou une hépatotoxicité (Frank, 1992), mais la concentration peut être aussi modifiée par un régime riche en protéines, d'un catabolisme des protéines augmenté, après une hémorragie gastro-intestinale, légère déshydratation, état de choc, insuffisance cardiaque ou traitement avec glucocorticoïdes (urémie pré-rénal) (Young, 2000 ; Friedman et Young, 2001).

Partie

pratique

Matériels

Et

Méthodes

IV-1 Matériel végétal

Notre étude est effectuée sur les feuilles de figuier commun *Ficus carica*, récoltées au début de mois de Septembre de l'année 2013, dans la commune de Samoun (Bejaia).

La récolte est faite manuellement de manière aléatoire, au hasard, de plusieurs arbres adultes, sur la base de critères établis ; feuilles complètes, saine, de taille et de couleur uniformes. Après la récolte, les feuilles sont nettoyées, débarrassées de poussières et du duvet qui souvent les recouvre, des traces de latex et d'autres impuretés avec de l'eau. Les feuilles sont alors séchées à l'ombre. Une fois le séchage est fait, ces feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique (IKAWORKS, TYPE A11.basic), afin d'obtenir une poudre très fine. Cette dernière est tamisée en utilisant un tamis manuel, et la poudre ainsi obtenue ($\Phi \leq 250 \mu\text{m}$) est conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière et d'humidité dans un récipient hermétique et opaque.



Figure N°05: Photographie des feuilles du *Ficus carica* et de la poudre obtenue.

IV-1.1 Test d'humidité

La détermination de l'humidité est réalisée selon la méthode décrite par **Doymaz et al., (2004)**. Une prise d'essai d'échantillon (0,1g, 1g, 10g) est séchée dans une étuve à $103^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à poids constant. Le taux d'humidité des différents échantillons est calculé selon la formule suivante.

$$H (\%) = \frac{P_{\text{avant}} - P_{\text{après}}}{P_{\text{avant}}} \times 100$$

Où:

H (%) : Taux d'humidité en pourcentage.

P_{avant} : Poids de l'échantillon avant séchage.

P_{après} : Poids de l'échantillon après séchage.

IV-2 La méthode d'extraction des antioxydants

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est la technique utilisée dans la présente étude afin d'extraire les antioxydants de feuilles de *ficus carica*. Cette technique est utilisée comme une méthode d'extraction à l'échelle du laboratoire car elle offre plusieurs avantages, telles que la consommation réduite d'énergie, de faibles quantités de solvants organiques moins toxiques ce qui réduit les quantités de déchets et permet d'obtenir de meilleur rendement par rapport aux méthodes classiques d'extraction (Grigonis et al., 2005).

Une prise d'essai de la poudre des feuilles (1g) est mise en contact dans une fiole avec un volume de solvant. L'ensemble est introduit dans le micro-onde et subira une extraction à une puissance choisie pendant un temps d'extraction donnée.

IV-2.1 Optimisation des conditions de l'extraction par le plan de Box-Behnken

Une étude de l'optimisation des conditions d'extraction est indispensable, pour évaluer les meilleures conditions pour l'extraction des polyphénols de feuilles de *Ficus carica*.

Cette dernière est réalisée en utilisant la méthode de surface de réponse (RMS), un modèle mathématique polynomial sera optimisé, dont le type de modèle choisi est le plan de Box-Behnken (Goupy, 2006)

Quatre facteurs (X_1, X_2, X_3, X_4) à trois niveaux (-1,0,+1) sont appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols, à savoir : la puissance, le temps d'extraction, la nature du solvant et le rapport (masse /solvant d'extraction) désignés par X_1, X_2, X_3 , et X_4 respectivement.

Les niveaux bas, moyens sont représentés dans le suivant :

Tableau V : les niveaux des paramètres choisis.

X_1 puissance (W)	X_2 temps (sec)	X_3 solvants (%)	X_4 masse /solvant
(-1) 700	(-1) 60	(-1) 30	(-1) 1 /15
(0) 500	(0) 90	(0) 50	(0) 1 /10
(+1) 300	(+1) 120	(+1) 70	(+1) 1/5

Le plan Box-Behnken comprend 27 essais. Le modèle expérimental utilisé est représenté dans le tableau VI.

Tableau VI : Le model expérimental du plan de Box-Behnken utilisé.

Essai n°	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4
1	0	0	0	0
2	+1	+1	0	0
3	0	+1	0	+1
4	0	0	-1	+1
5	0	0	+1	+1
6	0	0	+1	-1
7	+1	0	0	-1
8	-1	-1	0	0
9	0	+1	+1	0
10	0	0	0	0
11	+1	-1	0	0
12	0	0	-1	+1
13	-1	0	0	-1
14	+1	0	+1	0
15	0	0	0	0
16	-1	0	0	+1
17	0	-1	-1	0
18	0	-1	0	-1
19	-1	+1	0	0
20	0	+1	-1	0
21	-1	0	-1	0
22	0	+1	0	-1
23	-1	0	+1	0
24	+1	0	-1	0
25	0	-1	0	+1
26	0	-1	+1	0
27	+1	0	0	+1

Les résultats expérimentaux du plan d'expérience de Box-Behnken sont analysés par le logiciel JMP (qui est un logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expérience).

L'extraction par microonde est effectuée après avoir eu les points optimaux désignés par Box-Behnken.

IV-3 Dosage des antioxydants

IV-3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits de feuilles *Ficus Carica* est estimée selon la méthode décrite par **Velioglu et al. (1998)**.

Les 200 µl d'extrait sont additionnées de 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois), auquel un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium (60g/l) est ajouté après cinq minutes. L'absorbance de mélange, incubé pendant 90 mn à l'abri de la lumière, est mesurée à 725 nm.

La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en mg équivalent d'acide gallique (E.A.G)/g de MS, est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (Annexe II).

IV-3.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de feuilles étudiées est évaluée selon la méthode décrite par **Quettier-Deleu et al. (2000)**.

1,5 ml d'extrait sont ajoutés à 1,5 ml de chlorure d'aluminium (2%). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm.

La teneur en flavonoïdes, exprimée en mg d'équivalent de quercétine (E.Q)/g de MS, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de la quercétine (Annexe II).

IV-3.3 Dosage des tannins

La teneur en tannins des extraits de feuilles étudiées est estimée selon la méthode décrite par **Hagerman et Butler (1978)**.

Une solution de sérum albumine bovine (BSA) est préparée dans un tampon acétate (0,2M) à une concentration de 1mg/ml. Un volume de 2ml de cette solution est ajouté à 1ml d'extrait. Le mélange bien agité est incubé à 4°C pendant 24 heures.

Une centrifugation à 4000tr pendant 15minutes est effectuée, et le culot récupéré est dissout dans 4ml de la solution SDS /TEA, pendant 15minutes. Après la mesure de l'absorbance à 510 nm, le mélange est additionné à 1ml de chlorure de fer (FeCl₃ 0,01M) et laissé sous agitation, à l'obscurité pendant 15minute, avant la lecture de l'absorbance à 510 nm.

La teneur en tannins, exprimée en mg d'équivalent d'acide tannique (E.A.T)/g de MS, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de l'acide tannique (Annexe II).

IV-4 Détermination de l'activité antioxydant

L'activité anti-oxydante des extraits à été déterminé selon deux méthodes .la première est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques par différents testes réduction de chlorure ferrique de phosphomolybdate). La deuxième évalue le pouvoir anti-radicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation de différents radical (DDPH*et ABTS^{o+}) par les antioxydants présents dans les extraits.

IV-4.1Le pouvoir réducteur

IV-4.1.1 Réduction de chlorure ferrique

La réduction de chlorure ferrique (FeCl₃) des extraits de feuilles étudiées est déterminée selon la méthode décrite par **Lim et al., (2006)**.

Pour 1ml d'extrait sont ajouté 1ml de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 2.5ml de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50°C pendant 30mn dans un bain marie, 1.5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés, le mélange est centrifugé à 3000g pendant 20mn.

Ensuite, 1,5ml du surnageant sont additionnés de 1,5ml d'eau distillé et de 0,5ml de chlorure ferrique (0.1%), l'absorbance est mesurée à 700nm après 10minutes.

Le pouvoir réducteur des extraits est comparé à celui de quelques standards (l'acide gallique, l'acide ascorbique et la quercétine) obtenue dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

IV-4.1.2 Réduction de phosphomolybdate

La réduction de phosphomolybdate de l'extrait des feuilles de *ficus carica* étudiée a été évaluée par la méthode décrite par **El- Beshbishy et al., (2009)**.

Pour 200µl de l'extrait de feuilles sont ajoutées de 2ml de réactif de Molybdate. L'absorbance de l'extrait est mesurée à 695 nm après une incubation à 90°C pendant 90 mn au bain marie.

Le pouvoir réducteur des extraits est comparé à celui de quelques standards (l'acide gallique, l'acide ascorbique et la quercétine) obtenue dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

IV-4.2 Le pouvoir anti radicalaire

IV-4.2.1 Neutralisation de radical DPPH*

La neutralisation de radical DPPH* par l'extrait de feuilles étudiée est déterminé selon la méthode décrite par **Bourgou et al., (2008)**

Pour 0,5 ml de l'extrait, 2ml de DPPH* (6.10^{-5} M) sont ajoutées. Après une incubation de 30 mn à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesuré à 517nm.

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extraits est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH* :

$$PI\% = [1 - (Abs_{\text{Extrait}} / Abs_{\text{T}})] \times 100$$

Où :

Abs_{Extrait} : Absorbance de l'extrait, après 30mn, à 517 nm.

Abs_T : Absorbance de témoin, après 30mn, à 517 nm.

IV-4.2.1 Neutralisation de radical cationique ABTS^{*+}

Le pouvoir anti-radicalaire, par la neutralisation du radical cationique ABTS^{*+}, des extraits est évalué selon la méthode décrite par *Re et al., (1999)*.

Une solution aqueuse d'ABTS est préparée à une concentration finale de 7 mM. Afin d'activer la formation des formes cationique ABTS^{*+}, la solution est additionnée de persulfate de potassium (2,45 mM) et l'ensemble est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12-16 heures avant son utilisation.

Afin de mesurer l'activité antioxydante des extraits, la solution ABTS^{*+} est diluée avec de l'éthanol à une absorbance de 0,7 ($\pm 0,02$) à 734 nm. Un volume de 990 μ l de cette solution fraîchement préparée est ajouté à 10 μ l d'extrait, et l'absorbance est mesurée, chaque minute pendant 6 minutes, à 734 nm.

Le pouvoir anti-radicalaire des extraits est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS⁺ est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pouvoir anti-radicalaire de l'ABTS}^+ = \frac{\text{Absorbance de controle} - \text{Absorbance d'extrait}}{\text{Absorbance de control}} * 100$$

IV-5 Matériel animal

IV-5.1 Animaux

L'étude a été réalisée sur des souris swiss albinos de sexe femelle pesant entre 23 et 28g provenant de la faculté de pharmacie de Constantine.

Les animaux sont identifiées, et placées dans des cages transparentes en polypropylène, à une température ambiante de 25 à 30°C, et d'humidité relative de 50%, avec un cycle de 10/14 h (lumière/obscurité), et nourrit de granules d'aliment standard provenant de l'ONAB (Office National Alimentation Bétail), El-kseur (Bejaia), et l'eau de robinet.

La litière utilisée est la sciure renouvelée trois fois par semaine afin d'assurer le conditionnement hygiénique des souris.



Figure N°06 : Photographie des souris swiss albinos dans une cage transparente.

IV-5.2 Etude de la toxicité sub-chronique

L'étude expérimentale est menée conformément à la directive de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Directrice-423, adopté le 03 Octobre 2008.

La toxicité sub-chronique permet d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans une longue temps après l'administration répétée d'une substance.

La toxicité de l'extrait optimisé (*Eop*) de feuille de *figus carica*, est évaluée, sur des souris de souche albinos suisses de poids (23-29 g).

Afin d'étudier ses effets toxiques possibles ou changement du comportement normal ainsi que la mortalité, un nombre de 20 souris distribués en quatre groupes comportant chaque un cinq souris réparties d'une manière homogène intra lots (sexe, nombres, poids) ont été employés. Le groupe témoin reçoit une solution d'eau physiologique (0.9% solution de NaCl), tandis que les trois autres groupes reçoivent des doses différentes de l'extrait à étudié.

L'Éop est administré par voie orale pendant 28 jours consécutifs avec des doses de 200, 400 et 800mg/kg.



Figures N° 07 : Photographie de l'Administration orale de l'extrait du *Ficus carica*

Des contrôles périodiques de l'évolution du poids corporel des animaux, sont enregistrées chaque semaine tout au long de la période d'étude.

IV-6 Bilan biochimique sanguin

Le prélèvement du sang est effectué au niveau de la veine jugulaire, sur des souris laissées à jeun la nuit avant la collecte de sang. Les souris sont alors sacrifiées par décapitation sous anesthésie (figure N° 08).



Figure N° 08 : Photographie du prélèvement du sang des souris.

Le recueil de sang est effectué en utilisant des tubes héparines au cours de chaque prélèvement (figure N°09). Une centrifugation du sang est réalisée à 3000 tours/min pendant 15min, et le plasma récupéré sera utilisé pour évaluer les paramètres biochimiques à savoir ; le bilan hépatique (laboratoire privée MOALEK) et le bilan rénal (Clinique d'IHHEDADEN).



Figure N° 09: Photographie de la collecte du sang dans les tubes héparines vides et remplie du sang.

IV-7 Bilan rénale

IV-7.1 Dosage de l'urée

L'urée est dosée en cinétique selon la réaction suivant :



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée. (**Biomaghreb, 2008**).

- **Mode opératoire**

On verse dans chaque tube (blanc, standard et échantillon) 1ml de réactif de travail A ; Puis on ajoute 10µl d'Etalon urée dans le tube standard, et 10µl de plasma pour chaque échantillon, et après incubation à (37°C) pendant 5min, on ajoute 1ml de R4 dans chaque tube.après on mélange et on incube pendant 5min à la même température, et enfin on lit l'absorbance (A) du standard et les différents échantillons à 590nm. La quantité de l'urée dans le plasma est exprimée en mmol/l selon la formule suivante :

$$\text{Urée} = [\text{absorbance d'échantillon} / \text{absorbance de standard}] \times n$$

Avec : n= 0.50 g/l où n= 8.325 mmol/l

IV-7.2 Dosage de la créatinine

La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine. (Biomaghreb, 2007)

- **Mode opératoire**

On verse dans chaque tube (blanc, standard et échantillon) 1ml de réactif de travail ; Puis on ajoute 100µl de Créatinine dans le tube standard, et 100µl de plasma pour chaque échantillon, par la suite on mélange et on lit l'absorbance (A_1) après 30 sec, et l'absorbance (A_2) après 60 sec à 492 nm. La quantité de la créatinine dans le plasma est exprimée en µmol/L selon la formule suivante :

$$\text{Créatinine} = [\Delta \text{ absorbance Echantillon} / \Delta \text{ absorbance Standard}] \times n$$

Avec : $n = 20 \text{ mg/l}$ où $n = 176.8 \mu\text{mol/l}$

IV-8 Bilan hépatique

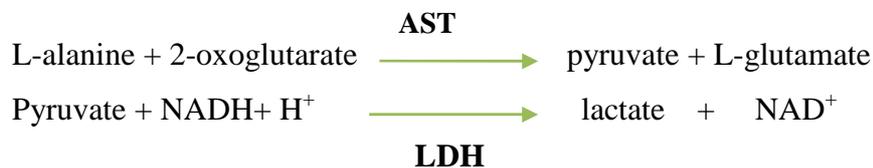
IV-8.1 Dosage des transaminases ALAT et ASAT

- **Transaminases ALAT (GPT)**

Principe

La transaminase ALAT catalyse la réaction entre la L-alanine et le 2-oxoglutarate. Le pyruvate formé est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée par la lactate-déshydrogénase (LDH), pour former du L-lactate et du NAD^+ .

Le pyridoxal phosphate agit comme une coenzyme dans la transamination. Il garantit une activation enzymatique complète.



La vitesse initiale de formation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALAT. Elle est déterminée par photométrie en mesurant la diminution de l'absorbance. (Biomaghreb, Décembre 2007)

- **Mode opératoire**

On verse dans chaque tube (blanc et échantillon) 1ml et 3ml de solution de travail respectivement puis incuber à la température choisie (25,30 ou 37°C), on ajoute 100µl et 300µl d'échantillon .mélanger et incuber 1min, puis mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1à 3 min à 340nm.

La quantité de l'ALAT dans le plasma est exprimée en U/L selon la formule suivante :

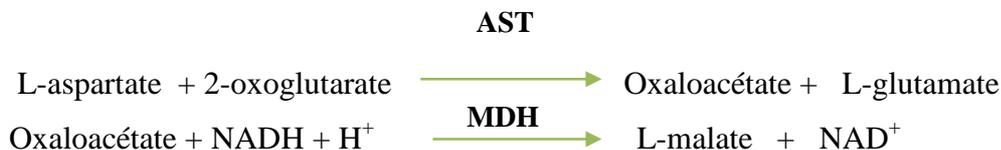
$$\mathbf{L'ALAT = \Delta Abs /min \times 1750}$$

➤ **Transaminases ASAT (GOT)**

- **Principe**

La Transaminases ASAT de l'échantillon catalyse le transfert du groupement amine entre la L-aspartate et le 2-oxoglutarate pour former de l'oxaloacétate et du L-glutamate. l'oxaloacétate réagit ensuite avec le NADH, en présence de malate-déshydrogénase (MDH), pour former du NAD⁺.

Le pyridoxal phosphate agit comme une coenzyme dans la transamination. Il garantit une activation enzymatique complète. (**Biomaghreb, 2007**)



- **Mode opératoire**

On verse dans chaque tube (blanc et échantillon) 1ml et 3ml de solution de travail respectivement puis incuber à la température choisie (25,30 ou 37°C), on ajoute 100µl et 300µl d'échantillon. Mélanger et incuber 1min, puis mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1à 3 min à 340nm. La quantité de l'ASAT dans le plasma est exprimée en U/L selon la formule suivante :

$$\mathbf{L'ASAT = \Delta abs /min \times 1750}$$

IV-8.2 Dosage de la bilirubine

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfaniliquediazoté. En présence de diméthylsulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale se couple

avec l'acide sulfaniquediazoté pour donner l'azobilirubine. Le dosage de la bilirubine directe se fait en l'absence de DMSO.

- **Mode opératoire**

Bilirubine totale : on verse dans chaque tube (blanc, standard) : 50µl de réactif 4 et 1ml de réactif 1 ; 50µl de réactif 4 et 1ml de solution de travail (B.T) respectivement et dans (blanc, échantillon) 50µl d'échantillon et 1ml de réactif 1 ; 50µl d'échantillon et 1ml de solution de travail (B.T) respectivement .mélanger et incuber exactement 5min à 37°C et lire l'absorbance à 555nm.

La quantité de la bilirubine dans le plasma est exprimée en µmol/L selon la formule suivante :

$$\text{Bilirubine totale} = \text{Abs d'échantillon} / \text{Abs de standard} \times [\text{Conc de standard}]$$

IV-9 Etudes histopathologies

IV-9.1 Prélèvement d'organe

.Après collection de sang, le cadavre est fixé en décubitus dorsal, sur une plaque en liège, en fixant solidement les quatre pattes à l'aide d'aiguilles de fixation, et une petite incision au niveau du périnée est pratiquée, afin de permettre l'introduction de la sonde d'incision. Une autopsie de la cavité abdominale est ensuite réalisée, et le rein et le foie sont alors isolés dans le but d'observer les changements histopathologies éventuels (poids, couleur, consistance, lésions, dimension).



Figure N° 10 : photographie d'un cadavre d'une souris fixé en décubitus dorsal.

IV-9.2 Fixation

Le rein et le foie une fois isolé est immergés immédiatement dans une solution de formol (10%). Cette étape a pour but la conservation des structures et le durcissement des tissus.

Après découpage, ils sont déposés dans des cassettes en plastique, puis passage vers les étapes d'inclusion, coupe et coloration qui ont été effectuées au niveau de l'anapath de l'hôpital de Franz Fanon.

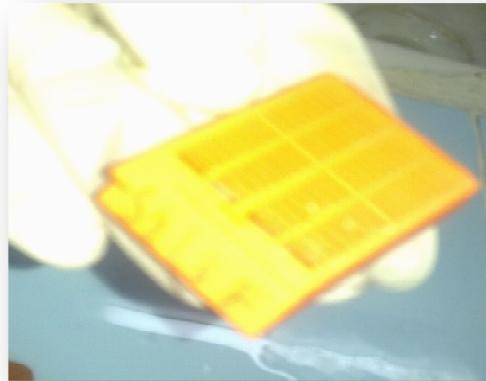


Figure N° 11 : Photographie des cassettes en plastique.

IV-9.3 L'inclusion

L'inclusion se fait d'une façon automatique d'aide d'un appareil de traitement de tissus. Celui est réglé sur un cycle de 18 heures, cet appareil réalise trois étapes successives de déshydratation, désalcoolisation et inclusion.

Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine, l'échantillon doit d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool puis immergé dans des bains de xylène avant d'être infiltré dans la paraffine.



Figure N°12: Photographie de l'appareille de l'inclusion au niveau de l'anapath

IV-9.4 Enrobage à la paraffine

Les cassettes sont immergées dans deux bains successifs de paraffine pour que cette dernière s'infiltré dans les échantillons. L'enrobage définitive est ensuite réalisée dans moules métallique.

IV-9.5 Confection des blocs

Après leur enrobage, les cassettes sont incubées à basse température jusqu'à refroidissement de la paraffine .le refroidissement permet l'obtention d'un bloc pour chaque prélèvement en orientant convenablement le fragment dans le sens de la coupe.

IV-9.6 Réalisation des coupes au microtome

La coupe du bloc de paraffine au microtome permet de réaliser une coupe très fine de 5µm d'épaisseur pour chaque prélèvement. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser le prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires.la coupe est déposée et collée sur une lame en verre puis on la laisse sécher pendant une heure à 37°C.

IV-9.7 Coloration

Cette étape permet de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires et pour cela, on met les lames dans un bain d'hématoxyline pendant 3min, suivi d'un bain d'éosine pendant 5 min, et on rince dans deux bains successifs d'éthanol à 90%.

Après la coloration on fait le montage qu'il s'agit de recouvrir l'étalement avec une lamelle en utilisant des gouttes de gélatine, puis on laisse sécher.



Figure N° 13: Photographie des lames après coloration.

IV-9.8 L'étude microscopique

La visualisation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope optique doté d'un appareil photos, qui nous à permet d'obtenir les photos des différents prélèvements, en utilisant les grossissements G×100 et GX200 avec l'assistance d'une médecine anatomopathologie du l'anapathe.

Résultats

Et

Discussion

V-Résultats et discussions

V-1 Humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches et leurs fruits renferment 60 à 80% d'eau (Paris et Moysse, 1965), ce qui peut favoriser une activité enzymatique qui entraînera rapidement des changements irréversibles sur les antioxydants après la collecte du matériel végétal, tels que l'oxydation et par conséquent une polymérisation ou une décomposition.

Cet inconvénient peut être éliminé par un séchage rapide qui minimise la détérioration microbiologique du matériel végétal (Doymaz et Kocayigit, 2011).

Le séchage des feuilles à température ambiante, à l'abri de la lumière et protégées contre l'humidité et la poussière est la technique qui donne le meilleur résultat. Contrairement au séchage à 60°C qui donne généralement après le broyage une poudre brune, témoin du brunissement non enzymatique (Chevolleau et al., 1992).

Le résultat du test d'humidité résiduelle de la poudre des feuilles de *Ficus carica* étudiées est représenté dans la figure N° 14

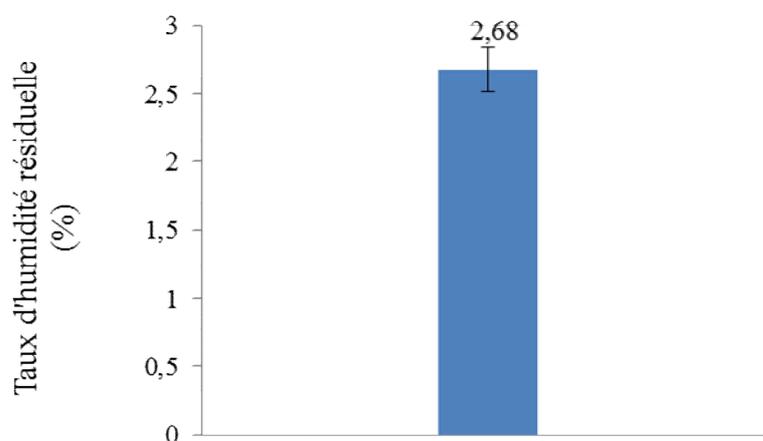


Figure N° 14 : Teneur en humidité résiduelle de la poudre de feuille étudiée.

D'après le résultat obtenu, le taux d'humidité résiduelle de la poudre des feuilles de *Ficus carica* est de 2,68%. Ce taux faible d'humidité permet de mieux conserver les propriétés antioxydantes des composés phénoliques de la poudre.

En effet, l'eau est une source de dégradation des polyphénols par le phénomène d'oxydation (Ribéreau-Gayon, 1968).

V-2 Optimisation des conditions d'extraction

Dans le but d'étudier les composés bioactifs, les industries utilisent le plus souvent la méthode d'extraction par solvant à partir du matériel végétal (**Barzana et al. , 2002**), destinée à séparer les antioxydants solubles par diffusion à travers une matrice solide (matériel végétal) vers une matrice liquide (solvant) (**Musa et al., 2011**).

Récemment, l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est utilisée comme une méthode d'extraction à l'échelle du laboratoire car elle offre plusieurs avantages, telles que la consommation réduite d'énergie, de faibles quantités de solvants organiques moins toxiques ce qui réduit les quantités de déchets et permet d'obtenir de meilleur rendement par rapport aux méthodes classiques d'extraction (**Grigonis et al., 2005**).

L'efficacité de l'extraction est attribuée à plusieurs facteurs dont la nature et volume de solvant, le nombre d'extraction, la nature des composés à extraire et la température d'extraction (**Owen et Johns, 1999**).

Yuefei Zhang et al. (2014) ont démontré que l'extraction par micro-onde est très influence par le choix des paramètres d'extraction entre autres; le solvant, le temps, le ratio matière-solvant et la puissance de micro-onde.

V-2.1 Analyse des résultats

Le plan de Box-Behken est un exemple de modélisation de surface de réponse (RSM). Afin d'optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la poudre des feuilles de figue *Ficus carica* étudié, quatre facteurs (X1, X2, X3, et X4) à trois niveaux (-1, 0, +1) sont appliqués pour. Les facteurs choisis dans la présente étude sont :

- La puissance (300, 500, 700 W) ;
- Le temps d'extraction (60, 90, 120 s) ;
- La concentration du solvant (30, 50, 70 %) ;
- Le rapport de masse/solvant (1/5, 1/10, 1/15).

Les résultats des expériences du plan Box-Behnken (BBD) sont représentés dans le Tableau VII.

Tableau VII: Plan et résultats d'optimisation des conditions d'extraction par le plan BBD.

N° de l'essai	Puissance (W)	Temps (sec)	Solvant (%)	Masse/solvant (mg/ml)	Polyphénols totaux (g /Kg de M.S.)	
	X1	X2	X3	X4	Valeurs réelles	Valeurs prédites
1	500	90	50	1/10	62.60	52.38
2	700	120	50	1/10	30.90	29.32
3	500	120	50	1/15	25.89	26.93
4	500	90	70	1/15	3.86	40.61
5	500	90	70	1/15	31.07	52.38
6	500	90	70	1/5	3.60	6.36
7	700	90	50	1/5	24.81	24.42
8	300	60	50	1/10	48.91	48.06
9	500	120	70	1/10	20.99	16.52
10	500	90	50	1/10	54.76	52.38
11	700	60	50	1/10	31.08	32.00
12	500	90	30	1/5	35.69	32.95
13	300	90	50	1/5	12.89	14.43
14	700	90	70	1/10	21.83	26.15
15	500	90	50	1/10	36.37	6.36
16	300	90	50	1/15	37.21	14.43
17	500	60	30	1/10	39.82	42.81
18	500	60	50	1/5	4.15	20.53
19	300	120	50	1/10	11.54	6.19
20	500	120	30	1/10	20.17	19.46
21	300	90	30	1/10	26.96	26.64
22	500	120	50	1/5	22.97	26.42
23	300	90	70	1/10	17.76	19.98
24	700	90	30	1/10	25.74	25.35
25	500	60	50	1/15	76.97	61.77
26	500	30	70	1/10	19.54	19.15
27	700	90	50	1/15	60.44	52.38

D'après les résultats de la présente étude, la teneur en composés phénoliques de la poudre étudiée varie de 3.60 et 76.97g d'EAG/Kg de matière sèche, ce qui confirme l'influence des paramètres (puissance, temps, solvant, masse/solvant) sur le taux d'extraction des polyphénols.

En effet, cela a été démontré par plusieurs auteurs (**Chandrika et Fereidoon, 2005; Kashif et al., 2009**).

Plusieurs d'autre facteurs peuvent influencer l'extraction des polyphénols tel que le pH (**Chirinos et al., 2007**) et la granulométrie (**Bucic-Kojic et al., 2007**).

V-2.2. Validation du model

Dans les plans d'expériences le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

V-2.2.1 Coefficient de détermination (R^2)

Dans la présente étude, le coefficient de détermination (R^2) du model est égal à 0.90, ce qui signifie que uniquement 10% des variations ne sont pas expliquées par le model. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté est de l'ordre de $R^2_{ajusté}=0.78$, ce qui est assez élevée pour confirmer la haute significativité du model, sachant que le $R^2_{ajusté}$ représente la valeur du coefficient de détermination(R^2) après élimination des termes (coefficients) inutiles du model.

Un model contenant beaucoup de termes inutiles (non significatifs) aura une valeur du $R^2_{ajusté}$ très inférieure à celle du R^2 (**El-Adawi et al., 2011**).

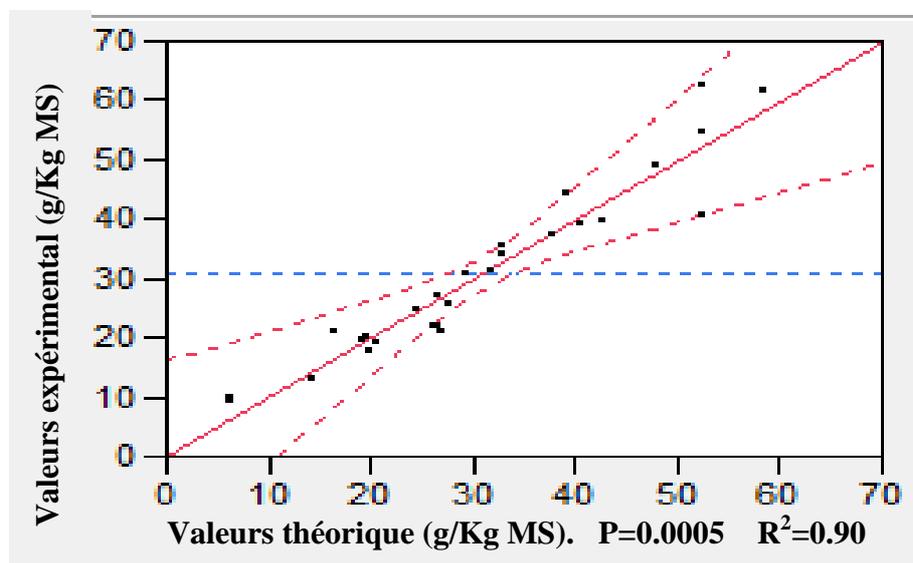


Figure N° 15 : Plan de prédiction réelle de la poudre étudiée

V-2.2.2 Model global et manque d'ajustement

L'analyse de la variance de la régression du model (Tableau VII), montre que le model est très significatif ($P < 0,005$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le model est satisfaisant (**Chin et al., 2010**).

Dans un model, si la P-value du manque d'ajustement est significative ce model sera rejeté (**Granato et al., 2011**).

Tableau VIII: Analyse de la variance du plan Box Behnken étudié.

Paramètre	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Rapport f	P-value
Model	14	7467.6130	533.401	7,8413	0,0015
Défaut d'ajustement	5	816.2994	68.025	1,2517	0,4729
Erreur pure	19	8283.9124	/	/	/

V-2.2.3 Effet des facteurs (coefficients)

Les P-value sont utilisées comme un outil pour vérifier la signification de chaque coefficient, et indiquent également l'intensité de l'interaction entre les paramètres. Plus la valeur de P-value est petite, plus grande est la signification du coefficient correspondant (**Liu et al., 2010 ; Chan et al., 2009**). Les résultats du calcul des coefficients de régression estimés, du model polynomial sont représentés dans le Tableau N° IX

Tableau IX : les coefficients de régression estimés du model polynomial du second degré.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	p-value
Intercepte	30.040726	89.72662	0.33	0.7436
linéarité				
X1	0.1337899	0.125827	1.06	0.3086
X2	-0.741849	0.846951	-0.88	0.3983
X3	3.7431484	1.325767	2.82	0.0154*
X4	-923.8966	449.7879	-2.05	0.0624
Interaction				
X1X2	0.0015494	0.000687	2.25	0.0437*
X1X3	0.00033	0.0011031	0.32	0.7544
X2X3				
X1X4	-0.005261	0.286338	-0.02	0.9856
X2X4	0.0030588	0.006465	0.47	0.6446
X3X4	-1.177174	2.760558	-0.43	0.6773
Quadratique				
X1X1	-0.000273	9.053e-5	-3.01	0.0108*
X2X2	-0.008081	0.003022	-2.67	0.0203
X3X3	-0.042438	0.008831	-4.81	0.0004*
X4X4	-226.5535	1217.849	-0.19	0.8555

➤ Effet linéaire

Les résultats de la présente étude, montrent que le facteur qui possède une influence significative sur l'extraction des polyphénols de la poudre de *ficus carica* étudiée, est la concentration du solvant (X3) avec une probabilité $P=0,0154$ et un coefficient de l'ordre de $\alpha_1= 3.7431484$. Cependant, l'impact est non significatif pour les autres facteurs à savoir le rapport masse/solvant (X1), le temps d'extraction (X2) et la puissance (X4).

L'importance de la concentration du solvant dans l'efficacité d'une extraction est démontrée par plusieurs études (Uma et al., 2010 ; Chan et al, 2009 ; Juntachote et al., 2006). En effet, la polarité du système eau-acétone varie en fonction de la concentration de l'acétone et de l'eau, par conséquent la polyphénols extraite est hautement dépendante de la polarité du solvant (Barinderjit et al., 2012).

➤ Effet quadratique

Les résultats obtenus montrent l'existence de deux effets quadratiques influençant significativement la teneur en polyphénols extraites à partir de feuilles de figuier *ficus carica* étudiées.

L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par l'effet de X_3X_3 (solvant-solvant) avec une probabilité de l'ordre de $p=0.0004$ inférieur à 0.05, suivi par l'effet quadratique X_1X_1 (puissance-puissance) avec des probabilités de l'ordre de $p=0.0108$. Contrairement aux deux autres effets quadratiques X_1X_1 (température –température) et X_3X_3 (temps –temps) qui sont non significatifs avec des probabilités $P > 0.05$.

➤ Effet d'interaction

Les résultats de l'étude des interactions des quatre variables (X_1 , X_2 , X_3 , et X_4) montrent l'existence de deux interactions significative sur l'extraction des polyphénols de feuilles de figuier *ficus carica* étudiées.

L'interaction X_2X_4 (temps d'extraction- rapport masse/solvant) est la plus significative avec une probabilité de l'ordre $P=0.0004$, suivie par l'interaction X_1X_2 (temps d'extraction-puissance) avec une probabilité de l'ordre de 0.0437.

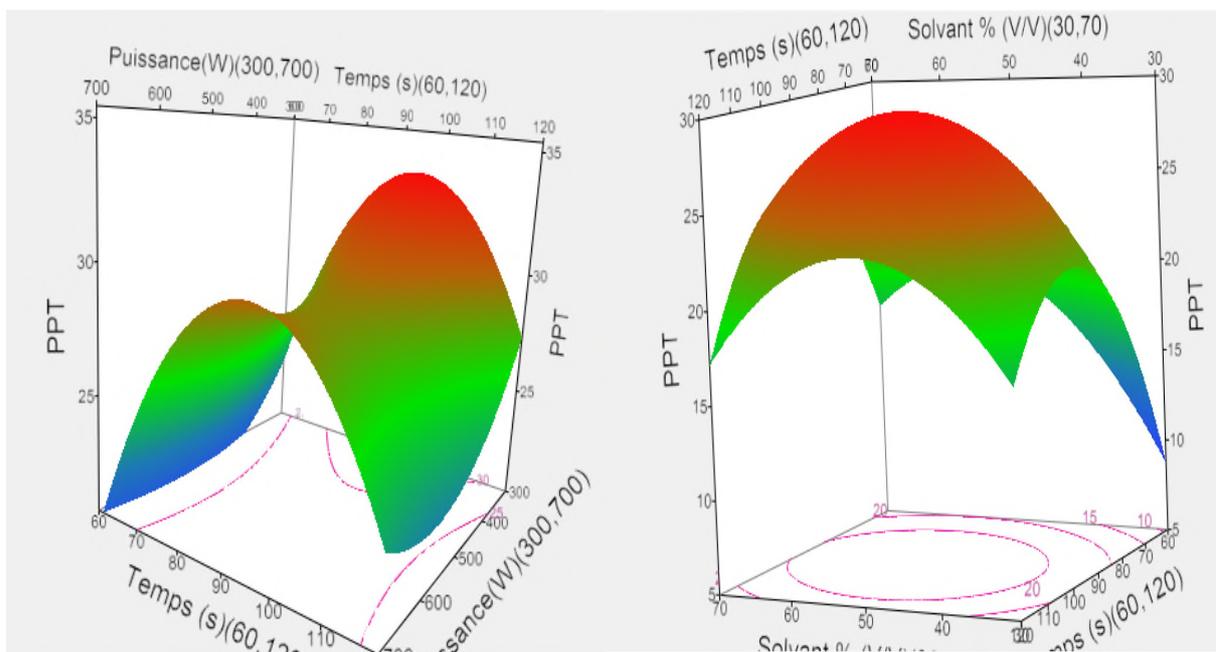


Figure N°16 : Surface de réponse pour l'interaction puissance-Temps

Figure N°17 : Surface de réponse pour l'interaction Temps-solvant

V-2.2.4 Analyse du modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux, le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux (Tinsson, 2010).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour quatre facteurs est un modèle du second degré classique, volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permettra de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (Tinsson, 2010).

D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles du figuier étudiées, sont alors bien connues. Le modèle mathématique du plan Box-Behnken de la présente étude peut être représenté par la relation suivante :

$$Y = 30.040726 + 0.1337899X_1 - 0.741849X_2 + 3.7431484X_3 - 923.8966X_4 - 0.000273X_1^2 - 0.008081X_2^2 - 0.042438X_3^2 - 226.5535X_4^2$$

V-2.2.5 Paramètres optimaux

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux complet peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant à une maximisation de l'extraction des polyphénols sont obtenues au sein du domaine expérimental.

Les conditions d'extractions optimales identifiées, par l'utilisation du logiciel JMP, sont représentées dans le Tableau X :

Tableau X: Conditions optimales d'extraction des polyphénols à partir de la poudre étudiée.

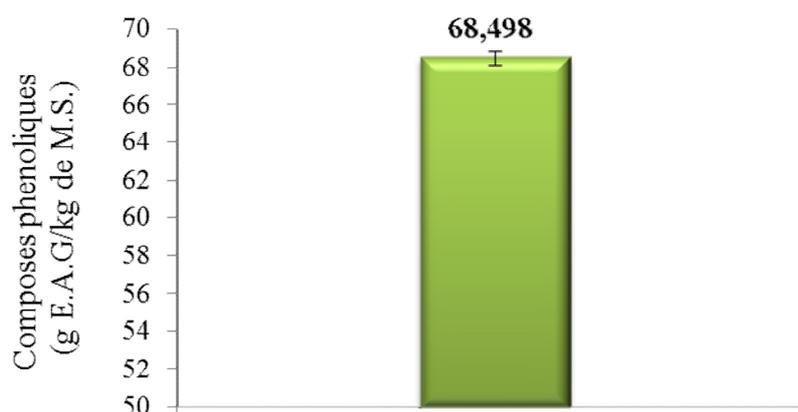
Variable	Valeurs critique
Puissance(W)	601.99637
Temps(Sec)	115.82858
Solvant (%)	48.291841
Masse/solvant (mg/ml)	0.1675893
Valeur prédite (g/Kg de M.S.)	40.311784

V-3- Dosage des antioxydants

V-3.1. Les polyphénols totaux

La réaction est basée sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique du réactif de folin-ciocalteau, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde de tungstène et d'oxyde de molybdène. La présence de carbonate de sodium rend le milieu légèrement alcalin (Vermerris et Nicholson, 2008). Après l'addition de réactif de folin-ciocalteau et de carbonate, une couleur bleue est obtenue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques.

La teneur en polyphénols totaux des feuilles de *Ficus carica* étudiées, exprimée en gramme équivalent d'acide gallique par kilogramme de poudre (g E.A.G./Kg) en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires (Annexe II), est représentée dans la figure N°18.

**Figure N° 18 :** Teneur en polyphénols totaux de l'extrait optimisé.

D'après les résultats de la présente étude, la teneur en composés phénoliques des feuilles de *Ficus carica* étudiées est en moyenne de 68.49 g E.A.G. /Kg de poudre.

Selon **Abdel-hameed (2009)** les teneurs en polyphénols totaux, de six différentes espèces de genre ficus (*F.afzelli*, *F.decora*, *F.lyrata*, *F.nitida*, *F.sycomorus*, *F.virnes*), sont comprises entre 63 et 146 g E.A.G./Kg MS. Ce qui indique que le genre ficus est très riche en polyphénols.

Selon **Konyalioglu et al., (2005)**, la teneur en polyphénols des feuilles de *Ficus carica* est d'environ de 40g/Kg MS. Ce résultat est différent de celui de la présente étude, ce qui peut être due à plusieurs facteurs entre autres : la nature du solvant, la méthode d'extraction, et aussi aux facteurs environnementaux de la région dans laquelle la plante est récoltée (**Veberic et al., 2008**).

La teneur de quelques composés phénoliques peut également augmenter dans des conditions de stress provoquer par, les rayonnements UV, les infections par les microbes et parasites pathogènes, blessures, pollution de l'air ainsi que l'exposition à des températures extrêmes (**Naczki et Shahidi, 2006**).

V-3.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénolique répartie dans différents classes dont certains sont solubles dans les solvants polaires tandis que d'autres sont solubles dans les solvants apolaires (**Macheix et al., 2005**).

En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position cinq (5) susceptible de donner en présence du chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre, par chélation de l'ion aluminium (Al^{3+}), dont sa concentration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présent dans extrait (**Djeridane et al., 2006**).

Le résultat du dosage des flavonoïdes de l'extrait des feuilles de *Ficus carica* étudiées, exprimé en gramme d'équivalent de quercétine par gramme de matières sèches (g E.A.G./g MS), en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans mêmes conditions opératoires (Annexe II), est représenté dans la figure N° 19

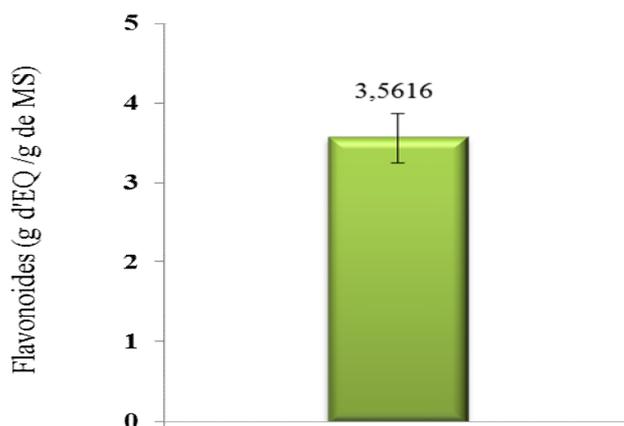


Figure N° 19 : Teneur en flavonoïdes de l'extrait optimisé

D'après le résultat obtenu, la teneur en flavonoïdes des feuilles de *Ficus carica* est en moyenne de 35,61 g E.Q./Kg de poudre.

Selon **Oguzhan et al. (2008)** la teneur en flavonoïde des feuilles de *Ficus carica* qui varient entre 0,7 et 1,37g E.Q./100g de matière sèche.

Arache et al. (2013) en étudiant l'effet de la méthode d'extraction sur la composition en composés phénolique de la poudre de *ficus carica*, ont estimé la teneur en flavonoïdes de l'ordre de 2,619 g E.Q./100g de poudre.

Konyalioglu et al. (2005) ont rapporté des teneurs en flavonoïdes des feuilles de la *Ficus carica* qui varient entre 0,03 à 0,09 g/100g MS. Cependant **Lansky et paavilainen, (2011)**, ont retrouvé une teneur de 63,1mg E.Q./Kg de MS.

Ces différences peuvent être expliquer par la méthode d'extraction ou par l'influence de plusieurs facteurs : l'espèce, les solvant utilisés et les conditions de stockage (**Turkmen Erol et al., 2009**).

La température peut influencer sur l'extraction d'un composé donné en modifiant le coefficient de diffusion ou la solubilité du composé dans le solvant. L'augmentation de la température fait augmenter le coefficient de diffusion et, en conséquence, le taux de diffusion, se qui entrainerait un meilleur entrainement et par conséquent un taux plus élevé (**Rodriguez montealegre et al ., 2006**).

Rawel et al. (2005), ont rapporté que l'exposition à la lumière et la technique de conservation des plantes peuvent également affecter la teneur en flavonoïdes qui sont sensibles l'oxydation.

V-3 Les tannins

Les tannins sont connus pour leur propriété principale de précipiter les protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et le temps) (**Simon et Barathieu, 2003**).

L'utilisation de la protéine de sérum Albumine bovine (BSA), dans le dosage des tannins en milieu acide, a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols de l'extrait.

Le chlorure ferrique(FeCl_3) réagit avec les tannins en milieu alcalin (SDS/TEA) pour former des chélates (**Hagerman et Butler, 1989**). Les tannins forment des complexes de couleur violette avec les ions ferriques dans un milieu basique (SDS/TEA) (**Metch et Girardien, 1980**).

Le résultat de dosage des tannins des feuilles *Ficus carica* étudiées, exprimé en gramme d'équivalent d'acide tannique par 100 gramme de matière sèche (g E.A.T./100g MS), en ce référant à une courbe d'étalonnage réalisé dans les même conditions opératoire (Annexe II), est représenté dans la figure N° 20

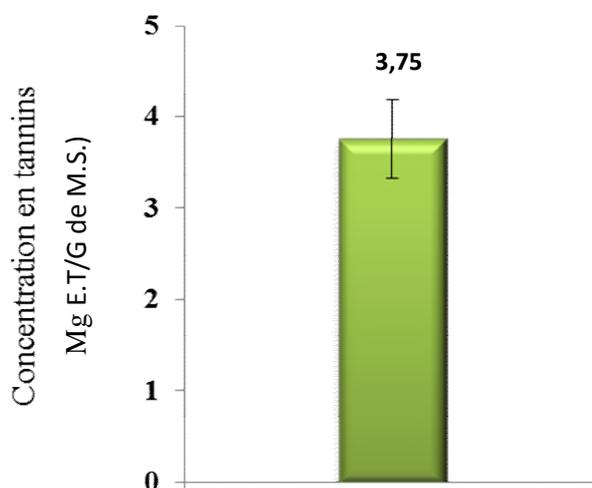


Figure N°20: teneur en tannins de l'extrait optimisé.

D'après le résultat obtenu dans la présente étude, la teneur en tannins des feuilles de *Ficus carica* est en moyenne 37,52g d'EAT/Kg de MS, ce qui représente environ 57% des polyphénols totaux.

Arache et al. (2013) ont estimé que la teneur en tanins des feuilles de *ficus carica* est de l'ordre de 3.031 g E.A.T./100g MS, en environ 42% des polyphénols totaux.

La légère différence de taux des tannins des feuilles de *Ficus carica* est probablement due à plusieurs facteurs entre autres ; les standards utilisés, les méthodes d'analyses employées et notamment le solvant utilisé, aux facteurs génétiques (**Balasundram et al., 2006**), la saison (**Hagerman, 1987**), l'âge de la plante et les conditions environnementales (**Chavan et al., 2001**).

V-4 Evaluation des activités antioxydantes

L'activité antioxydante de l'extrait étudié est évaluée selon deux principes. Le premier, regroupe les tests de la réduction du chlorure ferrique et du molybdate, qui mesure la capacité antioxydante ou le pouvoir réducteur. Le deuxième, inclut les tests scavenger *vis-à-vis* des radicaux DPPH* et ABTS*, qui mesure le pouvoir anti-radicalaire des différentes substances présentes dans l'extrait.

V-3.1 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure la capacité qu'à un antioxydant présent dans un extrait à donner un électron qui peut servir comme indicateur du potentiel de l'activité antioxydante. Le pouvoir réducteur peut être évalué par plusieurs tests à savoir la réduction de chlorure ferrique, le test de réduction de molybdate (**Sousa et al., 2008 ; Sahreen et al., 2010**).

V-3.1.1 Réduction du chlorure ferrique

Ce test évalue l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) du complexe ferrocyanure en fer ferreux (Fe^{+2}). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (**Bourgou et al., 2008**).

Le résultat de l'évaluation du pouvoir réducteur, exprimé en pourcentage de réduction de $FeCl_3$, des feuilles de *Ficus carica*, est illustré dans la figure N°21

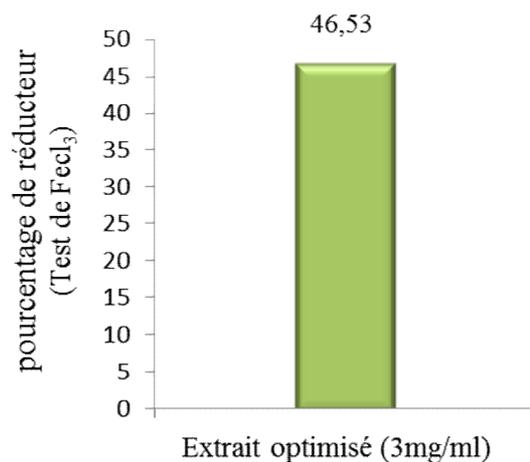


Figure N° 21: Pourcentage de réduction de chlorure ferrique.

D'après le résultat obtenu dans la présente étude, le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de *Ficus carica* à une concentration de 3mg/ml est de l'ordre de 46,53. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec de l'aide gallique à une concentration de 0.6 mg/ml (Annexe III).

De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (**Bourgou et al, 2008, Li et al, 2009**).

Les résultats de l'étude statistique ($P < 0.05$) obtenus, indiquent l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pourcentage de réduction du chlorure ferrique aussi bien avec la teneur en composés phénoliques qu'avec la teneur en flavonoïdes des feuilles du figuier. Les coefficients de corrélation correspondants sont 0.91 et 0.88, respectivement (Annexe III).

Ces résultats confirment ceux de nombreuses études (**Manian et al., 2008 ; Luximon-Ramma et al., 2004 ; Maksimovic et al., 2004**).

V-3.1.2 Réduction de phosphomolybdate

L'activité antioxydant de l'extrait des feuilles de *Ficus carica* étudiées est mesurée en utilisant la méthode au phosphomolybdate, dont le principe est basé sur la réduction du Mo(VI) au Mo(V) par les antioxydants présents dans l'échantillon.

Cette réduction est suivie par l'apparition du phosphate Mo(V) de couleur verte, qui est proportionnelle à la concentration des antioxydants et donne un maximum d'absorption à 695nm (**Ramalakshmi et al, 2008**).

Le résultat du pouvoir réducteur, exprimé en pourcentage de réduction de phosphomolybdate, de l'extrait de feuilles étudiées dans la figure N° 22

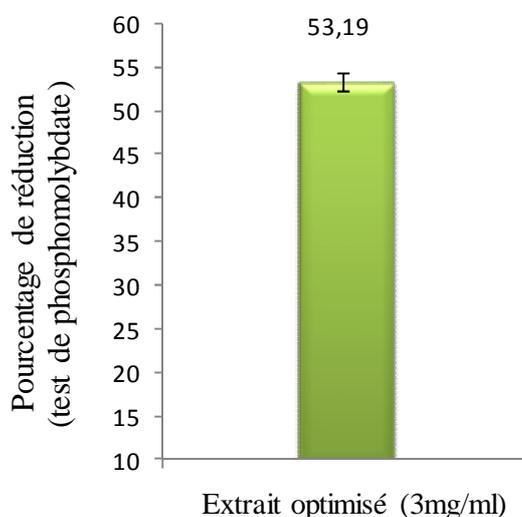


Figure N°22 : pourcentage de réduction de phosphomolybdate de l'extrait étudié.

D'après le résultat obtenu dans la présente étude, le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de *Ficus carica* étudiées est d'environ de 53.19% à une concentration de 3mg/ml. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec l'acide gallique (0,1mg/ml) et à ceux obtenus avec la quercétine (0,2 mg/ml) (Annexe III).

Konyalioglu et al. (2005) ont rapporté que les feuilles de *Ficus carica* renferment des substances ayant un pouvoir réducteur élevé *vis-à-vis* du phosphomolybdate.

Les résultats obtenus, indiquent l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre l'activité réductrice du phosphomolybdate aussi bien, avec la teneur en composés phénoliques qu'avec la teneur en flavonoïdes des feuilles du figuier.

V-3.2 Pouvoir anti-radicalaire

V-3.2.1 Neutralisation du radical DPPH*

Afin d'estimer l'activité anti-radicalaire des extraits de feuilles figes, le DPPH* est un radical libre largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydant (**Suhaj Mohsen et Ammar, 2009 ; Wang et al., 2009**). En présence des piègeurs de radiaux libre, le DPPH* (2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune et l'absorbance mesurée diminue proportionnelle en fonction de taux de réaction avec les antioxydants (**Fernandez-Orozco et al., 2011**).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH* par l'extrait optimisé des feuilles de *Ficus carica* est représenté dans la figure N° 23

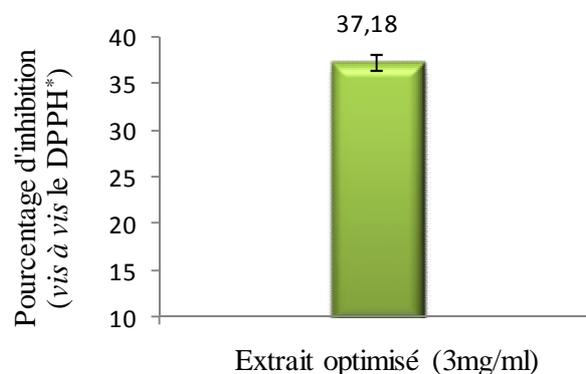


Figure N° 23: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH* de l'extrait étudié.

D'après le résultat obtenu, la capacité inhibitrice du radical DPPH* par l'extrait des feuilles de *Ficus carica*, à une concentration de 3mg/ml, est de 37,18%. Ce résultat est comparable à ceux obtenus avec l'acide tannique et l'acide gallique avec des concentrations de l'ordre de 0,00001mg/ml et 0,00003mg/ml, respectivement (Annexe IV).

La présente étude, montre qu'également que la capacité inhibitrice du radical DPPH*, de l'extrait étudié augmente avec l'augmentation de sa concentration (Annexe IV). Les antioxydants retrouvés dans l'extrait de feuille de *Ficus carica* étudiés, possèdent une bonne activité inhibitrice vis-à-vis le radical DPPH*, et la valeur d'IC₅₀ (obtenue par projection graphique) est de l'ordre de 3 mg/ml de poudre.

Les résultats de l'étude statistique ($P < 0.05$) obtenus, indiquent l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH*, aussi bien avec la teneur en composés phénoliques qu'avec la teneur en flavonoïdes des feuilles du figuier.

La réduction du radical DPPH* par les extraits de plantes a été attribuée, par plusieurs auteurs, à la présence de composés phénoliques qui cèdent facilement des protons pour le réduire (Li et al., 2009 ; Sarikurkcu et al., 2008 ; Tep et al., 2007). Leur capacité varie d'un composé à un autre et exercent une synergie entre eux et /ou avec des constituants présents dans les extraits (Bourgou et al., 2008).

V-3.2.2 Neutralisation du radical cationique ABTS^{•+}

Dans ce test l'ABTS^{•+} est oxydé par les oxydés par les antioxydants à son radical cationique ABTS^{•+}, qui a une couleur intense. L'activité anti-radicalaire est considérée comme étant la capacité des composés testés à diminuer directement la couleur du radical ABTS S^{•+}. Le radical ABTS^{•+} est plus réactif que le DPPH* (Gulcin, 2012).

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} par l'extrait optimisé des feuilles de *Ficus carica*, est représenté dans la figure N°30

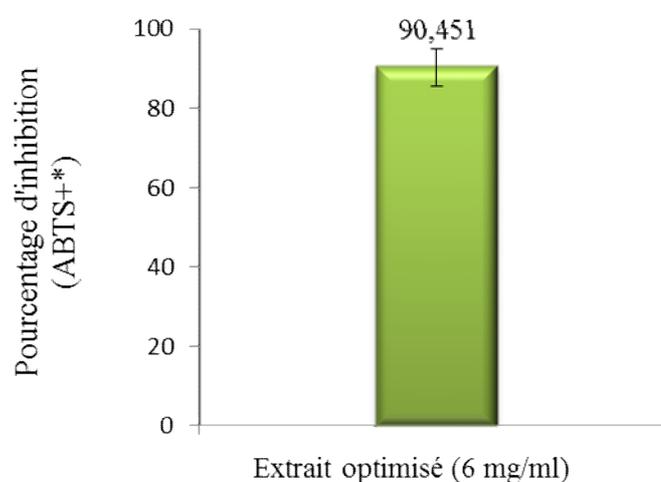


Figure N° 24: pourcentage d'inhibition du radical ABTS de l'extrait étudié.

D'après le résultat obtenu, la capacité d'inhibition du radical ABTS^{•+} par l'extrait des feuilles de *Ficus carica* après cinq minutes d'incubation est de 90.451, à une concentration de 6 mg/ml. Ce résultat est équivalent à celui obtenu avec l'acide gallique (0,05mg/ml).

Les résultats obtenus, montrent que la capacité d'inhibition du radical ABTS^{•+} par l'extrait des feuilles de *Ficus carica*, augmente avec le temps (Figure N° 25).

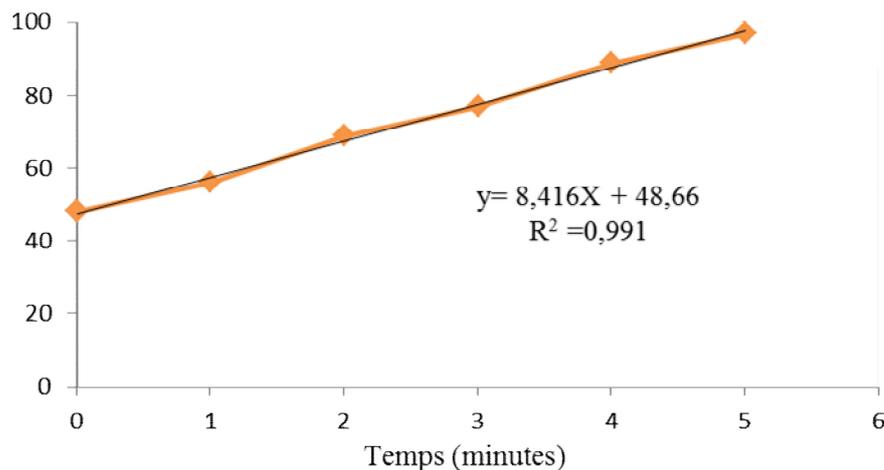


Figure N° 25 : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ par l'extrait étudié (6mg/ml).

Manian et al. (2008) ont rapporté que les composés phénoliques aux poids moléculaires élevés (tannins) ont plus de capacité pour capter les radicaux libres ABTS⁺, et que leur efficacité dépend moléculaire, du nombre de noyaux aromatique et de la nature de substitution des groupements hydroxyles.

Plusieurs études ont montré que l'activité anti-radicalaire, *vis-à-vis* le radical ABTS⁺, est très influencée par le solvant d'extraction, ce qui peut expliquer par la variation de la quantité et de la quantité des antioxydants en fonction de la nature du solvant utilisé. (**Floegel et al., 2011**).

VI- Toxicité sub-chronique

Le traitement sub-chronique de l'extrait optimisé (E_{op}) pendant 28 jours des doses de 200mg/kg, 400mg/kg et 800 mg/kg ne montre aucun des signes de toxicité.

Aucune variation significative du poids corporel et de la masse des organes internes (foie et rein) n'a été observée pour les deux lots traités (Figure N° 26).

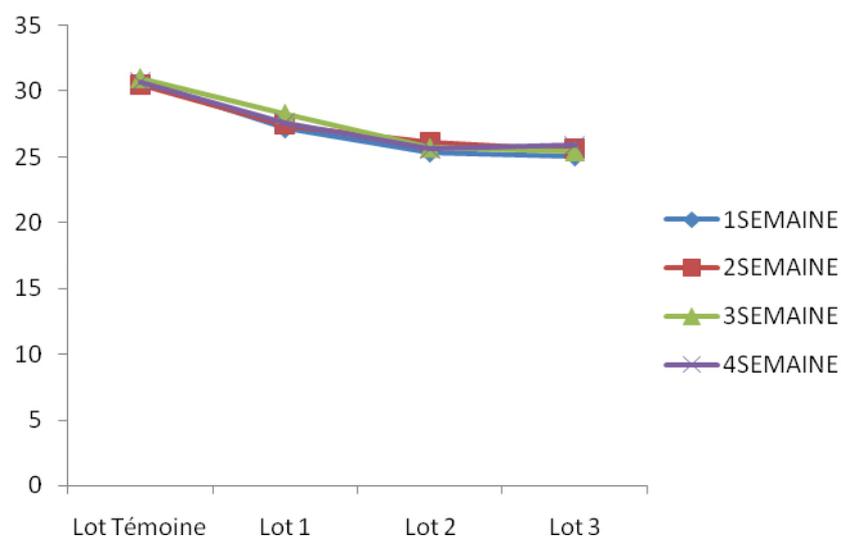


Figure N°26 : La variation du poids corporel des différents lots au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (LT:0 mg/kg ; L1: 200 mg/kg ; L2: 400 mg/kg et L3: 800 mg/kg).

Les résultats obtenus sont très similaires à ceux de **Gireesh et Vikas (2011)** lors de l'étude de la toxicité sub-chronique d'extrait standard du *Ficus carica*, qui ont montré que l'administration de cet extrait à des doses de 200, 400 et 800 mg/kg/jours pendant 28 jours ne révèle aucun changement significatif du poids corporel des rats.

Selon les rapports, la réduction du poids du corps et des organes internes sont considérées comme des indices sensibles de la toxicité après une exposition à une substance toxique (**Suriyavadhana et Tpakutharivu., 2011**).

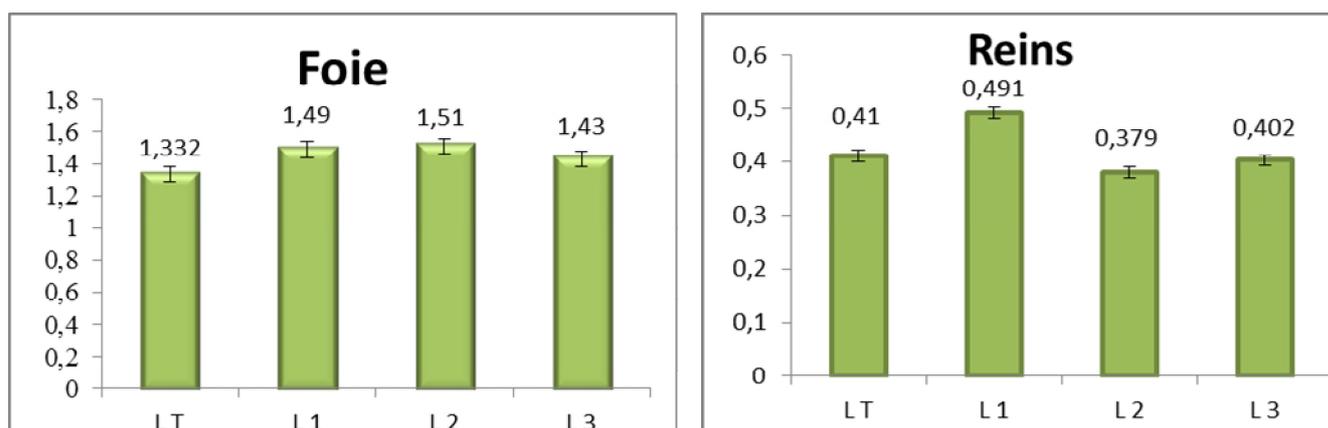


Figure N°27 : poids des organes (Foie et reins) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg). Lot 1 (200 mg/kg); Lot 2 (400 mg/kg) ; Lot 3 (800 mg/kg). Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

VI-1-Paramètres biochimiques

Le profil des paramètres biochimiques sériques après traitement oral quotidien de l'Eop de la graine de *Ficus carica* des groupes (Témoin « T » ; Lot 1 « L1 : 200 mg/kg » ; Lot 2 « L2 : 400 mg/kg » ; Lot 3 « L3 : 800mg/kg » pendant 28 jours (tableau XII) ne montre aucun changements cruciaux significatifs sur les taux d'urée, bilirubine, créatinine et les activités des transaminases ALAT et ASAT.

Tableau XI : Analyses biochimiques de traitement sub-chronique des souris femelles par l'extrait méthanolique de *Ficus carica* avec les doses Lot T (0 mg/kg), Lot 1 (200 mg/kg), Lot 3 (400mg/kg), Lot 3 (800 mg/kg). (n=6). Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type. ($P \leq 0,05$ est considéré significatif).

Paramètres	BIL g/l	ALT UI/L	AST UI/L	URE g/L	CRE mg/dl
Lot T	2,76 \pm 0,3	23,6 \pm 1,631	58,21 \pm 3,06	0,35 \pm 0,054	0,511 \pm 0,034
Lot 1	2,25 \pm 0,432	24,12 \pm 1,239	58,59 \pm 2,11	0,33 \pm 0,06	0,519 \pm 0,028
Lot 2	2,89 \pm 0,62	24,97 \pm 1,37	57,42 \pm 2,71	0,34 \pm 0,12	0,527 \pm 0,051
Lot 3	2,65 \pm 0,23	23,511 \pm 1,42	58,34 \pm 1,79	0,348 \pm 0,029	0,531 \pm 0,047

IV-2-Paramètres hépatiques

Le dosage des paramètres biochimiques hépatiques à savoir les transaminases ALAT ; ASAT, et la bilirubine a permis d'avoir les résultats suivants représentées sur la figure n°27.

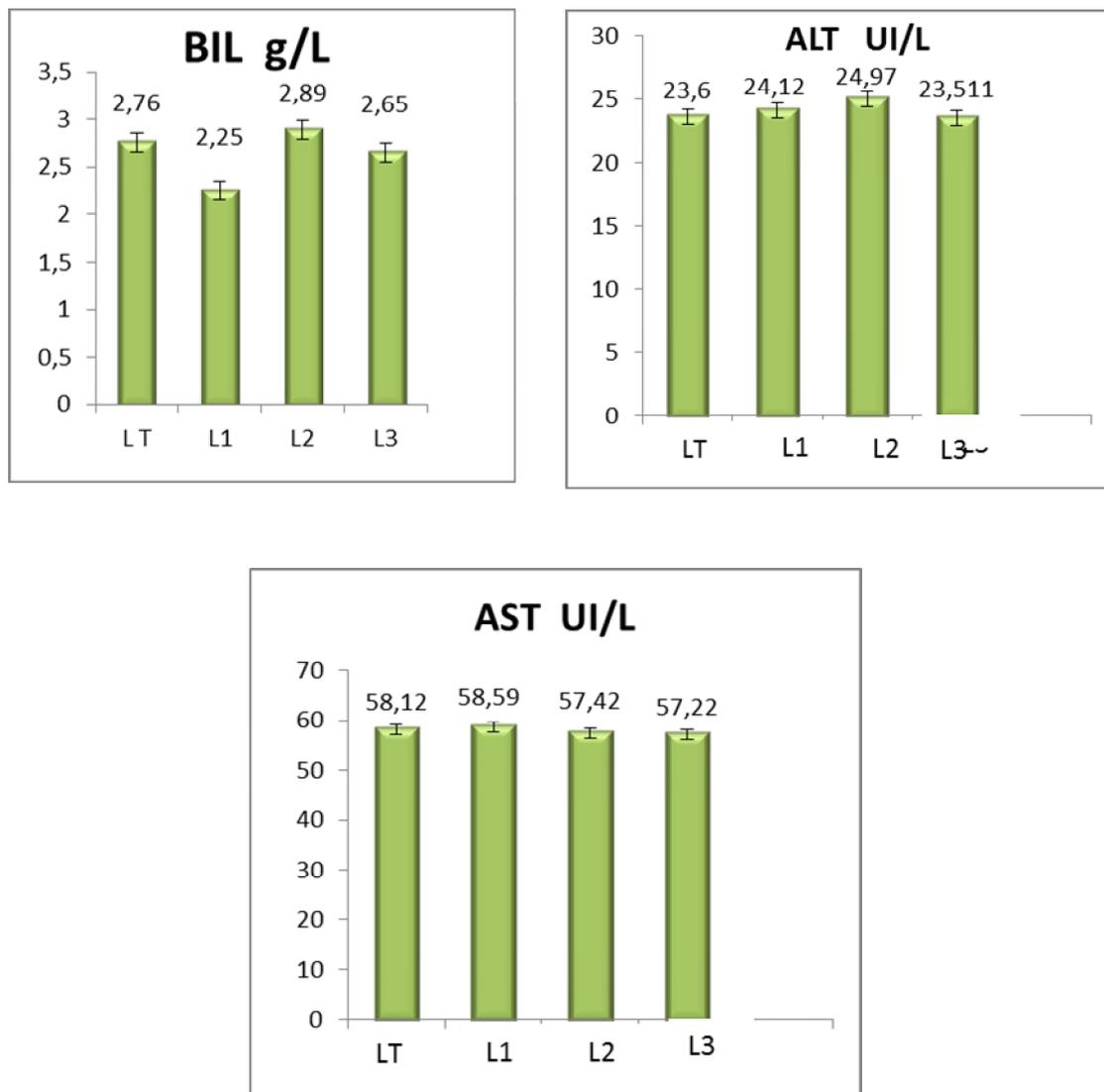


Figure N° 28 : paramètres sériques d'évaluation de la fonction hépatique (ALAT, ASAT, bilirubine,) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg). Lot 1 (200 mg/kg); Lot 2 (400 mg/kg); Lot 3 (800 mg/kg). Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif).

L'administration de l'E_{op} pendant 28 jours n'a provoqué aucun changement significatif ($P > 0,05$) de l'activité sérique d'ASAT, d'ALAT, de bilirubine dans les trois lots ayant reçu les doses de 200 ; 400 et 800 mg/kg d'extrait (Das et al., 2011).

IV-3- Paramètres néphrétiques

Les résultats du dosage de l'urée et de la créatinine, ne présentent pas de différence significative ($P > 0,05$).

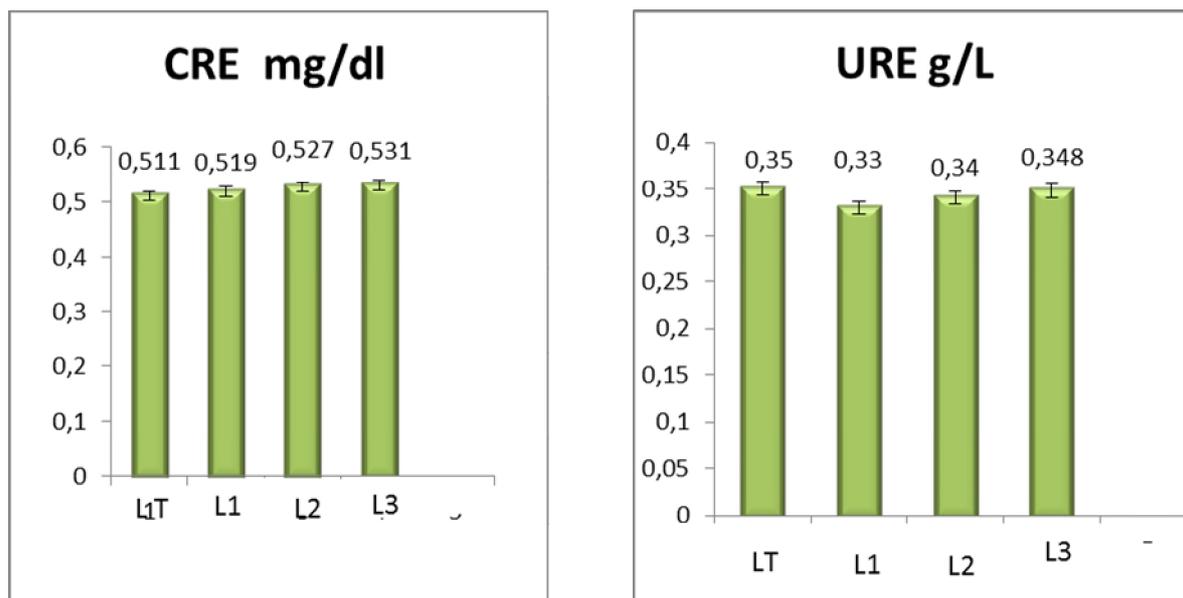


Figure N°29 : paramètres sériques d'évaluation de la fonction rénale (urée et créatinine) des différents lots traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses Lot T (0 mg/kg), Lot 1 (200 mg/kg), Lot 2 (400 mg/kg), Lot 3 (800 mg/kg). Et de l' données sont exprimées par moyenne ± écart-type ($P \leq 0,05$ est considéré comme résultat significatif).

La fonction rénale est appréciée par le dosage de la créatinine et de l'urée sériques. Ces métabolites, produits finis issus du métabolisme des protéines, ont une concentration généralement constante dans les conditions normales (Whitby et al., 1988).

En effet selon Marshall et al., (2005), la variation de la concentration sérique de la créatinine peut être en relation avec la masse musculaire. Ces résultats sont donc en faveur d'une physiologie rénale normale.

Leur augmentation ou leur diminution reflète un dysfonctionnement rénal (Sirwal et al., 2004). Ces taux ne varient pas chez les souris traitées recevant les doses de 200, 400 et 800

mg/kg de l'Eop par rapport aux témoins ($P < 0,05$), marquant une fonction rénale normale, concorde, avec les résultats d'étude de **Zaoui et ses collaborateurs (2002)**, qui ont constaté, qu'après 12 semaine de traitement par l'huile fixe de *Nigella sativa* à une dose de 1ml/Kg/jour, les concentrations en acide urique et créatinine n'ont pas augmenté considérablement, comparées aux valeurs des rats normaux.

IV-4- Etude histopathologique

IV-4-1- Histologie hépatique

Le foie des souris témoins présente un aspect normal sans modification hépatique, avec un parenchyme d'architecture lobée. Chaque lobe est constitué d'hépatocytes agencés en travées de Remak disposé autour d'une veine centrolobulaire qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique au contact des sinusoides. Les travées de Remak sont constituées d'hépatocytes empilés en lames épithéliales d'une seule cellule d'épaisseur alors que les sinusoides occupent les espaces entre les travées (figure N° 29)

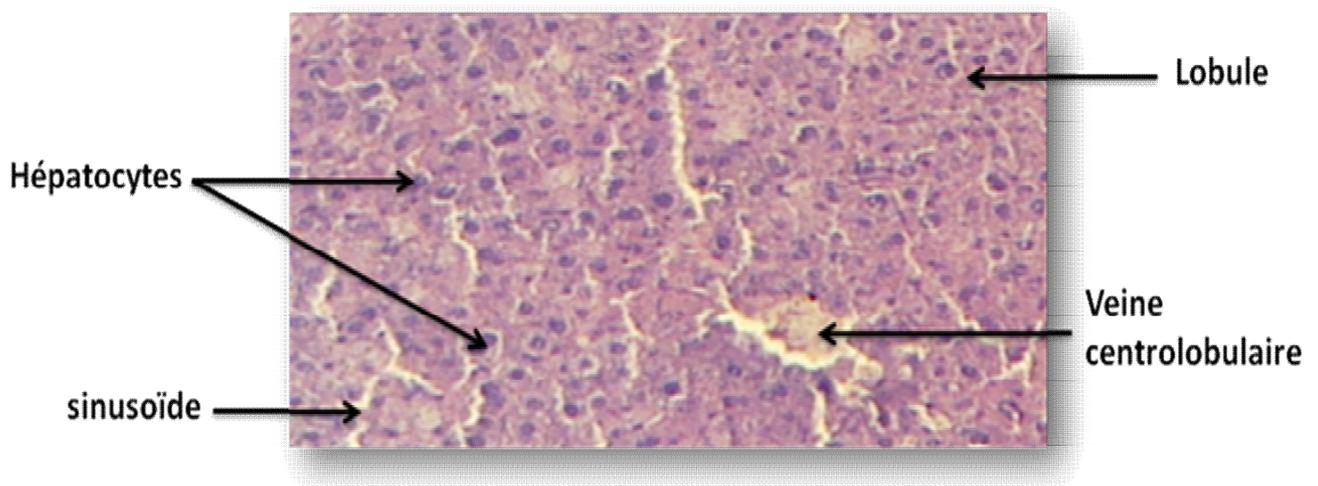


Figure N°30 : Photographie de parenchyme hépatique d'une souris témoin GX10

L'examen microscopique du foie des souris traitées par 200 mg/kg d'E_{op} de *Ficus carica* ne montre aucun changement significatif, et présente un parenchyme hépatique normal par rapport à la souris témoin (figure N°30)

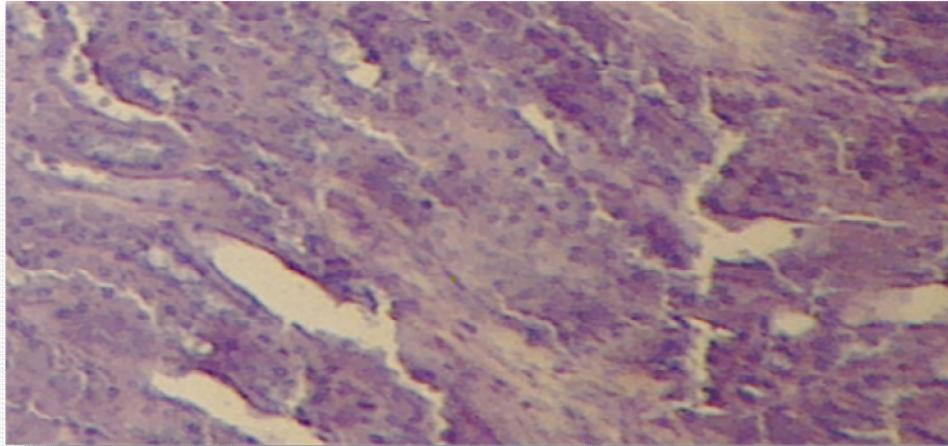


Figure N°30 : Photographie de parenchyme hépatique d'une souris du lot 1 (200 mg/kg/jour) GX100.

Le foie des souris de lot 2 (traitée par 400 mg/kg/jour) présente les mêmes structures hépatiques que le lot témoin, avec de légères dilatations des vaisseaux sanguins.

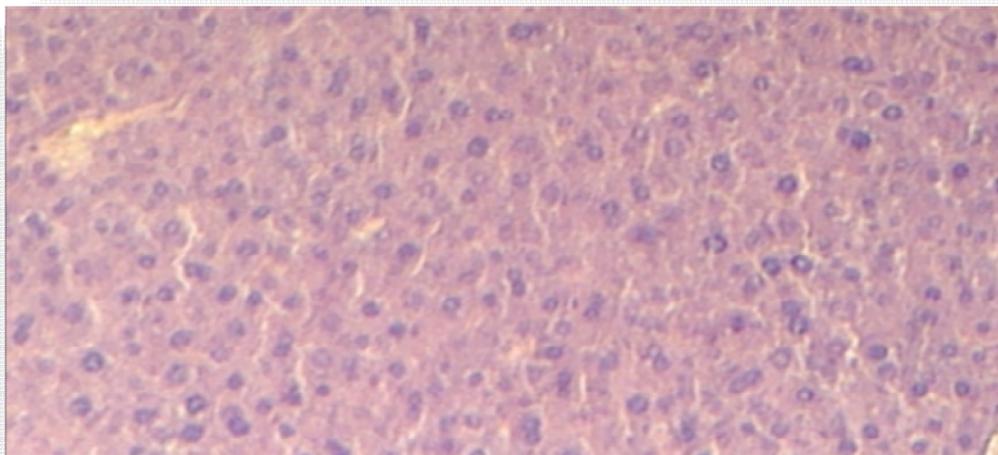


Figure N°31 : Photographie de parenchyme hépatique d'une souris du lot 2 (400 mg/kg/jour) GX100.

L'examen microscopique du foie des souris traitées par 800 mg/kg d'Eop de *Ficus carica* ne montre aucun changement significatif, et présente un parenchyme hépatique normal par rapport à la souris témoin

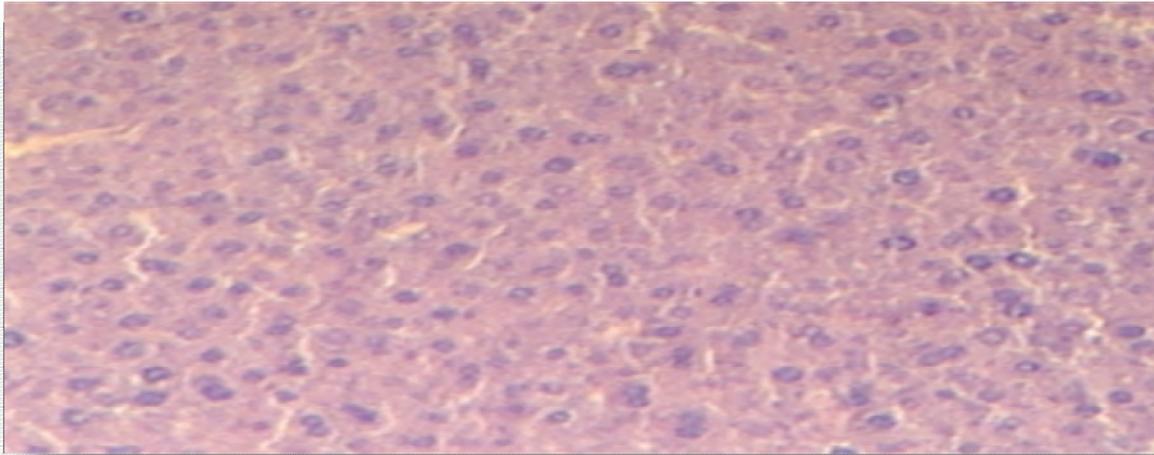


Figure N°32 : Photographie de parenchyme hépatique d'une souris du lot 3 (800 mg/kg/jour) GX100.

IV-4.2 Histologie rénale

Les reins des souris témoins présentent une architecture normale avec capsule conjonctivoadipeuse. Dans la zone corticale, nous observons de petites masses sphériques, les glomérules, qui sont entourés d'une capsule (la capsule de Bowman). Ces derniers assurent la filtration glomérulaire du sang, passage de l'eau et des composés de faible poids moléculaire dans le tube urinifère, ou une large proportion de ces derniers est réabsorbée, le reste constitue l'urine (figure 33).

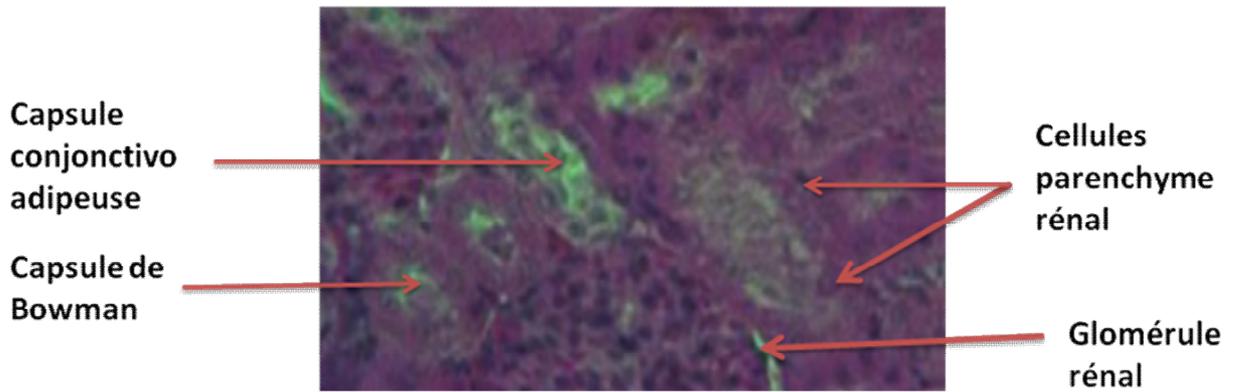


Figure N°34: Photographie de parenchyme rénal d'une souris témoin GX200

Les reins des souris traitées par 200 mg/kg/jour d'Eop de *Ficus carica* ne présentent pas de modifications au niveau de parenchyme rénale, on remarque des agrégats lymphoïdes sous forme d'infiltrats inflammatoire mononucléés, mais ces altérations restent non significatives (Figure 34) et peuvent se présente chez des souris normales (d'après l'Anatomopathologiste).

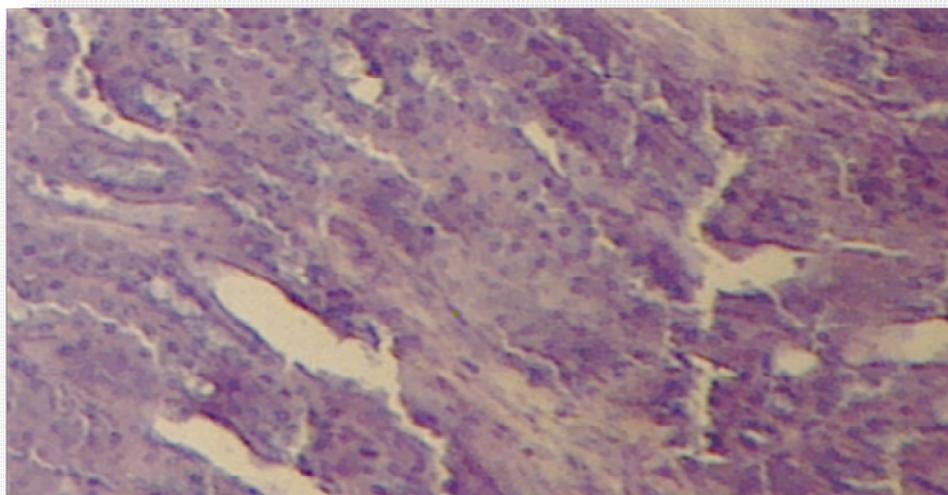


Figure 35 : Photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 1 (200mg/kg/jour) GX100.

Les reins des souris traitées par 400 mg/kg/jour d'Eop de *Ficus carica* ne présentent pas de modifications au niveau de parenchyme rénal, et des glomérules rénaux (figure 35)

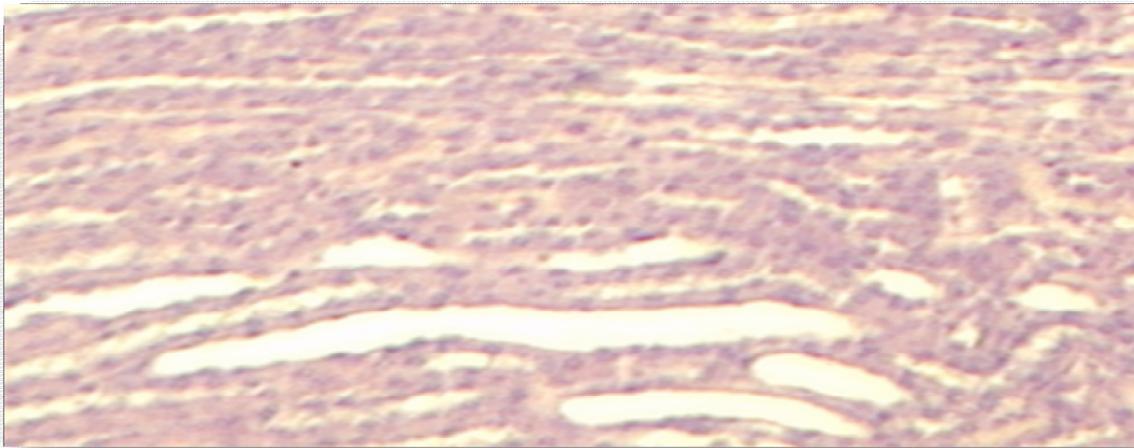


Figure 36: Photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 2 (400mg/kg/jour) GX100.

L'examen microscopique des reins des souris traitées par 800 mg/kg d'E_{op} de *Ficus carica* ne montre aucun changement significatif, et présente un parenchyme rénal normal par rapport au lot des souris témoin (figure 36)

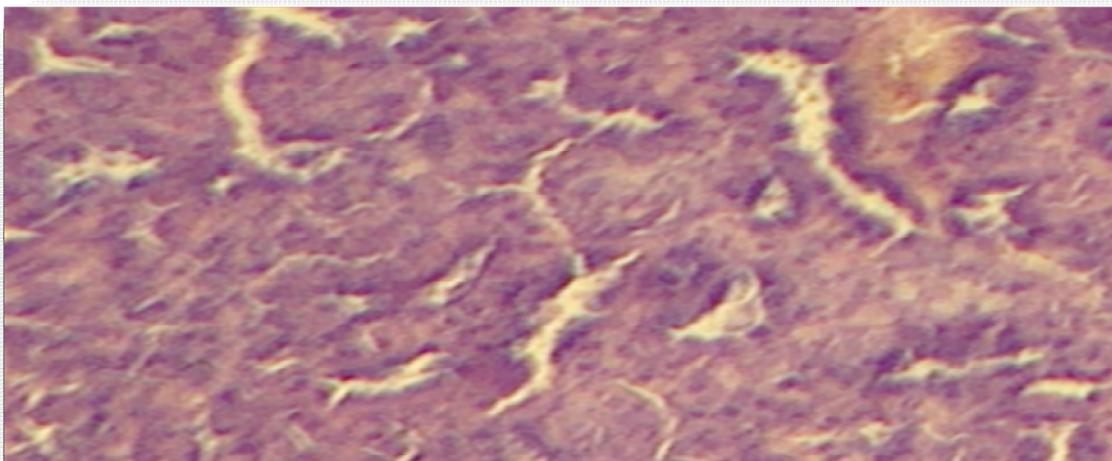


Figure 37: Photographie de parenchyme rénal d'une souris de lot 3 (800mg/kg/jour) GX100.

D'après l'étude histopathologique du foie des souris témoins, on constate que ce dernier a une architecture normale sans aucune modification hépatique au niveau du parenchyme, des espaces portes et même au niveau des veines centrolobulaire, ce qui confirme que les souris sont saines et ne présentent aucune anomalie hépatique.

En comparant l'aspect du foie des souris de lot 1 ; lot2 et lot 3 traitées par (200mg/kg/jour ; 400 mg/kg/jour et 800 mg/kg/jour respectivement), avec celui de lot témoin, on note aucune modification significative du parenchyme hépatique. Les études menées par Atsamo (2011), ont montrées que l'administration quotidienne par voie orale d'extrait aqueux *Erythrina senegalensis* à une dose de 1200 mg/kg/jour, ne révèle aucune altération hépatique. En effet, lors de l'étude de la toxicité aigüe et sub-chronique **Diospyros cordifolia, Das et ses collaborateurs (2011)** n'ont détectés aucune altération hépatique chez les souris traitée par l'extrait méthanolique de *Diospyros cordifolia* à une dose de 50 mg/kg/jour pendant 28 jours.

D'après l'étude histopatologique des reins des souris témoin, on constate que ces derniers ont un aspect normal sans aucune modification rénal au niveau de la capsule conjonctoadipeuse, des cellules de parenchyme rénal, des glomérules et même au niveau des tubes rénaux, ce qui confirme que les souris sont saines et ne présentent aucune anomalie néphrétique.

Aucun changement histopathologique significatif au niveau des reins de lot 1 ; lot 2 et lot 3 traitées par (200 mg/kg/jour, 400 mg/kg/jour et 800 mg/kg/jour respectivement) n'a été observé. En conclusion ces résultats histopathologiques sont en parfaite corrélation avec les analyses biochimiques qui n'ont montré aussi aucune altérations des paramètres hépatiques et rénales confirmant que la graine de *Ficus carica* peut se classer parmi les plantes non ou très faiblement toxique.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre d'étude des activités biologiques et le dosage des différentes classes de composés phénolique contenus dans les extraits de feuilles de *Ficus carica*, Plusieurs analyses ont été effectuées et les résultats obtenus ont montré que :

- L'utilisation du plan d'expérience Box-Behenken pour optimiser l'extraction des polyphénols a révélé un taux d'extraction de 68,49 g E .A.G /Kg de MS, en utilisant un temps d'extraction 115.82 seconde, de l'acétone 48 %, la puissance 601.99 watt, et rapport masse/solvant d'extraction 1/6.
- La teneur en flavonoïdes de l'extrait optimal est de 35,61 g E.Q. /kg de MS, tandis que la teneur des tannins totaux est de 37,52 g E.A.T. /kg de MS.
- Le pouvoir réducteur, estimé par le test de réduction de chlorure ferrique, de l'extrait optimal est de l'ordre de 46,53%.
- La réduction du phosphomolybdate, a révélé également une activité réductrice de l'ordre de 53.19%.
- Le pouvoir anti-radicalaire, *vis-à-vis* le DPPH* et l'ABTS*⁺ a révélé des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 37.18% et 90 ,451% pour des concentrations en extrait de l'ordre de 3mg/ml, 6mg/ml respectivement.
- L'étude de la toxicité sub-chronique d'extrait optimisé des feuilles de *Ficus carica* , après l'administration orale à des doses de 200, 400 et 800mg/kg/jour pendant 28 jours, n'a montré aucun effet sur les paramètres sanguins, hépatiques et néphrétique, à savoir les transaminases AST/ALT, bilirubine, urée, créatinine.
- Lors de l'étude histopathologique du foie et des reins, aucun changement histopatologique significatif n'a été observé au niveau de ces deux organes. ces principaux résultats montrent que l'extrait de la plante *Ficus carica* ne possède aucun effet toxique sur les souris Swiss albinos.

En terme de perspective et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- ❖ Utiliser des techniques d'analyse avancées (HPLC-MS, RMN etc....) pour identifier les antioxydants de l'extrait.
- ❖ Optimiser d'autres facteurs influençant le taux d'extraction des polyphénols tel que la granulométrie de la poudre, le pH d'extraction.
- ❖ Etudier les autres activités biologiques (in vivo) de l'extrait, anti-inflammatoire, antimutagène, anti-cancérogène....etc.
- ❖ Provoquer une constipation et étudier l'extrait optimisé de *Ficus carica* comme laxatif.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdel-Hameed E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus carica* species leaf samples. *Food Chemistry*, 114:127-1277.

Anonyme. (2004). Les polyphénols: Introduction .Compte Rendu du 1^{er} colloque sur les applications de polyphénols .Société Française des antioxydants. Article ISANH.

AnonymeI : Dictionnaire français, Sensagent. (2009), site Internet www.senagent.com

Arache W et Blidi N. (2013). Optimisation des techniques d'extraction des composés phénoliques à partir de feuilles de figuier (*Ficus carica*) par le model Box-Behnken et étude de quelques activités biologiques. Université de Bejaïa.

B

Balasundram N, Ai T.Y, Sambanthamurthi R, Sundral K. et Samman S. (2006) antioxydant properties of palm fruit extract *Asia Pac J Clin Nutr*, 4 : 319-324.

Bastida-Zavala, J.R. and H.A. ten Hove. (2002). Revision of *Hydroides* Gunnerus, 1768 (Polychaeta: Serpulidae) from the Eastern Pacific Region and Hawaii. *Beaufortia* 53(4): 1-43.

Biomagheb. (2008). La fiche technique des réactifs utilisé.

Birt D.F, Hendrich S, Wang W. (1999). *Pharmacology and Therapeutics*, 90,151-177

Bonnaillie C, Salacs M., Vassiliova E, et Saykova I, (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*. Vol. 7. (2012). pp. 35-45.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., SKandrani I., Felleh H.,et Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of tunisian *Nigella stavia L. Shoods and roots*. *Compte Rendus biologies*,331: 48-55.

Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M. et Velic D. (2007). Study of solid-liquid extraction Kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of food Engineering*, 81:236-242.

Burtis C.A, Ashwood E.R, Bruns DE. WB Saunders Co . (2005). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th Edition ; pp : 50-61.

C

Canal J.R.Toores M.D ,Romero A et Perez C . (2000).A chloroform extract obtained from a decoction of *ficus carica* leaves improves the chesterolaeamic status of rats with streptozotocin-induced diabetes.*Acta physiologica hungarica*,87:71-6.

Chaabouni M.M., Ayedi H.F. et Kamoun A. (2011). Plans d'expériences et traitements de surface - Étude quantitative des effets et interactions. *Techniques de l'ingénieur*, Paris.

Chagnon P. (2005_a). Plans d'expériences (partie 1) : Principes généraux. *Contrôles Essais Mesures*, 11: 69-72p.

Chagnon P. (2005_b). Plans d'expériences (partie 2) : Les modèles de régression. *Contrôles Essais Mesures*, 11 :69-72p.

Chandrika L. P et Fereidoon S. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry* 75:509-512.

Chavan. U.D; F.Shaidi F. et Nacz M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L*) as affected by different solvents. *Food chimistery* 75:509-512.

Chin Y.F., Jumat S. et Mamot S. (2010). Optimization of urea complication by Box-Behnken design. *Sains Malaysiana*, 39:795-803.

Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. et Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction conditions of condition of antioxidant phenolic compounds from mashua (*tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. *Separation and purification Technology*, 55:217-225.

Couplan F., (1998). Guide nutritionnel des plantes sauvage et cultivé. Edition : DELACHAUX et NIESETLE s. a (Paris-France).pp 13-133.

Crozier A., Jaganath I.B., and Clifford M.N. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview *In* Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet. Ed. *Ltd*.Singapore, P: 11.

D

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

Djeridane A., Yousfi M., Nadjema B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006).

Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97: 654-660.

Doymaz, I. (2004). Pretreatment effect on sun drying of mulberry fruits (*Morus alba*, L.). *Journal of Food Engineering*, 65: 205-209.

Dykes, L., Peterson, G.C., Rooney, W.L., Rooney, L.W. (2011). Flavonoid composition of lemon-yellow sorghum genotypes. *Food Chem.* 128, 173–179.

E

El-Adawi H., Abdel- Fattah Y. et Abd El-Wahab A. (2011). Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from milk thistle seeds.

El- Beshbishy H.A., Mohamadin A.M. et Abdel-Naim A.B. (2009). In vitro evaluation of the antioxidant activities of grape seed (*Vitis vinifera*) extract, blackseed (*Nigella sativa*) extract and curcumin. *JTU Med Sc*, 4:23-35.

El-Khaloui M., 2010. Valorisation de la figue au Maroc. Transfert de technologie en agriculture (Maroc) ; 186 : 1-4.

Elsayed K. et Lacor C. (2010). Application of response surface methodology for Modeling and optimization of the cyclone separator for minimum pressure drop. *V European Conference on Computational Fluid Dynamics*.

El-Shobaki F.A, EL-Bahay A.M, Esmail R.S.A, Abd El Mageid A.A et Esmail N.S . (2010). effect of figs (*Ficus carica*) and its leaves on hyperglycemia in alloxan diabetic rats. *Words journal of Dairy & food science*, 5 :47-57.

Evans, J.L., 2007. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? *Indian Journal Medical Research* 125: 355–372.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique - novembre-décembre 2003. Grenoble

Faucher J. (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, 198p.

Fernandez-Orozco R., Roca M ., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero L. (2011). DPPHscavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (*cv. Arbequina*) during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 858–864.

Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandão G.C., Da Silva E.G.P., Portugal L.A., Dos Reis P.S., Souza A.S. et Dos Santos W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597:179–186.

Floegel A., Kimb D.O., Chung S.G., Koo S.I., Chun O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods *Journal of Food Composition and Analysis* 24 :1043–1048.

Frank C.LU. (1992). Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. *Edition Masson, Paris*, pp : 175-202.

Friedman R.B and Young D.S. (2001). Effects of disease on Clinique laboratory tests. 5th ed. *AACC*, PP: 60-75.

G

Gascuena E. et Roma G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape vitis vinifera varieties grown in a warm climate. *Journal of food composition and analysis*, 19 : 687.

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

Gee JM, Johnson IT. (2001). Polyphenolic compounds : interaction with the gut and implication for human health (01-182). *Curr Med Chem* 8:11.

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

Goupy J. (2012). Modélisation par les plans d'expériences. *Techniques de l'Ingénieur*, Paris.

Goupy J. et Creighton L. (2006). Introduction aux plans d'expériences. Edition Dunod, Paris, 336p.

Granato D., Favalli Branco G. et DE Araujo Calado V.M al, (2011). Experimental design and application of response surface methodology for process modeling and optimization: A review. *Food Research International*, *In press*.

Grigonis D., P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl and C.S. Eskilsson,(2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (Hierochloë). *Journal of Supercritical Fluids*, 33, 223.

Gulcin I. (2012). Antioxydant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86:345-391.

H

Haddad F. (2000). Contribution à la caractérisation biométriques et technologiques de quatre variétés de figuier cultivées dans deux régions de kabylie .Memo :Ing.agr ; Univ Tizi-Ouzou, 48p.

Haesslein D et Oreiller S. (2008). Fraiche ou séchée, la figue est dévoilée .Filières Nutrition et diététique. Haute école de santé, Genève.

Hagerman A.E et Butler L.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 26: 809-812.

Hagerman A.E, et Butler,L.G (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of chemical ecology* 15:1795-1810.

Hammoudi M. (2012). Contribution à l'étude de la bioécologie de la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* weidemann (Diptera : Tephritidae) sur fruit d'été. Mémoire de fin de cycle spécialité de l'INAT. Etablissement d'Enseignement Supérieur Agronomique, Tunis.

Hussain Saad, Mumtaz Mohammed Hussain M., Ishwar Bhat K., Revanasiddappa , Abubaker Siddiq and Bharathi D.R.(2011).Antimicrobial and cytotoxic evaluation of (*e*)-thienyl chalcones derived from thiophene-2-carbaldehyde. *Pharmacologyonline* 3: 880-888.

J

Jalili A., Alipour S.et Sadegzadeh A. (2011). Antioxydant and antiradical activities of phenolic extracts from *Juglans regia* hulls and shells. *Journal of plant Science*, 11:282-289.

Jeddi L. (2009) valorisation des figues de Taouante : potentiel, mode et stratégies proposés. Affection actuelles : direction provinciale d'agriculture de Taouante .Présenté dans le cadre de l'examen d'aptitude professionnelle pour l'avancement de garde dans le cadre d'ingénieur d'état. Maroc, 29p.

Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Plan inić M and S. Tomas,(2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* vol. 28.pp. 206- 212.

Joseph B ,Raj S.J. (2011).Pharmacognostic and phytochimicale properties of *ficus carica* Linn-An overview. *International journal of Pharm Tech Research*, 3:8-12.

Juntachote T., Berghofer E., Bauer F. et Siebenhandl S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 121-133.

K

Kashif G. et Yang H.C. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compound and antioxidants from grap peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52:295-300.

Konyalioglu S., Saglam H. et Kvcak B. (2005). α -Tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxydant activity of *ficus carica* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 43:683-686.

L

Lansky E.P., Paavilainen H.M. (2011). Figs: The Genus Ficus. Edition CRC Press, NewYork, 384p.

Lawson J. (2010). Design and analysis of experiments with SAS. Edition CRC Press, New York, 582p.

Leandro G.A. Kriaa K., Nikov I. et Dimitrov K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and purification Technology*, In press.

Lenoir Loïc.(2011). Effet protecteur des polyphenols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie EA 4233 "Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale" Université d'Auvergne.France.

Li H., Wang X., Li Y., Li P. et Wang H. (2009). Poliphenolic compounds and antioxydant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112: 554-460.

Lim Y.Y., Lim T.T., Tee J.J. (2006). Antioxidant properties of several tropical fruits: Comparative study. *Food Chemistry*, 103: 1003-1008.

Liu Q.M., Yang X.M., Zhang L. et Majetich G. (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from folium eucommiae and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Reasearch*, 23:2503-2511.

M

Macheix J.J., Fleuriet A .et Allemand C.J. (2005). Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux .les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique .Ed . Presse polytechnique Universitaire Romandes : 1-155

Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. *Ed Presses polytechniques et universitaires Romandes*. PP 87-149.

Manian R., Anusuya N., Siddhuraju P. et Maninan S, (2008). The antioxydant activity and free radical scavenging potentiel of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, 107:1000-1007.

Marchall .W et Bangert .S.K (2005). Biochimie médicale, physiopathologie et diagnostic. Edition Elsevier, pp : 59-99.

Metch, M et Girardien, M. (1980). Les polymères végétaux (polymères pariétaux et alimentaires non azotés). Edition Gauthier Villars, Paris, pp 258-281.

N

Nacz M. et Shahidi F, (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Jornalof pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:1523-1542.

Nkhili E-Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des pays de vaucluse, Montpellier.

O

Ohkoshi, E., Nagashima, T., Sato, H., Fujii, Y., Nozawa, K., Nagai, M. (2009). Simple preparation of baicalin from *Scutellariae Radix*. *J. Chromatogr. A* 1216, 2192–2194.

Oguzhan C., alis- kan A. et Aytakin polat A. (2008). Fruit characteristics of fig cultivars and genotypes grown in turkey. *Scientia Horticulturae*. 115 : 360–367.

Oukabli, A. (2003). unité de recherche sur l'amélioration des plantes et conservation des ressources phyto-génétique, INRA, centre régional de Meknès, bulletin réalisé par l'Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat institue, Maroc.

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

P

Pérez-Jiménez J. et Saura-Calixto F. (2006). Effectof solvant and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Reseach International*, 39:791-800.

Prigent S. (2005). Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties. These de doctorat.Université, de Wageningen. Hollande.

Q

Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet J, Luyck M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F. (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-40.

R

Raissi S. et Farsani R.E. (2009). Statistical process optimization through multi-response surface methodology. *World academy of science, Engineering and Technology*, 51:267-271.

Ramalakshmi K., Kubra I.R. et Mohan Rao L.J. (2008). Antioxydant potentiel of lowgrade coffee beans. *Food Research International*, 41: 96-103.

Rawel H.M., Meidtnr K.et Kroll J. (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of agricultural and food Chemistry*, 53:4228-4235.

Re R., Pellegrini N., Proteggent EA., Pannala A., Yang M., et Rice-evans C. (1998). Antioxydant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10): 1231–1237.

Ribéreau-Gayon P , (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris,254p.

Rodriguez montealegre R. Romero Peces J. L., Chacon Vozmediano J., Martinez

S

Saad B, Azaizeh H, Abu-Hijleh G, Said O. (2006). Safety of traditional Arab herbal. *EvidBased Complement Alternat Med*;3: 433–9.

Saraphirom P. et Reungsang A. (2010). Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International journal of hydrogen energy* , 35: 13435-13444.

Shimizu H.(2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population :the Hisayama study, *Stroke*,35 (9) : 2072-2077.

Serraclara A, Hawkins F, Perez C, Dominguez, E, Campollo J.E et Torres M.D (1998). Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction in type I diabetic patients. *Diabetes research and Clinical Practice*, 39-22.

Silbernagl S et Despopoulos A . (2008) . nutrition et digestion. Dans « Atlas de poche de physiologie ». *Médecine Science Publication*, 4^{ème} édition, pp : 212-216.

Simon, C et Barathieu, B (2003). Three-dimensional structure and dynamique of wine tannin Saliva Protein complexes. *A Multitechnique approach Biochemistry*, 42: 10385-10395.

Sirwal IA., Banday KA., Reshi AR., Bhat MA., Wani M.M. (2004). Estimation of Glomerular Filtration Rate (GFR). *JK Science* .6: 121-123.

Soumyanath Amala, Radhakrishnan Venkatasamy, Meghna Joshi, Laura Faas, Bimpe Adejuyigbe, Alex F. Drake, Robert C. Hider and Antony R. Young. (2006). UV Irradiation Affects Melanocyte Stimulatory Activity and Protein Binding of Piperine. Department of Pharmacy, Kings College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NN, UK John's Institute of Dermatology, Division of Genetics and Molecular Medicine, King's College London, Thomas' Hospital, London SE1 7EH, UK.

Suhaj M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of food composition and analysis*, 19: 531- 537.

Suriyavadhana M et Tpakutharivu P. (2011) Evaluation of Acute and Sub Acute Toxicity of Ethanol Extracts of *Entada pursaetha*, *Toddalia aculeate*, and *Ziziphus mauritiana*. *World J Life Sci. and Medical Research*, 1 (2): 43-47.

T

Tinsson W. (2010). *Plants d'expérience: construction et analyses statistiques*. Edition Spring, New Yorks, 532.

Turkmen Erol N., Sari F., Polat G. et Velioglu Y.S. (2009). Antioxydant and Antibacterial Activities of Various Extracts and Fractions of Fresh Tea Leaves and Green Tea. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 15:371-378.

U

Uma D.B., Ho C.W. et Wan Aida W.M. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. *Sains Malaysiana*, 39: 119-128.

V

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

Vermerris W. et Nichelson R. (2008) phenolic compound Biochemistry. *Springer science and Business Media B. V. P.* 36.

Veberic R., Colaric M. et Stampar F. (2008). Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*figus carica L*) in the northern mediterranean region. *Food chemistry*, 106: 153-157.

Vilmorin J-B. (2003). *Histoire d'arbre*. Ed. Jean- Paul Gisserot. 74p.

Vivier S. (2002). *Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis*. Thèse de Doctorat, Ecole Centrale de Lille et Université des Sciences et Technologies de Lille, 309p.

W

Whitby I.G. , Smith A.F., beckett, G.J. (1988). *Lecture note of clinical chemistry*.4th Edition, Blackwell scientific publications, oxford, pp : 153-154.

Wang L., Yang B., Du X. et Yi C. (2008). Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry*, 108: 737–741.

Y

Young D.S and Friedman R.B.(2001) : Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC press, pp: 22-30.

Z

Zaoui A., Cherrah Y., Alaoui A., Mahassini N., Amarouch H., Hassar M. (2002). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 9 : 69-74.

Annexes

Annexe I : la figue

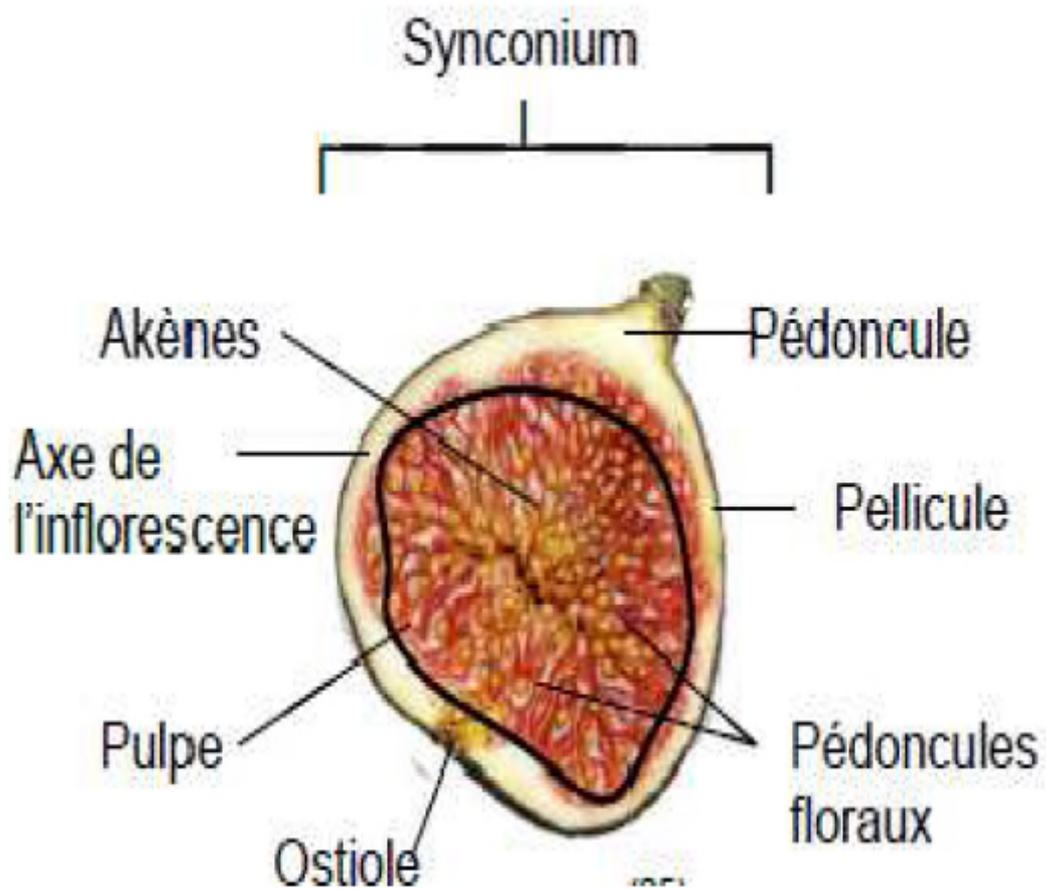
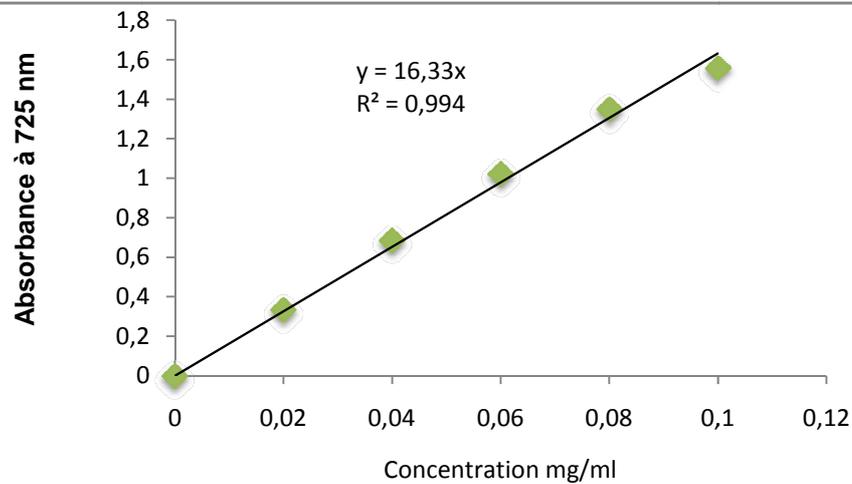
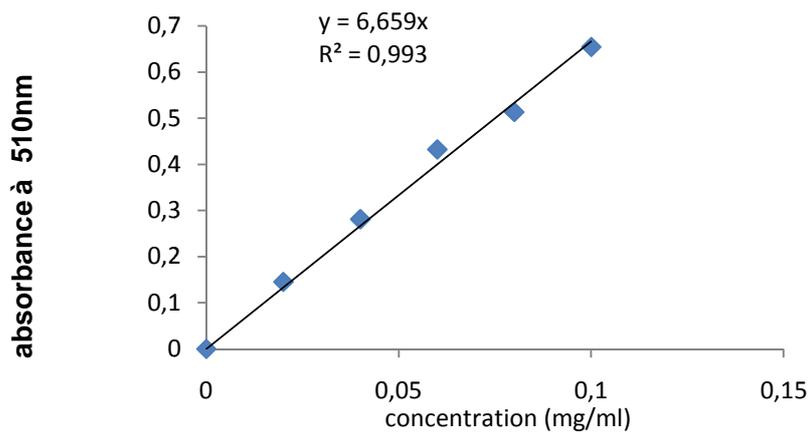


Figure : Coupe d'une figue (Haesslein et Oreiller, 2008)

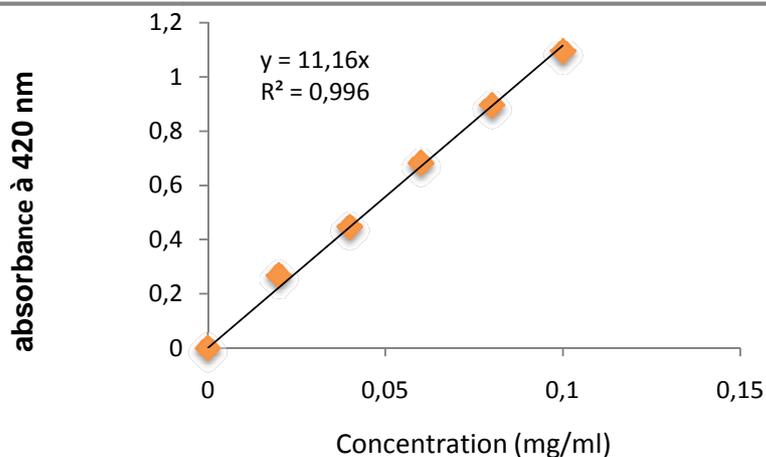
Annexe II : Courbes d'étalonnages utilisés pour le dosage des composés phénolique



Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique



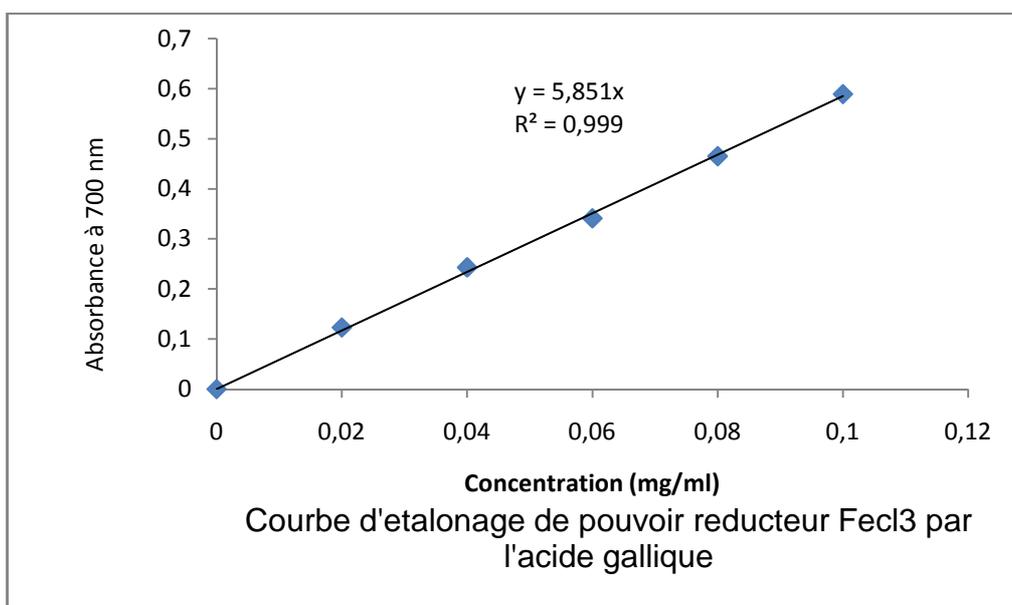
courbe d'etalonnage pour le dosage des tannins on utilisant l'acide tannique



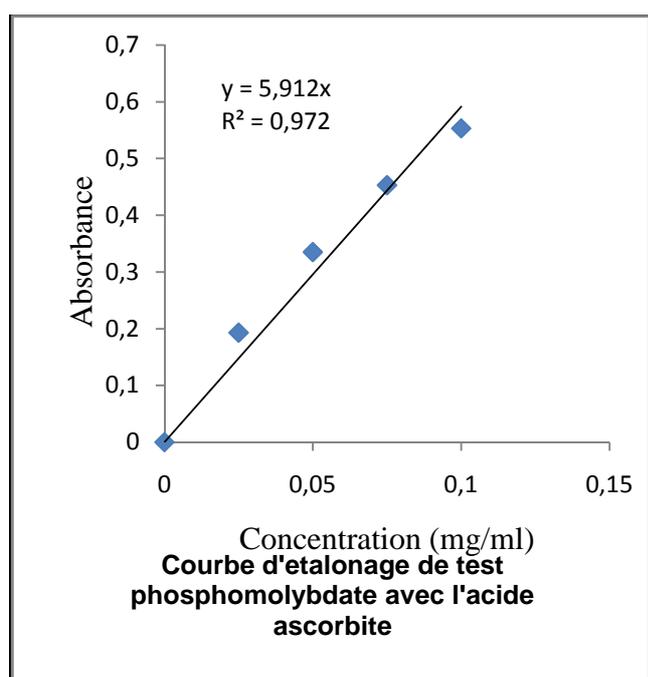
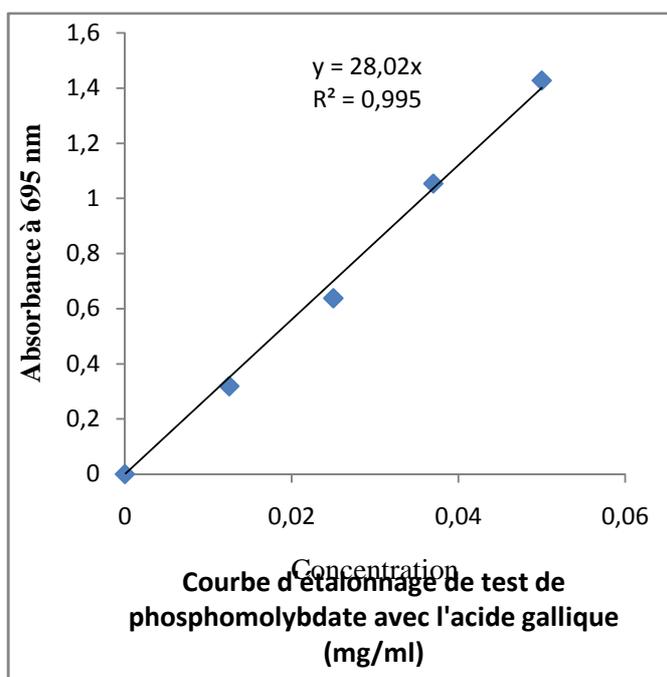
courbe d'etalonnage pour le dosage des flavonoibes en utilisant la quercitine

Annexe III : Courbes d'étalonnages utilisés pour étudier le pouvoir réducteur de l'extrait optimal

1- Pouvoir réducteur de FeCl₃

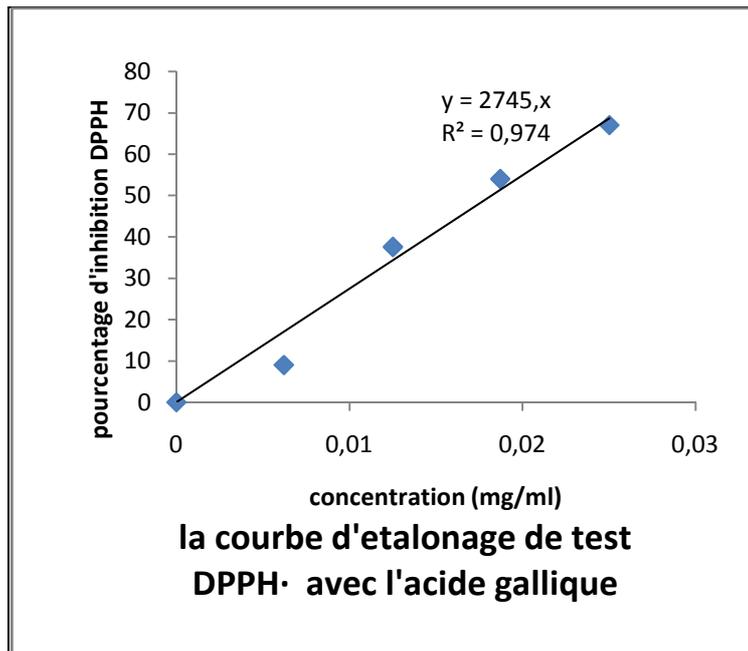
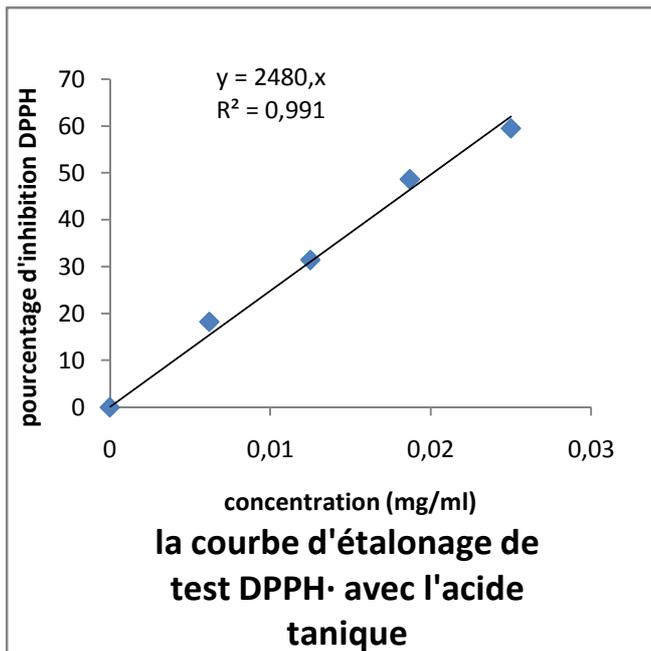


2- Pouvoir réducteur du phosphomolybdate

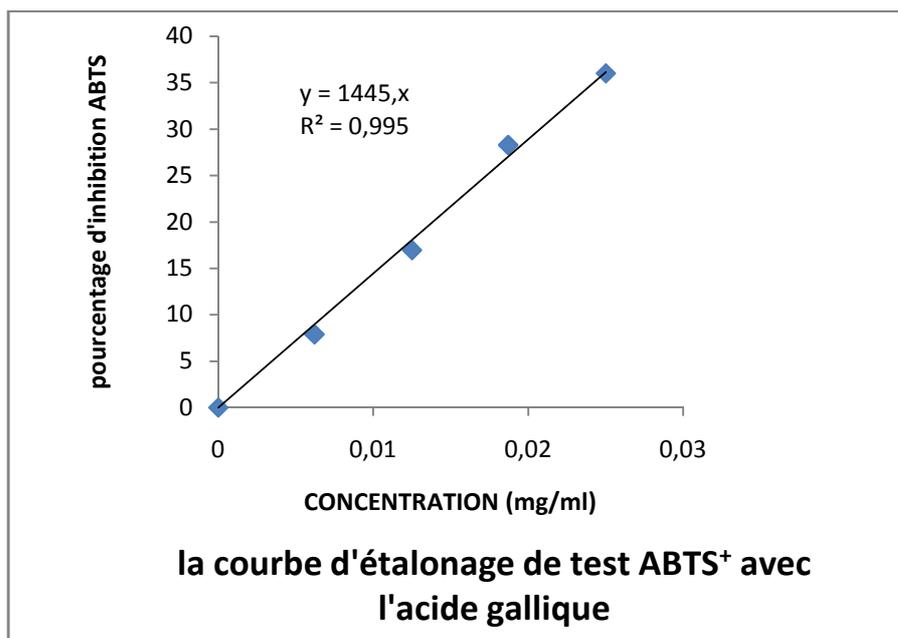


Annexe IV: Courbes d'étalonnages utilisés pour étudier l'activité anti-radicalaire de l'extrait optimal

1. Pouvoir anti-radicalaire (DPPH)



2. Pouvoir anti-radicalaire (ABTS*+)



Annexe V : Matériel et réactifs utilisés

Matériel	Réactifs
-Agitateur	-Acide acétique
-Ampoule à décompte	-Acide Gallique
-Bain Marie (MEMMERT)	-Acide sulfurique
-Balance de précision : BP 310P	-Acide tannique
-Barreaux magnétique	-Acétone
-Becher	-Acide Ascorbique
-Broyeur électrique	-Carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$)
-Centrifugeuse (NUVE)	-Chlorure d'aluminium, AlCl_3
-Cuve	-Chlorure ferrique (FeCl_3)
-Etuve : BINDER BD 53	-Chloroforme (CHCl_3).
-Matériel spéciale pour la décimation	-Diphényl picryl-hydrazyl (DPPH)
-Micropipette	-Eau distillée.
-Papier aluminium	-Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 99%).
-Papier filtre Wattman	-Ether de pétrole.
-Ph mettre : WTWPH 422	-Ferrocyanure de potassium, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$
-Pipette	-Folin-ciocalteu
-portoir	-Méthanol (CH_4O)
-Rotavapor	-Quercetine
-SpectrophotomètreUV-VIS (SHIMACLZU , 1240 MINI)	-Solution de l'ABTS ⁺ .

Annexe VI : La fiche technique des différents réactifs utilisés dans le bilan rénal et hépatique.

- **Réactif de travail A de l'urée** = Dissoudre le flacon R2 dans le tampon R1 valide jusque à 6mois à 2-8 °C et 14 jours à 20-25 °C.

Réactif 1	Tampon	
Réactif 2	EDTA	2mmol/l
	Salicylate de sodium	60mmol/l
	Nitroprussiate de sodium	32mmol/l
	Uréase	30000U/l
	Phosphate pH 6.7	60mmol/l
Réactif 3	Etalon urée	8.325mmol /l
Réactif 4	Hypochlorite de sodium	40mmol /l
	Hydroxyde de sodium	150mmol/l

- **Réactif de travail de la créatinine** = Mélanger à parts égales le réactif 1(R1) et le réactif 2(R2) valide jusque 1 mois à 20-25°C.

Réactif 1	Hydroxyde de sodium	1.6mol /l
Réactif 2	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif 3	créatinine	2mg/dl
Standard		20mg/l
		176.8 µmol /l

- **Réactif de travail de la transaminase ALAT (GPT)**= Reprendre le substrat R2 par 3ml de tampon R1, Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C et 24 heures à 20-25 °C.

Réactif 1	Tampon Tris PH 7.5 à 30°C	100mmol/l
	Solution Tampon Alanine	500mmol/l
Réactif 2	NADH	0.18mmol/l
	LDH	1200 UII
	Oxoglutarate	15mmol/l

- **Réactif de travail de la transaminase ASAT (GOT)**= Reprendre le substrat R2 par 3ml de tampon R1, Cette solution de travail est stable 7jours à 2-8°C et 24 heures à 20-25°C.

Réactif 1	Tampon Tris PH 7.5 à 30°C	80mmol/l
	Solution Tampon L-aspartate	200mmol/l
Réactif 2	NADH	0.18mmol/l
	LDH	800 U /l
	MDH	600 U /l
	Oxoglutarate	12mmol/l

Résumé

Le *Ficus Carica* est une plante endémique du bassin méditerranéen et à une grande valeur nutritive et pharmacologique. L'objectif de présent étude comporte deux partie essentielle la première est in vitro consacré sur l'étude de l'activité biologiques et pharmacologique des polyphénols contenus dans les feuilles de *Ficus Carica* ainsi leur activité antioxydants assisté par une extraction par micro-onde ; la deuxièmes partie in vivo visent à testes l'extrait optimisé de ces feuilles en différente doses (200,400 et 800 mg/kg) sur des souris Wister albinos pendant une durée de 28 jours pour évaluer la toxicité subchronique et pour cela des analyse hépatiques (ASAT,ALAT et Bilirubine)et rénale (Urée et Créatinine)du sang des souris ainsi des coupes histologique pour le fois et les reins sont effectuée . Les conditions d'extraction des polyphénols sont le temps, la puissance, le rapport masse/solvant et le solvant ont été optimisées en appliquant le plan expérimental Box- Behnken.la teneurs en polyphénols est 68,49g E.AG/kg et les résultats de test in vivo indique la non apparition de toxicité. Ce qui les études histologiques ont montré qui sont en parfaite corrélation avec les analyses biochimiques qui ils ont montré aussi aucune altérations des paramètres hépatiques et rénales confirmant que la plantes de *Ficus carica* peut se classer parmi les plantes non toxique.

Mots clés: *Ficus Carica*, in vitro, polyphénols, Box-Behnken, in vivo, toxicité subchronique.

Abstract

Ficus Carica is an endemic plant of the Mediterranean and a high nutritional and pharmacological value. The objective of this study has two essential part is the first in vitro devoted to the study of the biological and pharmacological activity of polyphenols contained in the leaves of *Ficus Carica* and their antioxidant activity assisted by extraction with microwave ; the second part tested in vivo designed to extract optimized these leaves different doses (200.400 and 800 mg / kg) on Wister albino mice for a period of 28 days to evaluate the subchronic toxicity and why liver analysis (AST , ALT and bilirubin) and renal (creatinine and urea) from the blood of mice and histological sections to fold and kidneys are made. The polyphenol extraction conditions are time, power, mass / solvent and solvent ratio were optimized by applying experimentally Box Behnken.la polyphenol contents is 68.49 g E.AG / kg and results in vivo test indicates the non appearance of toxicity. What histological studies have shown that are perfectly correlated with biochemical analyzes that they also showed no alterations in hepatic and renal parameters confirming that the plants *Ficus carica* can be classified as non-toxic plants.

Keywords: *Ficus Carica*, in vitro, polyphenols, Box- Behnken , in vivo, subchronic toxicity.