

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
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

*Etude de la toxicité aigüe et sub-chronique de
l'extrait méthanolique de romarin (*Rosmarinus
officinalis*) sur des souris swiss albinos*

Présenté par

M^{elle} BETROUNE Rebiha

M^{elle} BEZZIOU Sabrina

Membre de jury

Présidente :	D ^r KHETTAL B.	(M.C.A) U.A.M.Béjaia
Promoteur :	M ^{er} BELMOUHOU B. M.	(M.A.B) U.M.Constantine
Co-promoteur :	M ^{er} Tachrfiout M.	(M.A.A) U.A.M.Béjaia
Examineur :	M ^{er} Basli A.	(M.A.A) U.A.M.Béjaia
	M ^{er} Boukhalfa F.	(M.A.A) U.A.M.Béjaia

Année universitaire : 2013/2014

REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir
donné la force et la
Patience de mener à bien ce modeste travail.*

*Nous avons la reconnaissance et la gratitude à remercier notre promoteur
Mr. Belmouhoub M, de nous avoir confié ce thème et de nous avoir orienté et
conseiller afin de réaliser ce modeste pat de recherche.*

*On vous remercie infiniment pour votre encadrement, votre disponibilité et
votre gentillesse. Nous vous adressons notre profonde reconnaissance pour vos
remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.*

*Nous adressons nos remerciements à notre co-promoteur monsieur
Tacherfiout M.*

*Nos remerciements vont aussi au Docteur Khettaf B, qui nous a fait le grand
honneur de présider ce jury et d'évaluer ce mémoire.*

*Notre grande considération et notre vive reconnaissance, à Messieurs Basli et
Boukhalifa, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de faire partie de
jury, pour évaluer notre travail, en dépit de leurs nombreuses autres
obligations.*

*Nous tenons à remercier l'équipe du laboratoire d'anatomopathologie de
Frantz fanon de Bejaia pour leur aide et leur chaleureux accueil.*

*Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de
loin à la réalisation de ce mémoire.*

Dédicaces

Avant tout, j'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma très chère mère, qui a su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, qui n'a pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'études, les mots ne suffiront pas et n'exprimeront pas tout ce que j'aimerais te dire. J'espère pouvoir te rendre une partie de ton amour, tu es la personne la plus chère du monde.

J'aimerai dédier ce travail à celui qui a été toujours présent, sans ta confiance, ta compréhension, ton soutien et surtout la bonne éducation que tu nous as donnée, je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui. Tout mon respect et mon affection.

À mes très chères frère et sœur : Tayeb et Selma

À mes très chères grand-mères, que dieu les garde pour nous

À mes oncles, tantes, cousins et cousines que j'aime

À mes très chères amies qui ont répondu à chaque fois que j'avais besoin d'eux en particulier : Fatiha, Kahina, Lynda, Sabrina, Sara, Dounia

À toi mon binôme, la plus agréable, compréhensive et patiente Rebiha ainsi que toute ta famille.

À toi Wassilla et Zakia, pour les moments agréables qu'on a passé ensemble durant ce travail.

À tous personne donnant un coup de main et aide de près ou de loin

À toute la promotion Biochimie appliquée 2013-2014.

Sabrina

Dédicaces

A la mémoire de mes grands-parents

Avant tout, j'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour a mes chers parents

A Ma chère mère qui a été toujours à mes cotés, qui n'a pas cessée de m'encourager durant toutes mes années d'études.

A Mon cher père qui a su me faire confiance et me soutenir en toute circonstance, et pour la bonne éducation que tu nous as donnée

Sans votre soutien, votre compréhension, votre amour je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui

Les mots ne suffiront pas et n'exprimeront pas tout ce que j'aimerai vous dire j'espère pouvoir vous rendre une petite partie de votre amour

Tout mon respect et affection

A mes chers grands-parents yemma touma , djedi, et yemma koukou

Aux meilleurs frères du monde : Massinissa et Yani

A mes chères tantes et leurs maries, mes oncles et leurs femmes

Qu'ont toujours cru en moi-même dans les moment les plus de doute

A mon fiancé Hocine et ma belle famille

A da Brahim ,lila ,et rassim

A toute la famille, BETROUNE ,AZZI ,et SAKER

A mes meilleurs amies : lynda, djidji, Ryma, samia, sonia, sabrina, kahina,

A toi Sabrina et toute ta famille

Je remercie également Ouassila et Zakia pour leurs aides

A toute la promotion de biochimie appliquée 2014

Rebiha

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralité sur la plante

I.1.Généralités sur le plantes médicinales	3
I.2.Généralité sur la plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	3
I.2.1.Historique.....	3
I.2.2.Etymologie	4
I.2.3.Description botanique	4
I.2.4.Répartition géographique.....	5
I.2.5.Systématique botanique	5
I.2.6.Utilisation	5
I.2.7.Propriétés thérapeutique du romarin	6
I.2.8.La composition chimique	7
I.3.Généralités sur les composées phénoliques des plantes.....	8
I.3.1.La biosynthèse des polyphénols.....	8
I.3.2.Classification des polyphénols.....	9
I.3.3.La pharmacocinétique des polyphénols	11
I.3.3.1.La biodisponibilité	12
I.3.3.2.L'absorption et métabolisme.....	12

Chapitre II : Généralité sur la toxicité

II.1.Notions de toxicité	13
II.1.1.Historique	13
II.1.2.Définition	13
II.1.3.Classification	13
II.1.3.1.Toxicité aigüe	13

II.1.3.2.Toxicité sub-chronique	14
II.1.3.3.Toxicité chronique	14
II.1.4.Devenir d'un toxique dans l'organisme.....	15
II.1.5.Organes cibles des toxiques.....	15
II.2.Hépatotoxicité.....	16
II.2.1.Physiologie de foie	16
II.2.2.Biotransformation des xénobiotiques	17
II.2.3.Les lésions hépatiques	18
II.2.4.Tests hépatiques.....	18
II.3.Néphrotoxicité.....	19
II.3.1.Physiologie des reins.....	20
II.3.2.Elimination rénale.....	21
II.3.3.Néphrotoxicité.....	21
II.3.4.Tests rénales.....	22
II.4.Méthodes d'étude de toxicité.....	22
II.4.1.Méthodes <i>in vivo</i>	22
II.4.2.Méthodes <i>in vitro</i>	23
II.5.Pancréa-toxicité de la streptozotocine.....	24
II.5.1.Définition de la streptozotocine.....	24
II.5.2.Structure chimique de la streptozotocine.....	24
II.5.3.Mode d'action de la streptozotocine.....	24

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1.Matériel.....	26
III.1.1.Produits chimiques.....	26
III.1.2.Matériel végétal.....	26
III.1.3.Choix des animaux et conditions d'élevage.....	26
III.2.Méthodes.....	27
III.2.1.Extraction des polyphénols de <i>Rosmarinus officinalis</i>	27
III.2.2.Calcul du rendement.....	27

III.2.3.Dosage des polyphénols.....	28
III.2.2.Etude de la toxicité de <i>Rosmarinus officinalis</i>	28
III.2.2.1.Etude de la toxicité aigüe.....	28
III.2.2.2.Etude de la toxicité sub-chronique.....	30
III.2.2.3.Mesure de volume d'eau et la quantité de la nouritures consommée.....	30
III.2.2.4.Etude de l'évolution pondérale des souris.....	31
III.2.3.Etude histopathologique.....	31
III.2.4. Etude de l'effet préventif de l'extrait contre le diabète induit par la stréptozocine.....	34
III.3. Analyse statistique.....	36

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extraction et teneur en poly-phénols totaux et en flavonoïdes.....	37
IV.2.Evaluation de la toxicité.....	38
IV.3.Effet protecteur de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> contre la poncréatoxicité de la stréptozocine (STZ).....	53

Conclusion et perspectives.....	55
--	-----------

Références bibliographique

Glossaire

Annexes

Liste des abréviations

- **ASAT** : Aspartate Aminotransférase.
- **ALAT** : Alanine Aminotransférase
- **CNTL** : Control.
- **DL50** : Dose létal 50
- **EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
- **EM** : Extrait méthanolique
- **K⁺** : Potassium
- **LDL** : Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de basse densité).
- **mg EAG/g** : Milligramme d'Equivalent d'Acide Gallique par gramme d'extrait.
- **MO₀₄²⁻** : Acide phospho-molybdique
- **NaCl** : Chlorure de sodium.
- **Na₂CO₃**: Carbonate de sodium
- **Na⁺** : Sodium
- **OCDE** : organisation pour coopération et développement économique.
- **OH** : Fonction hydroxyle
- **OMS** : Organisation Mondiale de la santé.
- **ONAB** : Office National d'aliment de Bétail
- **PEP** : phosphoénolpyruvate.
- **PM** : Poids Moléculaire
- **V/V** : rapport volume/volume
- **WO₄²⁻** : Acide phospho-tungstique.

Liste des figures

Figure 01 : La plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	4
Figure 02 : Aspect morphologique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	5
Figure 03 : Schémas représentatif de la voie shikimate	8
Figure 04 : Schémas représentatif de la voie polyacétate	9
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes.....	10
Figure 06 : Structure général des anthocyanes.....	11
Figure 07 : Cheminement d'un toxique dans l'organisme	15
Figure 08 : Ultrastructure hépatique	16
Figure 09 : Schéma représentatif d'un néphron	20
Figure 10 : Structure chimique de la streptozotocine.....	24
Figure 11 : Elevage des souris <i>Swiss albinos</i>	26
Figure 12 : Administration de l'échantillon par voie orale	29
Figure 13 : Préparation et fixation de l'animal	31
Figure 14 : Prélèvement de différents organes	32
Figure 15 : Les étapes d'inclusion par l'automate	33
Figure 16 : Appareil d'enrobage et confection des blocs	33
Figure 17 : Les étapes de coloration.....	34
Figure 20 : La teneur de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> en poly-phénols et flavonoïdes	37
Figure 21 : Variation du poids corporel des souris durant le test de la toxicité aigüe	41
Figure 22 : Evaluation de la quantité de la nourriture consommé durant le test de la toxicité aigüe	42
Figure 23 : Evaluation de volume d'eau consommé durant le test de toxicité aigüe	43
Figure 24 : Variation du poids corporel des différentes doses durant le test de la toxicité sub-chronique.....	45

Figure 25 : Evaluation de la quantité de la nourriture consommée durant le test de toxicité sub-chronique	46
Figure 26 : Evaluation du volume d'eau consommé durant la toxicité sub-chronique	47
Figure 27 : Parenchyme rénal d'une souris témoin (G×10	49
Figure 28 : Parenchyme rénal d'une souris de lot (200mg/kg) (G×10.....	49
Figure 29 : Parenchyme rénal d'une souris de lot (400mg/kg) (G×10.....	50
Figure 30 : Parenchyme rénal d'une souris de lot (800mg/kg) (G×10.....	51
Figure 31 : Parenchyme hépatique d'une souris témoin (G×10.....	51
Figure 32 : Parenchyme hépatique d'une souris du lot (200mg/kg) (G×10)	51
Figure 33 : Parenchyme hépatique d'une souris du lot (400mg/kg) (G×10.....	52
Figure 34 : Parenchyme hépatique d'une souris du lot (800mg/kg) (G×10.....	52
Figure 35 : Evaluation de la glycémie des souris.....	52

Figures en Annexe

Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de polyphénols

Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoides

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Échelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs.....	14
Tableau II : Principales fonction de foie	17
Tableau III : Mortalité après administration d'une dose unique de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	38
Tableau IV : Evaluation des comportements et symptômes des souris lors de l'étude de la toxicité aigüe.....	39
Tableau V : : Présentation de la diarrhée chez les souris au cours de test de la toxicité aigüe	40
Tableau VI : Evaluation du poids absolu des organes et le rapport poids d'organe/100 g de poids corporel de toxicité aigüe	41
Tableau VII : Evaluation de poids des organes de toxicité sub-chronique.....	48

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire **(Zeghab, 2009)**.

On pourrait penser que la longue tradition d'usage empirique du règne végétal ait permis de déterminer précisément les propriétés de toutes les plantes connues. Cependant, les études scientifiques récentes ne les ont pas toutes validées. À l'inverse, le nombre de plantes d'usage traditionnel n'ont pas encore fait l'objet de recherches approfondies. Notre connaissance des véritables vertus des plantes reste donc très fragmentaire **(Viala et Botta, 2005)**.

Mais malheureusement, les plantes parce qu'elles sont naturelles, sont considérées à tort comme non dangereuses, et les gens les utilisent dans des contextes très variés et nombreux. **(Rhalem et al., 2010)**.

Il est donc indispensable d'identifier les composés chimiques présents dans ces plantes, d'évaluer sa toxicité et de déterminer la dose à respecter lors de l'utilisation afin d'éviter toute altération ou atteinte fonctionnelle humaine ou animale, car mal dosées, les plantes qui ont le pouvoir de vie, peuvent aussi avoir un pouvoir de mort **(Viala et Botta, 2005)**.

À l'origine, il n'existe pas de définition acceptée de manière générale pour la notion de toxique, un composé qui peut occasionner des lésions, internes ou externes, à l'organisme humain ou animal comme la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité, en cas de contact ou d'ingestion d'une quantité relativement faible de graines, de racines, de feuilles, de fruits ou de sève. Le degré de toxicité d'une plante dépend de la dose « Tout est poison, rien n'est poison seule la dose fait le poison (paracelse 1493 1551) » **(Richel, 2004)**

Parmi l'inventaire des plantes médicinales, nous avons choisi d'étudier *Rosmarinus officinalis*. pour l'originalité de sa prescription actuelle, et elle fait partie des plantes médicinales qu'ils sont en usage depuis l'Antiquité et qui, au travers des siècles, a pu garder une place dans l'inventaire des remèdes des Tradipraticiens de tout le bassin méditerranéen **(Hoefler, 1994)**.

Le présent travail consiste à étudier la toxicité de *Rosmarinus officinalis* sur des souris *swiss albinos*. Dans ce sens, une multitude de tests et d'expériences ont été entrepris, des tests *in vivo* sur la toxicité aigüe, toxicité subchronique, et l'effet préventif des polyphénols totaux de *Rosmarinus officinalis* contre le diabète induit par la streptozotocine.

Chapitre I
Généralité sur la plante

I.1.Généralité sur les plantes médicinales

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curative (**Newmann et al., 2007**).

À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Boussahel, 2011**).

Selon les estimations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé (**Lhuilier, 2007**). Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel (**Athamena, 2009**).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques (**Zeghab, 2009**). Parmi ces plantes, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) qui a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire (**Atik-Bekkara et al., 2007**).

I.2.Généralités sur la plante *Rosmarinus officinalis*

I.2.1.Historique

Le romarin a été utilisé depuis l'époque des premiers grecs et les romains, les savants grecs portaient souvent une guirlande de l'herbe sur la tête pour aider leur mémoire lors des examens. Au IX^{ème} siècle, Charlemagne a insisté pour que la plante se cultive dans son royal jardin (**Newmann et al., 2007**).

Le romarin est cité en médecine islamique comme étant une plante médicinale bénéfique, et au XIII^{ème} siècle le botaniste Ibn Albayter a décrit 1400 drogues utilisées en Afrique du nord dans un «traités des simples » y compris le romarin (**Hoefler,1994**).

Au XVI^{ème} siècle Prosper Alpain a découvert les rameaux de romarin dans un tombeau de l'Égypte ancienne (2000 avant J.C.). Le romarin apparait parmi d'autres plantes alimentaires sur des papyrus et des peintures murales à Louxor (vers 1400 avant J.C.) (**Hoefler, 1994**).

L'herbe a également été l'objet de nombreux poèmes, et au XVI^{ème} siècle que le romarin a été mentionné dans cinq des pièces de William Shakespeare (**Hostettman, 2013**). Il est devenu célèbre dans ce siècle avec la légende selon laquelle la reine Elisabeth d'Hongrie, malade et à un âge avancé, aurait retrouvé la santé et la jeunesse grâce aux vertus de l'eau de jouvence créée par un mélange alcoolique qui contenait du romarin (**Silberfeld, 2012**).

I.2.2. Etymologie

Le nom latin *rosmarinus* est habituellement interprété, comme dérivé « *ros* » de la rosée et « *marinus* », marins (embruns), indiquant que le romarin ne s'éloignait pas trop de la côte. On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle (**Makhloufi, 2009**).

Une autre interprétation de son nom scientifique dit que “*ros*” provient du grec *rhops* qui signifie « arbuste » et *marinus* dérive de *myrino* qui signifie « aromatique », alors sa signification serait “arbuste aromatique”. (**Athamena, 2009**).

D'autres noms sont connus comme : herbe-aux-couronnes, romarin des troubadours, bouquet-de-la-vierge et rosé de mer (**Grassart et al, 2008**).

I.2.3. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des lamiacée très répandu sur les terrains calcaires. Il présente un système racinaire assez superficiel et parfois dominant. Peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai (**Teucher et al., 2005**).

Certaines variétés peuvent fleurir une deuxième fois en début d'automne Elle porte des fleurs bleues ou blanche ponctuées de taches violettes (**Djeddi et al ., 2007**).



Figure01 : la plante *Rosmarinus officinalis*

I.2.4.Répartition géographique

L'Algérie fait partie des pays méditerranéens, par sa diversité climatique et sa richesse en couvert végétale, le romarin fait partie des espèces végétales qui se présentent à l'état sauvage dans les zones littorales pas trop loin de la mer, les lieux secs et arides, même au Sahara (Miguel *et al.*, 2007). Donc l'aire géographique du romarin est spécifiquement méditerranéenne, il est répandu dans les pays européens, en France, en Espagne, au Portugal, on le retrouve au Maroc, en Algérie, en Tunisie et en Libye. Il devient rare et ne se manifeste que dans quelques stations isolées en Egypte, en Israël, Liban, à Chypre, il réapparaît en Turquie, Grèce et Italie (Verma *et al.*, 2011).

I.2.5.La systématique botanique

Selon Quezel et Santa(1963), la classification de la plante est décrite comme suite :

Règne: Végétal

Embranchement: Angiospermes

Sous embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Astérides

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées, labiées

Genre : Rosmarinus

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L



Figure02 : Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch *et al.*, 2000).

I.2.6.Utilisation

Le romarin a pu être utilisé dans différents domaines et différentes manières, et parmi ses utilisations, on cite l'exemple de la cosmétique, l'alimentation et parfumerie (Edoardo *et al.*, 2010).

I.2.6.1. En gastronomie

Le romarin est un condiment très apprécié et facile à trouver, il est très utilisé dans le bassin méditerranéen et en Angleterre pour aromatiser les viandes et on peut l'ajouter à de nombreux plats mais aussi dans les eaux de cuisson des pâtes, du riz ou des légumes, à forte dose il peut être un peu amer (**Jiang et al., 2011**).

I.2.6.2. En cosmétique

Le romarin était l'un des principaux composants du premier parfum alcoolique connu, et le premier parfum alcoolique dont on connait l'existence est l'eau de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au XVII^{ème} siècle et qui pourrait dater du XIV^{ème} siècle, dont le romarin était l'un des principaux composants et l'eau de Cologne que Napoléon Bonaparte utilisait a été faite avec le romarin aussi (**Leund & Foster, 1996**).

L'huile essentielle de romarin rentre dans la composition de certains savons, déodorants, dentifrices et crèmes (**Leund & Foster, 1996**).

I.2.7. Propriétés thérapeutiques du romarin

Le romarin est une herbe médicinale bien connue et considérablement évaluée, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine traditionnelle. Elle est très appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes et anti-tumorales (**Athamena, 2009**).

I.2.7.1. Activité hypoglycémisante

Les observations après l'administration orale de l'extrait aqueux du romarin à des rats (rats ayant un diabète provoqué par la streptozotocine) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémisante et un meilleur profil lipidique (**Aljamal & Alqadi, 2011**).

I.2.7.2. Activité anti-inflammatoire

Les polyphénols sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires par la protection de l'oxydation des LDL cholestérol et des acides gras polyinsaturés, antiagrégants plaquettaires par la diminution du taux des plaquettes activées ce qui limiterait le risque de maladies cardiovasculaires (**Vergé et al., 1999; Martin & Andriantsitohaina, 2002; Edeas, 2004; Stoclet, 2004**).

I.2.7.3. Activité antivirale

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin, a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) aux concentrations très basses, qui ont été également cytotoxiques (**Aruoma *et al.*, 1996**).

I.2.7.4. Activité anti oxydante

L'activité anti-oxydante du romarin est connue depuis environ 30 années (**Nassu *et al.*, 2003**). En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité anti-oxydante la plus élevée (**Wang *et al.*, 2010**).

La propriété anti-oxydante de romarin est vue à travers son Capacité à chélater le fer, piéger les radicaux libres et inhiber la peroxydation des lipides (**Petiwala *et al.*, 2013**).

I.2.7.5. Activité anti cancéreuse

Grâce à certains composants (carnosol, rosmaridiphénol, rosmanol et l'acide rosmarinique), le romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer (**Bekkara *et al.*, 2007**). Polyphénols de romarin pour le cancer de la prostate et encore en cours d'analyse, y compris le traitement des différents cancers. Cancer de la prostate est un exemple d'une utilisation potentielle de romarin pour la chimio-prévention et la réduction de la tumeur (**Petiwala *et al.*, 2013**).

I.2.8. La composition chimique

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux (**Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007**).

La première application du système d'électrophorèse capillaire à détection électrochimique a permis la détection de : l'hespérétine, l'acacétine, la diosmétine, l'apigénine, la lutéoline, l'acide férulique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique dans les extraits éthanoliques du romarin (**Peng *et al.*, 2005**).

En 2006 **Almela et ses collaborateurs** ont identifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans les extraits méthanoliques du romarin issus de différentes matières, des composés classés en trois groupes : les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques.

En plus de ces composés, on trouve dans le romarin des huiles essentielles (Makhloufi, 2009), et 18 éléments minéraux qui ont été identifié par Arselan *et al* (2007).

I.3.Généralités sur les composés phénoliques des plantes

Les composés phénoliques ou les polyphénols regroupent un vaste ensemble, plus de 8000 molécules, divisés en une dizaine de classe chimique, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbone, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles(OH) (Hennebelle, 2004).

I.3.1.La biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique
- Celle issue de l'acétate

I.3.1.1. La voie de shikimate

La première réaction de cette voie est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) (produit de la glycolyse) avec l'érythrose-4-phosphate (produit par la voie des pentoses phosphates) pour former au bout de plusieurs réactions enzymatiques l'acide chorismique, ce dernier se transforme en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) qui, par désamination, mènent aux acides cinnamiques, précurseurs de la majorité des acides phénols(acides benzoïques, acétophénone, lignanes et lignines, coumarines, etc.) (Bruneton, 2009).

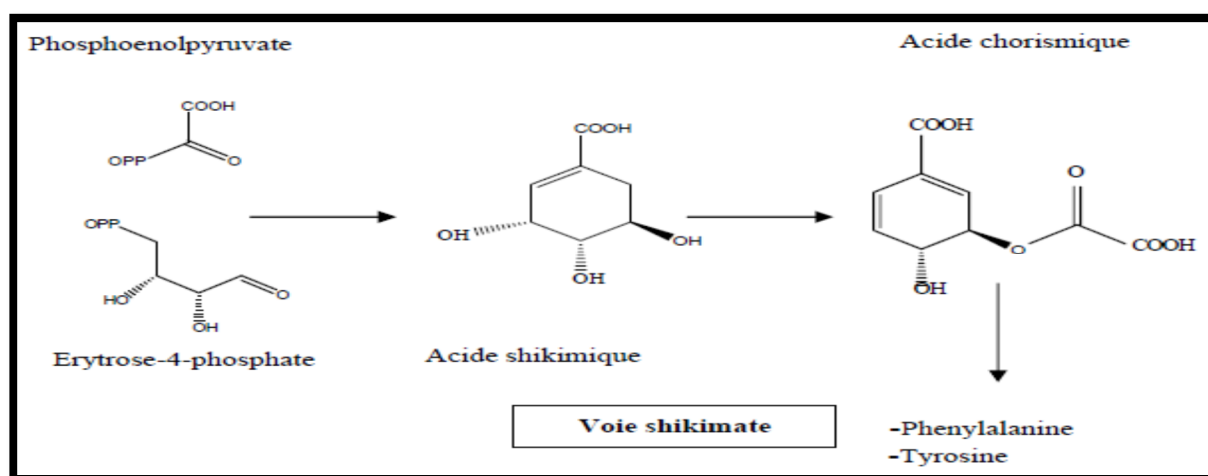


Figure03 : Schémas représentatif de la voie shikimate (Bruneton, 2009).

I.3.1.2. La voie des polyacétates

Une seconde voie de biosynthèse, la voie des polyacétates est à l'origine des poly β -cétoesters (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation, des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, déosides, xanthones, quinones, etc (Bruneton, 2009).

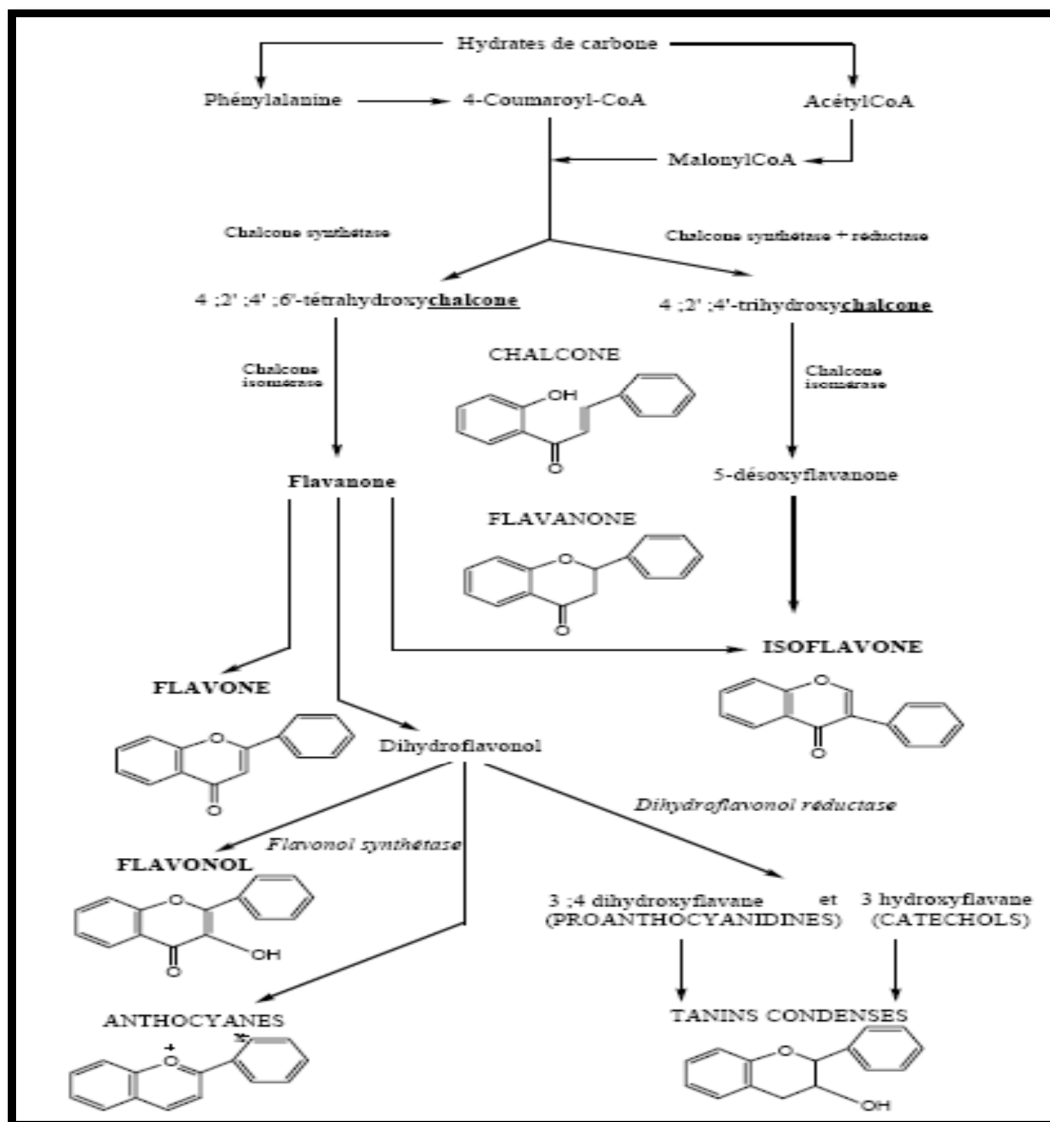


Figure04 : Schémas représentatif de la voie polyacétate (Milane, 2004).

I.3.2. Classification des polyphénols

Plusieurs classifications ont été adoptées. En se basant sur la structure moléculaire et le nombre d'atome de carbone, Delaveau (1988) a regroupé les polyphénols en quatre catégories : acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes et tannins.

De même **O'connell et fox(2001)**, ont établi une classification basées sur le nombre d'atome de carbone et le degré de polymérisation.

I.3.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rare dans la nature. Ils se divisent en deux catégories :

- **Acides hydroxy-benzoïques** : dérivés de l'acide benzoïque, caractérisés par leur structure squelettique C1-C6 (**Tsao, 2010**). Ils existent souvent sous forme d'esters ou glycosides (**Zeghab, 2009**).
- **Acides hydroxy-cinnamique** : dérivés de l'acide cinnamique, caractérisés par leur structure squelettique C3-C6 (**Tsao, 2010**). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organique (**Zeghab, 2009**).
- **Les coumarines** : dérivent des acides hydroxy-cinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (**Zeghab, 2009**).

I.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de trois carbones formant un cycle pyranne (**Erland, 2002**).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (**Bruneton, 1999**).

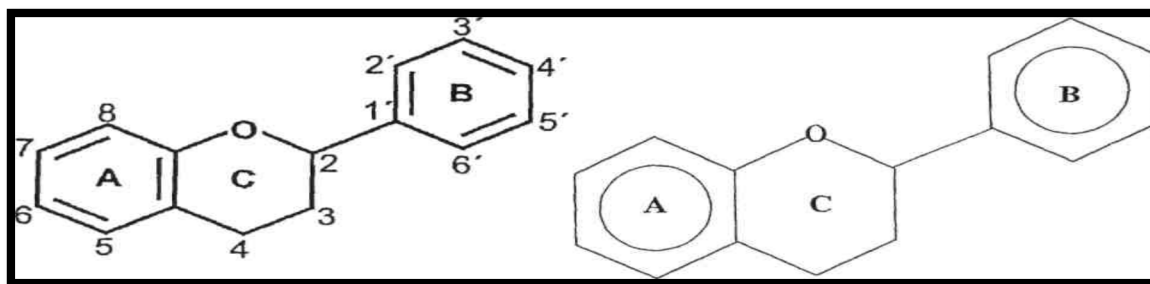


Figure05 : Structure de base des flavonoïdes (**Athamena, 2009**).

I.3.2.3. Les anthocyanes

Les **anthocyanes** ou **anthocyanines** (du grec anthos = fleur, kyáneos = pourpre) sont des pigments naturels solubles dans l'eau, de teinte allant du rouge au bleu. Les anthocyanes apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et les racines. La biosynthèse des anthocyanes nécessite des éléments chimiques de base dérivés de la photosynthèse. Leur structure de base est caractérisée par un noyau flavone généralement glucosylé en position C3 (*sava et al, 2006*).

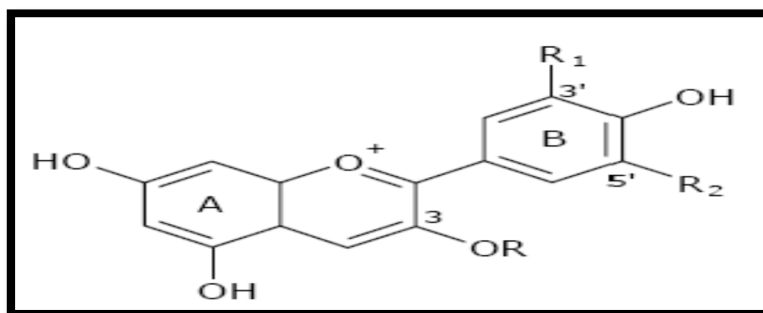


Figure06 : Structure général des anthocyanes (*Mazza et Miniati, 1993*).

I.3.2.4. Les Tannins

Les tannins sont des composés naturels des végétaux, ayant des poids moléculaires élevés 500 à 20 000 Dalton, et une capacité de se complexer fortement avec les hydrocarbures et les protéines (*Elloutassi, 2004*).

Chez les végétaux supérieurs on distingue deux groupes de tanins de structure différentes: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés (*Frutos et al., 2004*).

I.3.3. La pharmacocinétique des polyphénols

Les polyphénols sont présents dans la plupart des végétaux. Leur nature chimique et leurs teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre et donc d'un aliment à l'autre (*Akroum, 2006*).

Afin de comprendre les effets de la consommation des polyphénols sur la santé, il est essentiel de connaître leur devenir dans l'organisme une fois ingérés afin de déterminer s'ils atteignent ou non les tissus cibles présumés (*Akroum, 2006*).

I.3.3.1.La biodisponibilité

Les effets santé des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité ; cette dernière qui signifie la part d'un nutriment présent dans un aliment qui est effectivement assimilée par l'organisme (**Zegab, 2009**).

Selon **Wiseman (1999)**, la biodisponibilité des polyphénols varie très largement d'une molécule à l'autre. Certains polyphénols sont bien absorbés à travers la barrière intestinale et se retrouvent dans le sang. Leur concentration plasmatique est maximale environ 2 heures après leur consommation. Cette concentration diminue ensuite pour atteindre une valeur nulle 6 à 9 heures plus tard. Elle ne peut être maintenue élevée que par une consommation renouvelée au cours de la journée.

I.3.3.2.L'absorption et métabolisme

L'absorption intestinale des polyphénols est d'autant plus limitée que leur masse moléculaire est élevée (**SCALBERT *et al.*, 2002**).

La part des polyphénols qui n'est pas absorbée à travers l'intestin grêle, est cependant métabolisée en molécules aromatiques de faible masse moléculaire par la microflore du côlon. Ces métabolites sont eux-mêmes bien absorbés et apparaissent dans les urines (**SCALBERT *et al.*, 2002**). Les taux urinaires représentent 1 à 25 % des doses ingérées en fonction de la nature des polyphénols. Des études *in vitro* sur la microflore fécale humaine ont montré, que les polyphénols complexes étaient dégradés en divers acides aromatiques, phénoliques et non phénoliques (**Akroum, 2006**).

Chapitre II

Généralité sur la toxicité

II.1. Notions de toxicité

II.1.1. Historique

Théophraste Von Hohenems, surnommé Paracelsus (1493-1541), commença à remettre en question les enseignements transmis depuis l'antiquité. A partir de la connaissance des substances actives il créa un système de prescription, s'opposant ainsi aux absurdes mélanges de la médecine du Moyen âge. En raison du succès de ses ordonnances, il fut même accusé d'empoisonnement et se défendit par une phrase devenue un axiome en pharmacologie : «Si vous voulez expliquer de façon précise l'action de chaque poison, il faut alors se demander ce qui n'est pas un poison ? Toute substance est un poison et aucune n'est inoffensive. C'est simplement la dose qui fait qu'une substance n'est pas toxique» (**Lullmann et Mohr, 2006**).

II.1.2. Définition

Traditionnellement, on qualifie de toxique un composé qui peut être nuire à la santé des organismes vivant, en particulier à celle des hommes. L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose. Selon leur origine, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxines) provenant des microorganismes, des plantes ou des animaux (**Reichl, 2004**).

II.1.3. Classification

On distingue classiquement trois formes essentielles de toxicité : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë ou sub-chronique) et la toxicité à long terme (ou chronique). Si la toxicité est une propriété inhérente à la substance, d'autres facteurs peuvent intervenir pour en moduler la nature et l'étendue (**Viala et Botta, 2005**).

II.1.3.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë d'une substance correspond aux effets indésirables qui se manifestent après administration par voie orale ou cutanée d'une dose unique, ou de plusieurs doses réparties sur un intervalle de temps de 24 heures ou suite à une exposition par inhalation de 4 heures (**Claverie et Hedde., 2008**).

Cette étude décrit les symptômes de l'intoxication observés, compare les substances entre elles quant à leur potentiel toxique, et détermine la dose létale 50 (DL50) (**Boukeloua, 2009**).

➤ La dose létale 50 (DL₅₀)

Désigne la dose d'une substance qui peut causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. De ce fait, la mesure de la DL₅₀ peut établir un classement pour ces substances plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxiques, et l'inverse est juste (**Reichl, 2004**).

Tableau I : Echelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon (**Hodge et Sterner ,1949**).

DL ₅₀ Orale	Indice de toxicité
Jusqu'à 1mg/kg	extrêmement toxique
1 à 50mg/kg	hautement toxique
50 à 500mg/kg	modérément toxique
500 à 5000mg/kg	légèrement toxique
5000 à 15000mg/kg	presque pas toxique
Plus de 15000mg/kg	relativement inoffensif

Cependant, la DL₅₀ a une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement, etc. (**Lapointe, 2004**).

II.1.3.2. Toxicité sub-chronique

Lors de la toxicité sub-chronique, le xénobiotique est administré plusieurs fois pendant une période plus longue, de 28 aux 90 jours. On cherche à définir les organes et les fonctions touchées par ce toxique .Pour une dose déterminée l'effet attendu peut manifester immédiatement ou avec retard (**Claverie et Hedde., 2008**).

II.1.3.3. Toxicité chronique

La toxicité chronique est définie comme étant la mise en évidence d'effets toxiques après l'administration répétée d'une dose de la substance à tester, pendant une période de temps longue, supérieure à 90 jours (**Boukeloua, 2009**).

I.1.4. Devenir d'un toxique dans l'organisme

Une substance qui pénètre dans l'organisme peut avoir des effets bénéfiques (médicaments) ou néfastes (toxiques). Inversement, l'organisme peut agir sur cette substance : c'est le métabolisme, la réponse de l'organisme à un toxique dépend de la quantité de la substance présente dans un tissu ou un organe. Plusieurs facteurs interviennent dans les processus d'action toxique, notamment les phases toxicocinétiques et toxicodynamiques (Baynes et Hodgson, 2010).

La toxicocinétique s'intéresse à l'influence qu'exerce l'organisme sur un toxique, cette influence découle des processus conduisant à la formation des métabolites et qui gouvernent le cheminement du toxique dans l'organisme (l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'élimination) (Figure 07). Autrement, la toxicodynamie s'intéresse à l'influence qu'exerce un toxique sur l'organisme et aux facteurs qui interviennent dans la réponse toxique (Lapointe, 2004). Ce n'est qu'après cette phase que nous pourrions observer les effets toxiques d'une substance.

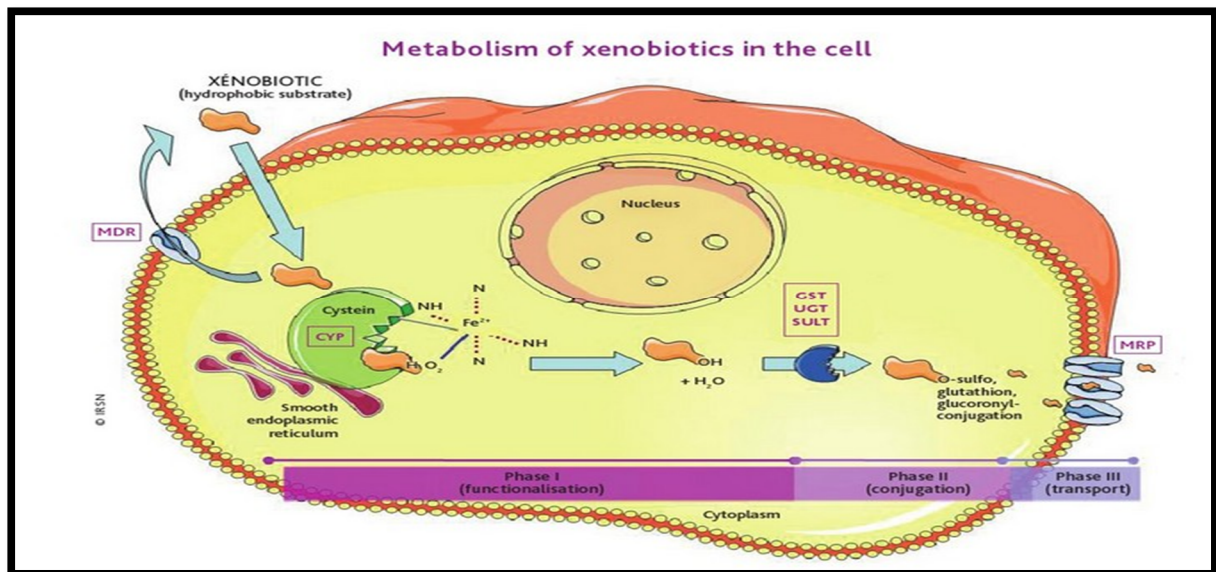


Figure07 : Cheminement d'un toxique dans la cellule (Lapointe, 2004).

II.1.5. Organes cibles des toxiques

Un toxique n'affecte pas tous les organes avec la même intensité. Ils agissent plus spécifiquement sur certains organes (organes cibles) du fait d'une très grande sensibilité de ces organes ou d'une concentration plus élevée de la molécule inchangée et/ou de ses métabolites à leur niveau (Viala et Botta, 2005).

Le foie et les reins, qui ont des fonctions métaboliques et excrétoires plus importante et bénéficient d'une très large irrigation sanguine, sont particulièrement exposée aux toxiques. Les substances capables de traverser la barrière hémato-encéphalique peuvent exercer leur toxicité au niveau de système nerveux. Ainsi, le système respiratoire constitue un organe cible pour les toxiques gazeux ou volatiles (Viala et Botta., 2005).

II.2. Hépatotoxicité

II.2.1. Physiologie du foie

Le foie est un organe de couleur rouge marron, il est constitué par des cellules spéciales, les hépatocytes (cellules du parenchyme hépatique) qui sécrètent une substance, la bile (Ramé et Théron., 2007).

Le foie est le plus volumineux, et du point de vue métabolique, l'organe le plus complexe du corps (Lu, 1992). L'activité métabolique du foie a lieu dans les cellules parenchymateuses, qui présentent 80% de la masse organique ; il contient également les cellules de Kupffer qui bordent les capillaires hépatiques constituent une part essentielle du système réticulo-endothélial de l'organisme. Les cellules parenchymateuses sont contiguës aux sinus veineux, qui véhiculent le sang en prévenance de la veine porte et de l'artère hépatique, et aux canalicules biliaires, qui sont les plus petites ramifications de système biliaire (Marchall et Bangert, 2005).

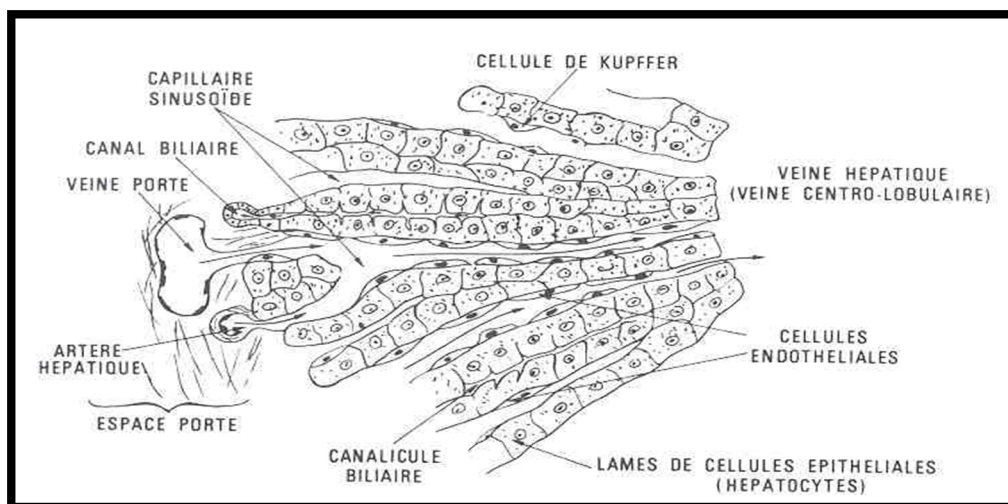


Figure 08 : Ultrastructure hépatique (Marchall et Bangert, 2005).

Le foie est un organe très richement vascularisé qui joue un rôle important dans les métabolismes glucidique, protidique et lipidique de l'organisme. Il assure également un rôle

majeur dans l'élimination des déchets endogènes (élimination de la bilirubine) et dans l'élimination des xénobiotiques, médicaments et toxiques (**Gérolomi, 2007**). Les principales fonctions de foie sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau II: Principales fonction de foie (**Marchall et Bangert, 2005**).

Métabolisme glucidique	Néoglucogenèse, Synthèse et catabolisme de glycogène.
Métabolisme lipidique	Synthèse des acides gras, Synthèse et excrétion du cholestérol, Synthèse des lipoprotéines, Cétogenèse, Synthèse des acides biliaires, Hydroxylation de la vitamine D.
Métabolisme protéique	Synthèse des protéines plasmatiques (Quelques facteurs de coagulation) , Synthèse de l'urée et de la glutamine.
Métabolisme hormonal	Métabolisme et excrétion des hormones stéroïdiennes, Métabolisme des hormones polypeptidiques.
Métabolisme des substances étrangères	Métabolisme et excrétion
stockage	Glycogène, Vitamine A, Vitamine B ₁₂ , Fer.
Métabolisme et excrétion de la bilirubine	

II.2.2. Biotransformation des xénobiotiques

Le foie est placé entre le tube digestif et le reste de l'organisme ; il joue le rôle de douane pour contrôler toutes les molécules absorbées. Les molécules faisant l'objet d'un premier passage sont généralement des xénobiotiques (molécules étrangères à l'organisme) (**Viala et Botta, 2005**). La plupart des xénobiotiques sont lipophiles et ne peuvent être éliminés sans être métabolisés au préalable en molécules plus hydrosolubles. De nombreux

composés sont captés par les hépatocytes et transformés en métabolites pharmacologiquement actifs ou inactifs, ou en métabolites toxiques (**Viala et Botta, 2005**).

On distingue dans les réactions du métabolisme hépatique deux phases ; la phase I permettent la formation d'un métabolite plus polaire (hydrophile) par oxydations avec les monooxygénases dépendantes des cytochromes P-450, localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique. La phase II correspond à la formation d'une molécule conjuguée éliminée dans l'urine ou la bile avec plusieurs enzymes comme les UDP-glucuronyltransferase (**Berthoin, 2000**).

II.2.3. Les lésions hépatiques

La toxicité peut s'exercer sur différents organites des cellules hépatiques, conduisant aux divers effets toxiques comme :

- Stéatose ; le foie contient plus de 5% de lipide en poids qui peut être la conséquence de plusieurs mécanisme comme inhibition de la synthèse de la moitié protéique des lipoprotéines (**Marchall et Bangert ,2005**) ;
- Nécrose hépatique ; elle implique la mort des hépatocytes qui se produit avec la rupture de la membrane plasmique (**Marchall et Bangert ,2005**) ;
- Cholestase ; modifications de la perméabilité des vois biliaires, elle est caractérisé par la présence d'infiltration de collagène dans la masse hépatique, dans laquelle une fibrose conduit à un rétrécissement du tissu hépatique métaboliquement actif, à une diminution hépatocellulaires et à l'obstruction du flux biliaire ;
- Les tumeurs ; la plus part du temps, secondaire ; par exemple, des métastase des cancers du gros intestin, de l'estomac et des poumons (**Lu ,1994**).

II.2.4. Testes hépatiques

Le bilan hépatique consiste à doser la bilirubine, les transaminases et les phosphatases alcalines dans un échantillon de sérum. Le dosage de la concentration sérique d'albumine peut également avoir un certain intérêt pour l'exploration d'une maladie hépatique (**Gaw et al., 2004**).

II.2.4.1. La bilirubine

Le principal pigment biliaire est la bilirubine (PM=584). Elle provient de la dégradation de l'hémoglobine par les macrophages du système réticuloendothélial (cellules de Kupffer) avec une production de l'ordre de 300 mg par jour chez l'homme (**Viala et Botta, 2005**).

La fraction circulante est improprement appelée libre car non encore glucurono conjuguée (**Berthoin, 2000**). Elle est captée par les cellules hépatiques et conjuguée pour former des mono- et -di-glucuronides, qui sont beaucoup plus solubles dans l'eau que la bilirubine libre (non conjuguée). La bilirubine étant présente dans la bile et en faible quantité dans le sérum, lorsque la bile s'accumule (problème d'élimination), cela provoque un ictère. La bilirubine non conjuguée ou directe, augmente les cholestases. L'ensemble bilirubine libre + bilirubine conjuguée constitue la bilirubine totale, le taux de la bilirubine peut augmenter (hyperbilirubinémie), par une hémolyse des globules rouges, ou une hépatite (**Gaw et al., 2004**).

II.2.4.2. Les transaminases

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules hépatiques. Leur rôle est de transférer un groupe amine lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique, le groupement amine d'un α -acide aminé sera transféré sur un acide α -cétonique sans la libération d'ammoniac, il existe 2 aminotransférases ou transaminases qui sont dosées dans le sérum, ALAT (Alanine aminotransférase) ou TGO et ASAT (Aspartate aminotransférase) ou TGP, sont largement utilisées dans la pratique clinique comme indices sensibles, quoique non spécifiques, de lésions hépatocytaires aiguës, indépendantes de toute considération étiologique (**Gaw et al., 2004**).

L'activité ALT est plus spécifique du foie que AST, leur augmentation reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire, les causes des lésions hépatiques ; l'hépatite et les lésions toxiques qui peuvent accompagner un grand nombre d'agressions pour le foie, dont un surdosage de médicament (**Marchall et Bangert, 2005**).

II.3.Néphrotoxicité

L'urine est la voie principale d'excrétion de la plupart des toxiques : le rein a un débit sanguin élevé, les toxiques sont concentrés dans le filtrat, transportés à travers les cellules tubulaires et quelques-uns sont bioactifs, il s'agit d'une cible majeure d'effets toxiques (**Lu, 1992**).

II.3.1.Physiologie des reins

Les reins sont des organes doubles qui sécrètent l'urine, ils se trouvent de part et d'autre de la colonne vertébrale à peu près à la hauteur des fausses côtes. Ils mesurent de 9 à 12 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur (**Delmas *et al.*, 2009**).

Chaque rein est constitué d'environ 1.3×10^6 de minuscules néphrons ; les unités structurales et fonctionnelles des reins qui assurent la formation de l'urine. Chaque néphron comprend deux structures principales : un glomérule du rein, qui est un bouquet de capillaires, et un tubule rénal dont l'extrémité fermée est évasée et en forme de coupe ; elle enveloppe complètement le glomérule (**Marieb, 2008**).

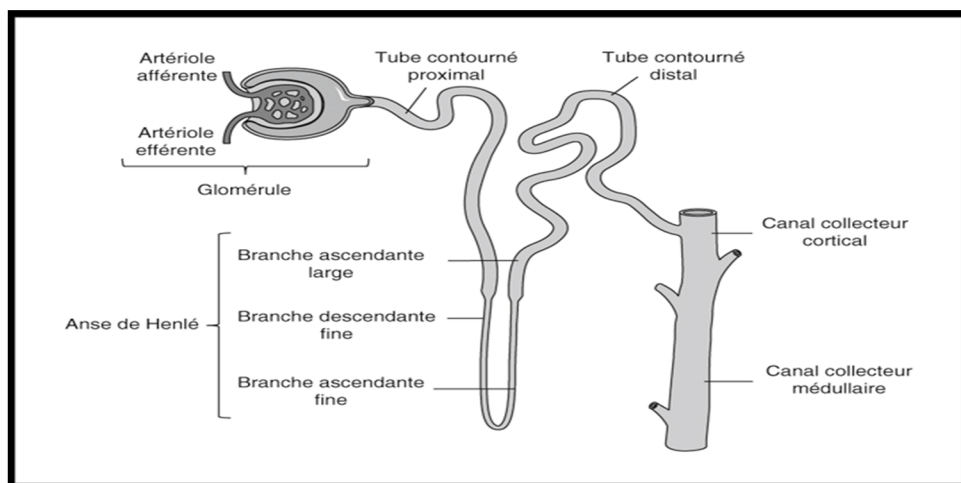


Figure 09 : Schéma représentatif d'un néphron (**Marieb, 2008**).

Une des fonctions essentielles du rein est de contrôler l'élimination du sel et de l'eau et donc d'éliminer les variations du volume et de l'osmolarité du milieu extracellulaire (**Sharp et Rigina, 1998**). Le rein aussi :

- Maintien la concentration du K^+ extracellulaire et le pH sanguin constant ;

- Permet l'excrétion des produits terminaux du métabolisme (urée, acide urique) ;
- Conserve des composants essentiels (glucose, acides aminés) ;
- Joue un rôle dans le métabolisme (dégradation des protéines et des peptides, néoglucogenèse) et dans la synthèse de certaines hormones (rénine, érythropoïétine, vitamine Prostaglandine) (**Silberng et Despopoulos, 2008**).

II.3.2.Élimination rénale

La fonction principale des reins est l'élimination de l'eau et des substances hydrosoluble, le rein prend également part au métabolisme en particulier à la dégradation des acides aminés et à la néoglucogenèse, ils éliminent les déchets et le liquide en excès recueillis par le sang et transporté par celui-ci dans l'organisme (**Viala et Botta, 2005**).

Environ 190 litres de sang entrent chaque jour dans les reins par les artères rénales, les filtres minuscules appelés glomérule sépare les déchets de plasma sanguin, ils éliminent automatiquement la bonne quantité de sel et d'autres éléments minéraux pour ne laisser que de petites quantités dont l'organisme a besoin, les déchets et le liquide en excès quittent les reins sous forme d'urine (**Marieb,2008**).

II.3.3.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 (**Gueguen et al.,2012**).

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.

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 (**Gueguen et al.,2012**)

II.3.4. Tests rénales

Pour savoir si le rein fait bien son travail d'épuration, on dose différentes substances dans le sang afin de vérifier que leur concentration n'est ni trop haute ni trop basse. Ces substances sont des éléments minéraux comme le sodium (Na^+) et le potassium (K^+), on dose aussi les protides, les bicarbonates ainsi que l'urée et la créatinine, composés synthétisés par l'organisme, et éliminés par le rein dans les urines (**Viala et Botta, 2005**).

II.3.4.1. L'urée et la créatinine

- **L'urée** ($2\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}$) est le diamide de l'acide carbonique, c'est un déchet formée dans le foie à partir de la transformation des protéines alimentaire (1g de protéine donne 5.5 mmol d'urée), bien qu'elle est un produit de déchet elle n'est pas toxique par elle-même, son taux de le plasma augmente, en cas d'insuffisance rénale (**Friedman et Young., 2011**).
- **la créatinine** est l'acide méthyle-guanidine acétique, elle est fabriquée dans le foie à partir de l'acide amine glycofolle, de l'arginine et une méthionine. Dans le sang (créatininémie) permet une évaluation du fonctionnement du rein plus précise que l'urémie car la créatinine est fabriquée dans le muscle et son taux sanguin dépend du fonctionnement rénal et de la masse musculaire globale. Une augmentation de la créatininémie témoigne ainsi plus sûrement de la présence d'un dysfonctionnement rénal qu'une élévation de l'urémie, sujette à de nombreuses interférences (**Koolman et Roehm, 2005**).

II.4. Méthode d'étude de la toxicité

II.4.1. Méthodes *in vivo*

Les méthodes *in vivo* nécessitent l'utilisation d'organismes vivants. Le législateur ordonne des investigations toxicologiques sur les animaux de laboratoire, avant l'autorisation de mise sur le marché de nouveaux médicaments. Les choix se portent de préférence sur les souris, les rats, les cobayes et les lapins issus de reproduction consanguine, et des quelques cas aussi sur d'autre mammifères. Depuis la mise en place d'une législation (1972), l'utilisation d'animaux de laboratoire est en nette régression (**Reichl, 2004**).

II.4.1.1. Le test DL50 (dose létal)

Le test DL50 a été développé en 1927. Dans sa définition actuelle, la DL50 est la dose unique d'une substance pour laquelle on attend une mortalité de 50% des animaux de laboratoire. Mise à part le fait que pour être sûr d'un constat statistique on ait besoin de beaucoup d'animaux (**Paramveer et al., 2010**).

II.4.1.2. Le test «Acute Toxic Class»

L'examen de la «toxicité aiguë» se fait de manière séquentielle : on administre d'abord une dose d'orientation, à chaque fois sur trois animaux par substance, dont l'effet détermine le choix de la dose associée à la posologie ultérieure. Si la mortalité est inférieure à deux animaux, la dose est multipliée par dix lors de l'étape suivante ; dans le cas inverse, la dose est réduite. Déjà dans cette deuxième étape, on parvient souvent à établir une classification, de telle sorte qu'en moyenne sept à huit animaux suffisent (**Erkekoglu et al., 2011**).

II.4.1.3. Le test de Draize

Le test de Draize, datant de 1944, sert à identifier les produits irritants (test d'irritation) qui, après application sur la peau d'un lapin ou après introduction dans le sac conjonctival de son œil, engendrent des réactions caractéristiques (rougeur, nécrose, production de larme...) (**Kirk et al., 2001**).

II.4.2. Méthodes *in vitro*

On distingue les tests sur la cytotoxicité, la mutagénicité, la tératogénicité, etc.

II.4.2.1. Tests utilisant une matière colorante

Les tests utilisant les colorants servent à recenser la cytotoxicité. Les colorants comme le rouge neutre n'est admis que par les cellules vivantes. On mesure l'évolution du colorant incorporé. D'autre colorant n'apparaissent, sous l'influence d'une enzyme cellulaire, qu'après introduction de précurseurs dans la cellule (**Reichl, 2004**).

II.4.2.2. Test de Ames

Le test de Ames est un test de mutagénicité réalisé avec des bactéries ; des salmonelles ou des bactéries coliformes convenablement modifiées contiennent un germe hors normes et

ne peuvent se développer que dans les milieux de cultures spéciaux, alors que l'espèce non modifiée croît aussi sur un agar normal (Mortelmants et Zeiger.,2000).

II.5.Pancréa-toxicité de la streptozotocine

II.5.1.Définition de la streptozotocine

Streptozotocine ou streptozocine ou Izostazin ou Zanosar (STZ) est un dérivé synthétique de nitrosoureido glucopyranose isolé à partir de fermentations de *Streptomyces achromogenes* qui est classiquement un antibiotique et anti-tumoral et chimiquement lié aux autres nitrosurées utilisés dans la chimiothérapie du cancer (Etuk., 2010).

La streptozotocine, une poudre blanche avec un poids moléculaire de 265,221 g / mol. Elle est similaire au glucose dans la mesure où il est transporté dans les cellules β par transporteur du glucose GLUT2, mais n'est pas reconnu par d'autres transporteurs de glucose. Ainsi, les cellules β ont des niveaux relativement élevés de GLUT2. C'est ce qui explique la toxicité spécifique de STZ pour des cellules β (Naoaki *et al.*, 2012).

II.5.2.Structure chimique de la streptozotocine

La streptozotocine (STZ) [2-deoxy-2(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose ($C_8H_{15}N_3O_7$), elle est composée de nitrosamide méthylnitrosourea (MNU) lié au carbone C 2 d'un D-glucose (Palsamy et Subramanian, 2008).

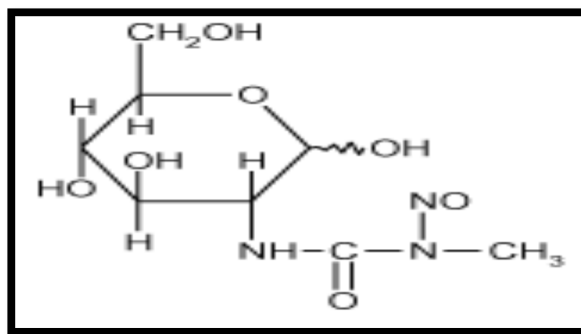


Figure 10: Structure chimique de la streptozotocine (Konrad *et al.*, 2001).

II.5.3. Mode d'action de la streptozotocine

Streptozotocine pénètre dans la cellule pancréatique par l'intermédiaire d'un transporteur de glucose appelé GLUT2 et provoque l'alkylation de l'acide désoxyribonucléotide (ADN). Par ailleurs, induit l'activation de la ribosilation de polyadénosine diphosphate et la libération d'oxyde nitrique. L'action de STZ provoque une destruction des cellules β par la nécrose (**Courteix *et al.*, 2012**).

II.5.4. Rôle de la streptozotocine

La STZ exerce sa toxicité grâce à une activité d'alkylation de l'ADN, elle est captée par la cellule β pancréatique via le transporteur de glucose GLUT2, Cette alkylation est déterminée par la méthylation de la guanine en position O⁶, par conséquent la guanine sera transformée en O⁶ méthylguanine qui s'apparie par erreur avec la thymine (**Etuk, 2010**).

La glycosylation des protéines est un facteur délétère supplémentaire. L'ADP ribosylation est alors sur stimulée, ce qui entraîne une baisse de NAD⁺ cellulaire, du stock d'ATP et conduit à la mort des cellules β et de toutes les cellules porteuses du transporteur GLUT2 (cellules du rein et du foie), elle induit également la formation des radicaux libres qui synergise avec elle pour générer un dommage au niveau de l'ADN (**Courteix *et al.*, 2012**).

Chapitre III

Matériel et méthodes

Conseils et précautions d'emploi

- Caressez la souris avant chaque manipulation pour éviter le stress.
- Le volume idéal à administrer par voie orale est entre 0.3 et 0.5 ml (souris de 20 à 30g).
- Il faut suivre l'évolution pondérale des souris en pesant ces dernières après une nuit de jeun (avec accès libre à l'eau).
- Pour l'injection intrapéritonéale : insérer au complet l'aiguille avec un angle de 45° dans les cadrans inférieurs droits et gauches de l'abdomen, éviter les cadrans supérieurs et la ligne médiane au bas de l'abdomen où se situe la vessie, le volume idéal à injecter est entre 0.1 et 0.3 ml pour les souris de 20 à 30g.
- Pour bien mesurer la quantité de la nourriture consommée par les souris, il faut prendre en considération les débris de la nourriture éparpillés dans la cage, ou bien choisir les grands morceaux.
- La sciure des cages doit être changée à chaque fois qu'on laisse les souris à jeun.
- Les extraits doivent être préparés chaque jour juste avant leur administration.
- La température de l'endroit de l'élevage des souris doit être mesurée quotidiennement, dans la même heure en utilisant un thermomètre.
- Vaut mieux, s'il serait possible, respecter un cycle circadien de 12h, par ce que la lumière joue un rôle clé dans le control hormonale des fonctions vitales des animaux (chronopharmacologie).
- Il faut toujours s'assurer de la propreté de l'eau consommée par les souris, vaut mieux utiliser l'eau minérale pour éviter l'hépatotoxicité causée par le chlore.
- Le sang doit être récupéré dans des tubes à EDTA (mieux que l'héparine), pour éviter toute sorte de coagulation.
- Si l'étude est réalisée sur des souris, il est préférable de doser soit, les paramètres biochimiques (en priorité), ou les paramètres hématologique en deuxième lieu (le volume du sérum récupéré ne servira jamais à doser les deux paramètres à la fois)

III. Matériel et méthode

III.1. Matériel

III.1.1. Produits chimiques

Les solvants utilisés dans cette étude sont tous de la marque Biochemie Chemopharma. Les autres produits chimiques spécifiques tels que l'acide gallique, la quercétine et la streptozotocine proviennent tous de Sigma (SIGMA ALDRICH CHEMICAL).

III.1.2. Matériel végétal

La récolte du romarin (*Rosmarinus officinalis*) s'est effectuée au mois de mars 2013, dans la région de Tazmalt wilaya de Bejaïa. Après séchage de la plante, les feuilles ont minutieusement récupérées pour une extraction subséquente.

III.1.3. Choix des animaux et conditions d'hébergement

L'évaluation de la toxicité de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a été réalisée sur des souris femelles nullipares et non gravidiques, de variété *Swiss albinos*, adultes (8 semaines) dont le poids corporel varie entre 19g et 23g, obtenues au près de la faculté de médecine de l'université Mentouri de Constantine.

Les souris ont été logées aléatoirement dans des cages standards inoxydables, pour une période d'acclimatation d'environ une semaine au niveau de l'animalerie de la faculté biologie de l'université de Bejaia, avec une quantité précise et mesurée de l'eau et de la nourriture (Aliments pour bétails, ONAB Bejaia), à une température ambiante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Les autres conditions comme l'éclairage et la ventilation n'ont pas été prises en considération. La litière utilisée est la sciure, qui est renouvelée chaque jour ou chaque deux jour pour tous les groupes de souris.



Figure11 : Elevage des souris *Swiss albinos*.

III.2.Méthodes

III.2.1. Etapes d'extraction des polyphénols de *Rosmarinus officinalis*

III.2.1.1.Séchage et broyage des feuilles

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont été séchées à une température ambiante ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), à l'air libre et à l'abri de la lumière afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, puis broyées finement à l'aide d'un broyeur électrique ; le broyage suivi directement par un tamisage (250 à 500 μm), ce qui a permis d'obtenir une poudre fine et un meilleur rendement d'extraction.

III.2.1.2.Macération sous agitation

L'extraction des polyphénols totaux a été réalisée selon **la méthode de Markham (1982)** avec quelques modifications. Cette méthode comprend l'extraction qui se fait à base de méthanol pour solubiliser les polyphénols totaux comme il est décrit ci-dessous :

La poudre obtenue après broyage (60g) a été soumise à une extraction par macération sous agitation, dans un mélange méthanol/eau (80/20 : v/v) lors des deux premières macérations (2 fois 24h), et un rapport méthanol/eau (50/50 : v/v) au cours de la troisième macération (24h), pour une durée totale de 72 heures.

III.2.1.3. Filtration et délipidation de l'extrait méthanolique

Le filtrat combiné des trois macérations a été filtré une deuxième fois à l'aide du papier filtre wattman n°3, puis le solvant d'extraction a été complètement éliminé par évaporation à 40°C pendant 48 heures dans une étuve. Le résidu sec récupéré a été repris dans 100ml d'eau distillée pour obtenir une solution plus au moins homogène.

L'extrait méthanolique solubilisé dans l'eau distillée a été débarrassé des cires, des lipides et de la chlorophylle suite aux plusieurs lavages réalisés par l'éther du pétrole (50/50 : v/v) à l'aide d'une ampoule à décanter. Le solvant a été éliminé par séchage à 40°C dans l'étuve, permettant ainsi d'obtenir un extrait sec caractérisé par une couleur brune.

III.2.2.Calcul du rendement

Le taux d'extraction a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement}(\%) = \text{M1/M0} \times 100$$

M0 : masse de la poudre avant extraction.

M1 : masse de l'extrait sec après extraction

III.2.3. Dosage des poly-phénols totaux

III.2.3.1. Principe de dosage

La quantité des polyphénols totaux de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a été estimée par la méthode de Folin ciocalteu décrite par (Owen et Johns, 1999) avec quelques modifications.

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-visible en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, qui est constitué de deux mélanges, l'acide phospho-tungstique (WO_4^{2-}) et l'acide phospho-molybdique (MoO_4^{2-}), basé sur la réduction en milieu alcalin des composés du folin ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, menant à l'apparition d'une coloration « bleu » avec une intensité proportionnelle à la quantité des poly-phénols oxydés dans le milieu réactionnel. Ces derniers présentent une absorbance maximale de l'ordre de 740nm.

III.2.3.2. Procédure expérimentale

Expérimentalement, 200µl d'extrait solubilisé dans du méthanol (99%) ont été mélangées à 1ml du réactif de folin à 0,1N. Après 5 minutes, 800µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5% ont été ajoutées au milieu réactionnel. Une heure après l'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance des milieux a été mesurée à 740nm par spectrophotomètre (UNICO). Par la suite, la quantité des poly-phénols a été calculée à partir des gammes d'étalonnage établies par l'acide gallique qui est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

III.2.2. Etude de la toxicité de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*

III.2.2.1. Etude de la toxicité aigüe

Les essais de la toxicité aigüe permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 1 à 14 jours) après l'administration d'une substance chimique.

La toxicité aigüe a été déterminée selon la méthode préconisée par l'article de l'OCDE n° 425 (2008).

III.2.2.1.1.Répartition des souris

Lors de cette étude, les souris ont été laissées à jeun pendant environ 16 heures, puis réparties selon l'homogénéité de leur poids sur 3 lots de 6 souris chacun :

- Lot I : lot control (CNTL), ces souris ont reçu uniquement de l'eau physiologique (0.9% solution de NaCl).
- Lot II et III (lots traités) : ces groupes de souris ont reçu respectivement les doses 2500 et 5000 mg/kg.

III.2.2.1.2.Procédure expérimentale

III.2.2.1.2.1.Administration de l'extrait

Après une nuit de jeûne (environ 16h), l'administration de l'extrait s'est effectuée par voie orale et en une seule dose, soit 2500 mg/kg pour un groupe (lot I) et 5000 mg/kg pour un autre groupe (lot II). Les souris du groupe témoin ont reçu seulement le volume adéquat d'une solution physiologique (NaCl 0.9 %), dans lequel a été solubilisé l'extrait avant administration. Notant que le volume de la solution administrée aux différents groupes de souris est constant (0.5ml).

III.2.2.1.2.2.Observation du comportement des animaux

Lors de ce test, les animaux ont été observés individuellement, au moins pendant les 4 premières heures suivant l'administration de l'échantillon, puis quotidiennement durant une durée de 30 minutes pour une période d'observation totalisant 14 jours.

Le comportement des souris, les symptômes manifestés ainsi que le temps d'apparition des nouveaux symptômes ont été notés quotidiennement durant toute la période expérimentale.



Figure12 : Administration de l'échantillon par voie orale.

III.2.2.2. Étude de la toxicité sub-chronique

La toxicité à moyen terme ou toxicité sub-chronique est la recherche à définir les organes et les fonctions touchés par un toxique administré quotidiennement, sur une période n'excédant pas trois mois.

La toxicité sub-chronique a été déterminée selon les méthodes de l'article de l'**OCDE n°407 (2008)**.

III.2.2.2.1. Répartition des souris sur différents lots

Après une nuit de jeûne (environ 16h), les souris ont été réparties sur 4 groupes selon l'homogénéité de leur poids corporel :

- Lot I : lot control (CNTL), ce groupe de souris a reçu uniquement de l'eau physiologique (NaCl 0.9 %).
- Lot II, III et IV: lots traités par l'extrait, respectivement avec les doses de 200,400 et 800 mg/kg.

III.2.2.2.2. Procédure expérimentale

➤ Administration de l'extrait

Lors de cette étude, l'administration de l'extrait aux animaux a été effectuée quotidiennement par voie orale sur une durée de 28 jours successifs. L'extrait a été solubilisé dans une solution physiologique (NaCl 0.9 %) et le gavage a été réalisé dans la même période de la journée (matin). Notant que le volume de la solution administrée aux différents groupes de souris est constant (0.5ml).

III.2.2.3. Mesure du volume d'eau et de la quantité de nourriture consommés

Le volume d'eau et la quantité de nourriture consommés ont été mesurés quotidiennement, soit lors de l'étude de la toxicité aiguë ou sub-chronique. La nourriture déposée dans l'auge (couvercle des cages), a été préalablement pesée, et cela rendait possible la mesure de la quantité consommée en pesant la nourriture restante dans l'auge. Le volume d'eau consommé a été mesuré par la même méthode, en mesurant le volume d'eau restant dans les biberons.

III.2.2.4. Étude de l'évolution pondérale des souris

Le poids corporel des souris utilisées dans cette étude a été mesuré, peu de temps avant l'administration de l'échantillon, et après chaque 7 jour du début du test de la toxicité aiguë (7^{ème} et 14^{ème} jours). Lors de l'étude de la toxicité sub-chronique, le poids des souris a été noté chaque semaine en utilisant une balance électronique de marque **Radwag 2008**.

III.2.3. Étude histopathologique

III.2.3.1. Prélèvement d'organes

Le prélèvement d'organes à partir des souris utilisées dans cette étude a été réalisé aussitôt possible après la mort de l'animal, afin d'éviter les altérations cadavériques qui apparaissent rapidement et modifient le tableau nécrosique.

L'animal a été mis à jeun la veille du prélèvement. Le lendemain, il a été sacrifié ; après l'examen macroscopique du cadavre, il a été fixé en décubitus dorsal sur une plaque en bois, en fixant solidement les quatre pattes à l'aide d'aiguilles de fixation (figure13). Une petite incision au niveau périnée a été pratiquée, jusqu'au menton. Deux autres incisions perpendiculaires à la première ont été également pratiquées. Les organes ont été ainsi facilement prélevés, immédiatement pesés puis conservés pour éventuelle étude histologique.



Figure13 : Préparation et fixation de l'animal



Figure 14 : Prélèvement de différents organes

III.2.3.2. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été effectuées au niveau de l'hôpital de Frantz fanon de Bejaïa.

III.2.3.2.1. Fixation

Après leurs prélèvements et leurs pesées, le foie et les reins ont été lavé avec de l'eau physiologique puis conservés dans une solution de formol à 10% (fixateur). Cette étape a pour objectif de conserver les structures dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant.

III.2.3.2.2. Déshydratation des tissus

Pour les déshydrater, les tissus découpés en tranches fines (2-3 mm sur 1-2cm) ont été plongés dans 07 bacs d'alcools éthyliques à titrage croissants, de 70° à 100°, pendant un temps nécessaire à l'équilibre des concentrations. La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine. La paraffine n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation. On procède donc à une double substitution.

- On remplace l'eau par de l'alcool (Déshydratation)
- On remplace l'alcool par le xylène (Substitution), en baignant les tissus déshydratés dans le xylène, pour éliminer d'une part, toute trace d'éthanol utilisé à la déshydratation et d'autre part, éclaircit les pièces.

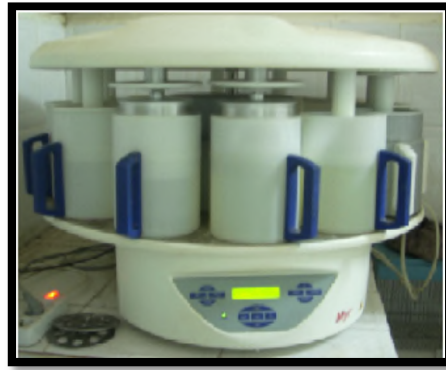


Figure 15 : Les étapes d'inclusion par l'automate

III.2.3.2.3. Enrobage a la paraffine

Cette dernière consiste à placer le fragment d'organe dans un moule métallique rempli préalablement par la paraffine pure et fondu couvert d'une cassette en suite, les cassettes sont incubées dans le réfrigérateur jusqu'à refroidissement et durcissement de la paraffine.

III.2.3.2.4.Confection des blocs

Après leur enrobage, les échantillons ont été incubés à basse température jusqu'à refroidissement de la paraffine, ce qui rendait possible un découpage précis et obtention de coupes plus au moins fine à l'aide d'un microtome.



Figure 16 : Appareil d'enrobage et confection des blocs

III.2.3.2.5.Réalisation des coupes

La coupe du bloc de paraffine au microtome permet de réaliser des coupes très fines de 4 à 6 microns d'épaisseur pour chaque prélèvement, cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser le prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires, ce qui permet d'obtenir des images claires sous microscope photonique, Les coupes sont

recueillies sur des lames de verre à partir d'un bain marin et étalée à l'aide d'une solution d'eau gélatinée, puis laissées sécher dans l'étuve pendant une nuit à 37°C.

III.2.3.2.6. Déparaffinage

Pour se débarrasser de la paraffine, les lames ont été baignées dans 02 baignoires successives de Xylène pendant 15 mn chacune, suivi de 03 baignoires successives d'éthanol à (100%, 90%, et 70%) pendant 03 minutes chacune, puis rincées pendant 01 minute avec de l'eau distillé.

III.2.3.2.7. Coloration

Cette étape permet de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires et pour cela, les lames ont été mises dans un bain d'hématoxyline pendant 03 minutes, puis rincées pendant 05 minutes avec de l'eau courante, suivi d'un bain d'éosine pendant 30 secondes puis rincées rapidement avec de l'eau, l'étape qui suit consiste à déshydrater avec l'éthanol à des concentrations croissantes (70°, 90°, 100°) pendant 2 minutes chacune, puis les mettre dans un bain de xylène de 2 à 3 minutes, suivi finalement d'un séchage à l'air libre ou à l'étuve.

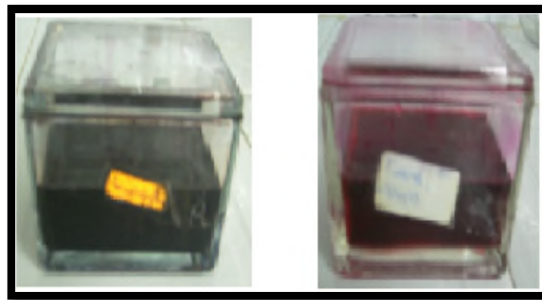


Figure 17 : Les étapes de coloration

III.2.3.2.8. Observation microscopique

La visualisation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope optique, avec un grossissement ($G \times 10$) dans le but d'obtenir des photos des différents échantillons prisent avec un appareil photo numérique (SONY DIGITAL STILL CAMERA).

III.2.4. Étude de l'effet préventif de l'extrait contre le diabète induit par la streptozotocine

L'objectif de ce test est d'étudier l'effet protecteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* contre l'effet diabétogène de la streptozotocine, en se basant sur une méthode

inspirée du travail publié par **Kamtchouing et ses collaborateurs en 1998**, tout en apportant une légère modification.

III.2.4.1.Procédure expérimentale

III.2.4.1.1.Répartition des animaux

Lors de cette étude les souris ont été réparties sur trois lots de 5 souris chacun :

- Lot I : contient les souris non traitées (NT) ; les souris de ce groupe ont reçu seulement de l'eau physiologique (NaCl 0.9 %).
- Lot II et III : lots de souris traités par l'extrait, respectivement avec les doses 400 et 800mg/Kg.

III.2.4.1.2.Administration de l'échantillon

L'extrait, après sa solubilisation dans une solution physiologique (NaCl 0.9%), a été administré aux souris par voie orale à raison de deux administrations par jour, une fois le matin et une fois le soir. Le traitement a été effectué pendant 7 jours successifs, 3 jours avant et 4 jours après l'injection de la streptozotocine, selon la méthode suivie par **Kamtchouing et al 1998**, avec une légère modification.

III.2.4.1.3.Induction du diabète par la streptozotocine

Après 3 jours de traitement, les souris ont reçu une dose unique de 130 mg/kg de streptozotocine. Cette dernière a été dissoute dans un tampon citrate (0,1M, pH 4,5) (**Rajiv Gandhi et Sasikumar ,2012**). Les souris ont été gavées 1 heure avant l'injection de la streptozotocine par voie intra-péritonéale (**He-Lin Tian et al., 2010**). Après l'injection de la streptozotocine, les souris ont subi le même traitement durant 4 jours successifs, en respectant les mêmes doses administrées avant l'injection de la streptozotocine.

III.2.4.1.4.Mesure de la glycémie

Après 4 jours de l'injection de la streptozotocine, les souris ont été laissées environ 16 heures à jeun dans le but de mesurer leur glycémie. Le sang a été prélevé à partir de la veine de la queue et la concentration de glucose sanguin a été mesurée à l'aide d'un glucomètre de marque One Touch Ultra.

III.3. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée par un logiciel de statistique « Statview », en utilisant le test-t Student. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm erreur standard (ES). Les différences entre les groupes sont considérées significatives lorsque ($p < 0.05$).

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

IV.1. La teneur de l'extrait méthanolique de romarin en poly-phénols totaux et le rendement d'extraction

La teneur de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* en polyphénols est représentée par la figure 20.

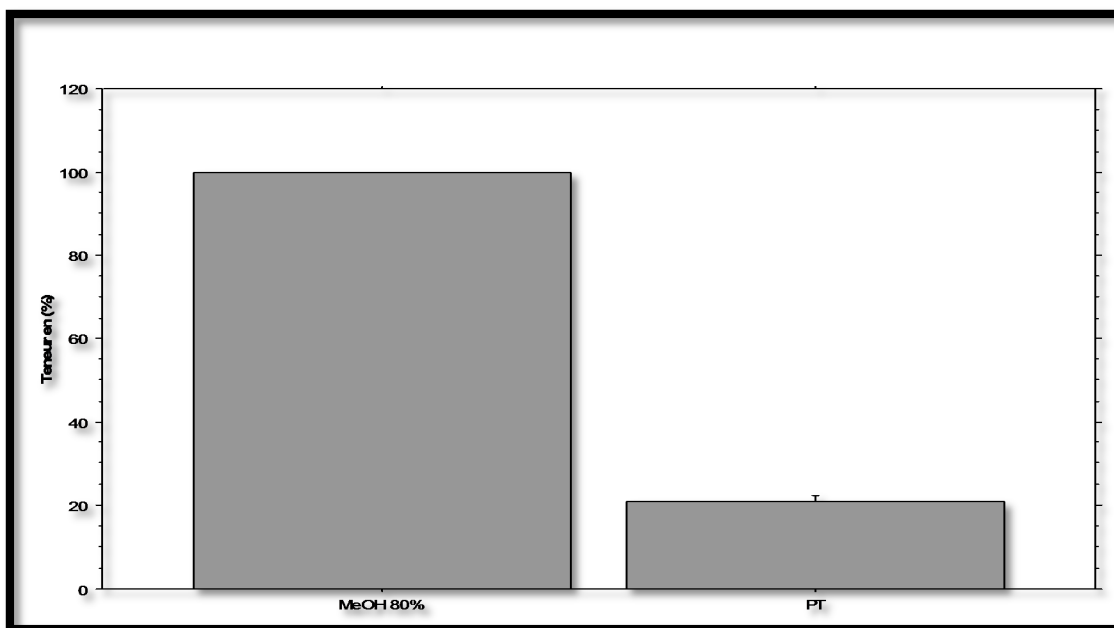


Figure 20 : La teneur de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* en polyphénols.

PT: Poly-phénols totaux. Les résultats sont exprimés en mg/g.

L'extraction des polyphénols à partir des feuilles de *Rosmarinus officinalis* par macération, en utilisant des solvants organiques a permis d'obtenir un rendement de 16% de l'extrait sec par rapport à la masse totale de la poudre. Le dosage des polyphénols révèle une teneur de 210 mg EAG/g d'extrait sec.

IV.2. Évaluation de la toxicité

IV.2.1. Toxicité aigüe

Les résultats de l'étude de la toxicité aigüe sont présentés dans les tableaux III et les figures ci-dessous.

Dans le tableau III sont présentés les résultats de mortalité observés chez les souris exposées à une dose unique de la substance d'essai. L'observation a été minutieusement effectuée durant 14 jours successifs après l'administration orale de l'extrait étudié.

Tableau III : Mortalité après administration d'une dose unique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Dose (g/Kg)	Mortalité	Latence de mortalité
0 g/Kg	0/6	0
2.5 g/Kg	0/6	0
5 g/Kg	0/6	0

Nous constatons d'après le résultat obtenu, que les doses de l'extrait administré aux souris (2500mg/kg et 5000mg/kg) ont été bien tolérées, d'ailleurs aucun cas de mortalité liée à la substance d'essai n'a été signalé.

Si on revient à la classification de toxicité selon l'échelle de **Hodge et Sterner** chez les rats de laboratoire (**Hodge et Sterner, 1949**) et dont laquelle une DL_{50} orale ≥ 5000 mg/kg ($5\ 000 < DL_{50} < 15000$ mg/kg) signifie une substance presque non toxique, ce qui confirme que l'extrait testé lors de cette étude est presque non toxique.

En raison de l'absence de mortalité, nous pouvons dire que la DL_{50} de l'extrait administré est largement supérieure à 5000mg/kg qui présent la dose d'essai. Notant également que ce test sert d'un essai limite, qui détermine la dose de l'essai principal, lorsque plus de 50% des animaux meurent.

IV.2.2. Comportement des animaux et signes de toxicité

Le changement du comportement, ainsi que les symptômes manifestés par les souris durant les 14 jours d'observation qui suivent l'administration des doses testées, sont présentés dans le tableau IV.

Durant la période d'observation qui a duré 14 jours, les souris n'ont montré aucun changement dans l'apparence physique générale. Cependant, l'administration des différentes doses de l'extrait étudié par voie orale, a provoqué des diarrhées plus ou moins sévères.

Le tableau V résume tous les paramètres liés à la diarrhée enregistrée au cours de cette expérience.

Tableau IV : Évaluation des comportements et symptômes des souris lors de l'étude de la toxicité aiguë.

	Lot Témoin		2.5g/Kg		5g/Kg	
	Première 4 H	Chaque jour	Première 4H	Chaque jour	Première 4 H	Chaque jour
Désorientation	/	/	/	/	/	/
Tremblements	/	/	/	/	/	/
Convulsions	/	/	/	/	/	/
Salivation	/	/	/	/	/	/
Peau et fourrure	/	/	/	/	/	/
Léthargie	/	/	/	/	/	/
Diarrhée	++	++	++	++	++	++
Rythme respiratoire	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Saignement	/	/	/	/	/	/

++ : Relativement sévère

/ : Aucun signe

Tableau V : Évolution de la diarrhée chez les souris de toxicité aiguë

				Témoin	2.5g/Kg				5g/Kg			
Les premières 4H				/	/	/	/	+++	/	/	+++	/
1H	2H	3H	4H					3/6			4/6	
1 ^{er} jour				/	+++			6/6	+++			3/6
2 ^{ème} jour				/	++			4/6	++			5/6
3 ^{ème} jour				/	/				++			4/6
4 ^{ème} jour				/	++			3/6	+++			4/6
5 ^{ème} jour				/	+			1/6	+			4/6
6 ^{ème} jour				/	++			1/6	+++			2/6
7 ^{ème} jour				/	++			6/6	++			6/6
8 ^{ème} jour				/	+			1/6	/			
9 ^{ème} jour				/	+			1/6	+			2/6
10 ^{ème} jour				/	/				+			3/6
11 ^{ème} jour				/	+			4/6	+			2/6
12 ^{ème} jour				/	+			2/6	++			2/6
13 ^{ème} jour				/	+			3/6	++			3/6
14 ^{ème} jour				/	+			1/6	++			2/6

(+ : légère) (++) : moyenne) (+++ : sévère) (/ : pas de diarrhée observée)

Le résultat obtenu montre que, dès les premières heures de l'administration de l'extrait, à des doses uniques de 2.5 g/kg et de 5 g/kg, une diarrhée plus ou moins sévère a été enregistrée. La diarrhée est plus importante chez le groupe de souris qui ont reçu la dose la plus élevée (5g/kg), où elle s'est manifestée quotidiennement chez plus de 50% de souris durant la première semaine de l'étude et d'un degré moindre durant la deuxième semaine. Le groupe de souris ayant reçu une dose de 2.5g/kg est moins touchée par la diarrhée, dont la prévalence ne dépasse pas généralement 50%.

Selon l'étude de **wang et ces collaborateurs en 2012**, sur la toxicité de l'acide carnosique, où ils ont démontré que l'administration de cet acide provoque des diarrhées chez les souris traitées avec des différentes doses. Cet acide serait à l'origine de la diarrhée observée lors de cette étude.

La richesse de l'extrait étudié en substances osmotiquement actives et peu absorbables, tels que les polysaccharides en concentration élevée dans la lumière intestinale, peuvent être la cause principale de cette diarrhée, notamment le résultat montre que plus la dose augmente l'effet s'accroît.

IV.2.3. Évolution pondérale

L'un des paramètres auquel nous nous sommes intéressés durant notre travail, est l'évolution pondérale des souris étudiées. Ce paramètre est en relation directe avec la toxicité. En fait l'apparition d'une toxicité s'accompagne souvent d'un amaigrissement et perte considérable du poids.

La figure 21 montre l'évolution du poids corporel des souris pendant la période expérimentale.

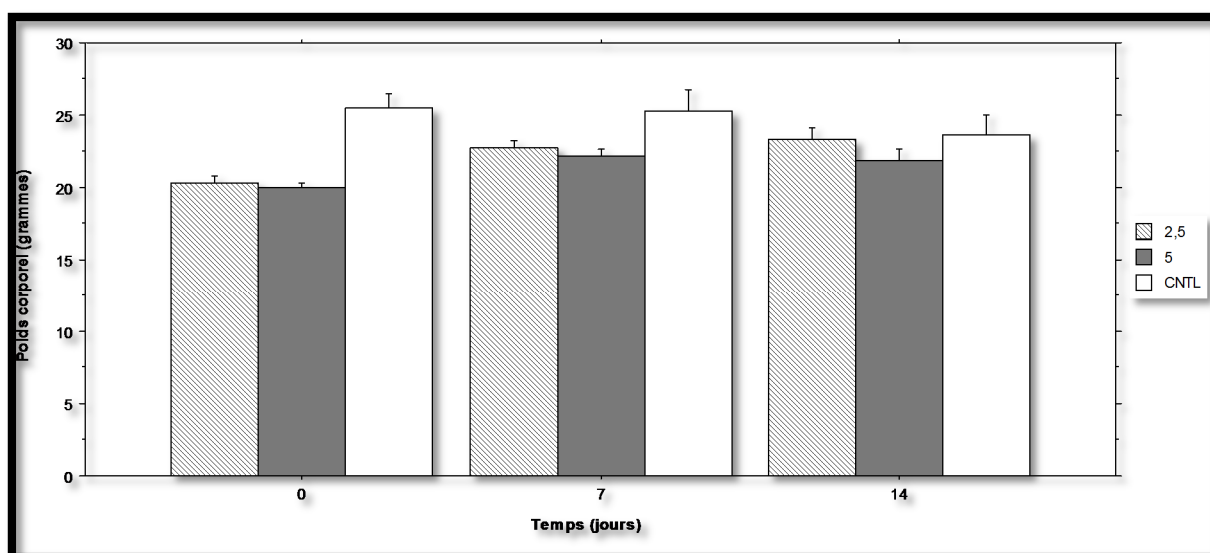


Figure 21 : Variation du poids corporel des souris durant le test de la toxicité aiguë.

(2.5 : 2.5g/Kg, 5 : 5g/Kg, CNTL : control. les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type).

Après 07 jours de l'administration de l'extrait, une élévation considérable du poids corporel a été notée chez les souris traitées. À la différence du lot control où l'augmentation du poids corporel est relativement faible. Après 14 jours de l'administration des doses (2.5 et 5 g/kg), le poids corporel des souris traitées et non traitées a resté relativement stable.

D'après Li et al., 2007, pas moins de 90% des flavonoïdes isolés des plantes sont glycosylés, et comme l'extrait étudié est riche en polyphénols, donc en composés glycosylés, ce qui engendre probablement une prise du poids. Sachant que les glucides en excès dans

l'organisme, sont stockés sous forme de glycogène dans le foie et les muscles, ou sous forme de graisse dans les tissus adipeux.

IV.2.4. Évaluation de la quantité de nourriture et le volume d'eau consommés

La quantité de nourriture et le volume d'eau consommés sont représentés sur les figures 22 et 23.

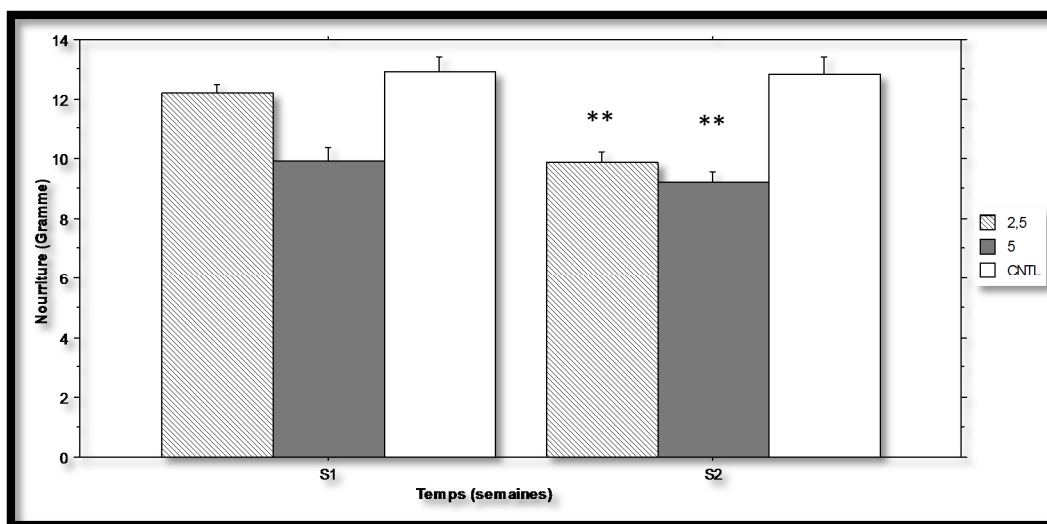


Figure 22 : Evaluation de la quantité de la nourriture consommé durant le test de la toxicité aigüe

(2.5 : 2.5g/Kg, 5 : 5g/Kg, CNTL : control. les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Le résultat ne montre pas de différence significative dans la prise de la nourriture entre les groupes de souris traitées et le groupe contrôle après une semaine de l'administration de l'extrait. Durant la deuxième semaine, une différence très significative a été marquée dans la quantité de la nourriture consommée entre les différents groupes de souris, avec une consommation beaucoup plus importante chez les souris du groupe contrôle.

La diminution de la quantité de nourriture consommée par les souris traitées par l'extrait, reviendrait à la richesse de ce dernier en composés sucrés, qui présentent une source d'énergie très importante. L'effet anorexique probablement exercé par l'extrait des feuilles de *Rosmarinus officinalis* contribuerait dans la diminution de la prise alimentaire.

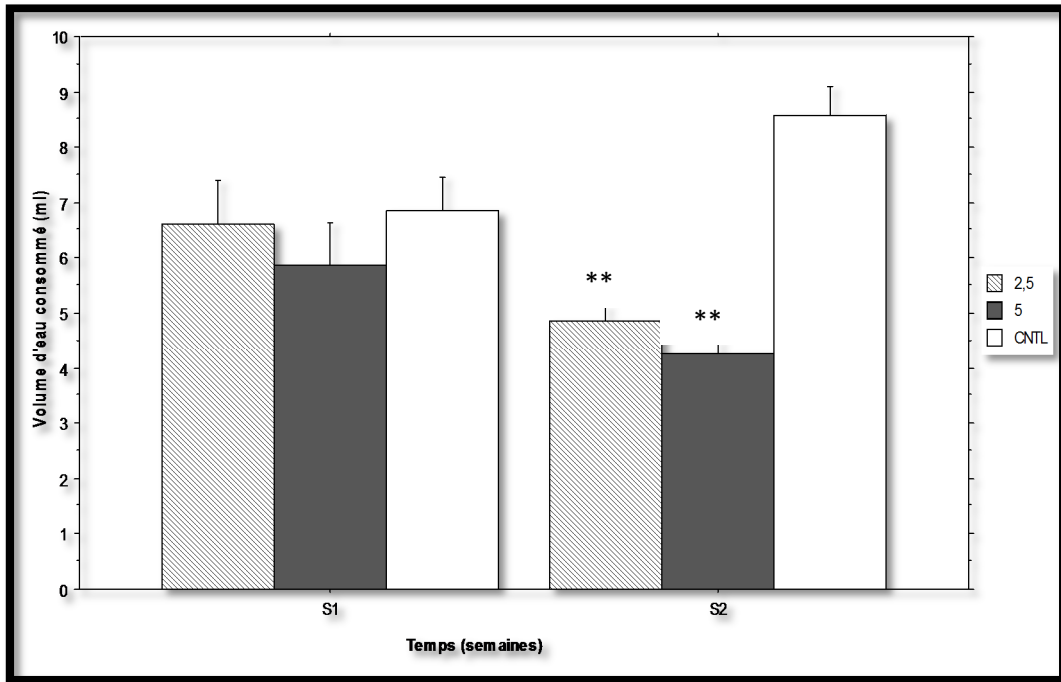


Figure 23 : Évaluation de volume d'eau consommé durant le test de toxicité aigüe (2.5 :2.5g/Kg, 5 : 5g/Kg, CNTL : control. les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. ($p \leq 0.05$)* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Après une semaine de l'administration de l'extrait les groupes de souris ne montrent pas de différence significative dans le volume d'eau consommé. Durant la deuxième semaine, une différence très significative a été notée dans le volume d'eau consommé par les différents groupes de souris, avec une consommation plus prononcée chez les souris du groupe contrôle.

IV.2.5.La masse relative des organes

L'examen macroscopique des différents organes prélevés à partir des animaux étudiés, après les avoir sacrifié, a été réalisé *in situ*. Une observation minutieuse a été effectuée concernant la taille, la forme, la couleur ainsi que le poids des organes (reins, foie, cerveau, poumons, estomac, rate, et cœur). Ceci est bien élucidé après la détermination de la valeur de la masse relative pour chaque organe (Tableau VI).

Tableau VI : Évaluation du rapport poids d'organe/100 g de poids corporel de toxicité aigüe.

poids de l'organe/100 g de poids corporel	CNTL	2.5g/kg	5g/kg
Cœur	0.38±0.06	0.57±0.06**	0.51±0.01**
Rein droit	0.38±0.18	0.53±0.03	0.51±0.03
Rein gauche	0.69±0.36	0.52±0.04	0.48±0.02
Foie	5.01±1.30	4.69±0.77	4.76±0.18
Poumons	0.88±0.13	0.77±0.02	0.89±0.12
Estomac	1.08±0.28	1.37±0.29	1.04±0.15
Rate	0.20±0.02	0.23±0.05	0.26±0.01**
Cerveau	1.39±0.46	1.63±0.20	1.73±0.08

*Les données sont exprimées en moyenne ±écart type. (p≤0.05) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001*

Aucune variation significative n'a été observée dans le poids des organes (foie, rein, poumons, estomac, cerveau) entre tous les groupes de souris, à l'exception de la rate et le cœur, où ceux des souris traitées sont relativement volumineux par rapport aux souris du groupe contrôle. Cette différence dans le poids de cœur et de la rate observée chez les différents groupes de souris est due probablement à d'autres facteurs, à part celui des substances toxiques qui induisent généralement des nécroses et des dégénérescences cellulaires, habituellement traduites par des hypotrophies des organes donc diminution de leur poids.

Les organes les plus susceptibles d'être touchés par les xénobiotiques, sont généralement le foie et le rein, les deux organes intervenant dans la détoxification des substances toxiques. Le rein et le foie des souris traitées ne présentent pas d'hypotrophie ni hypertrophie comparant au groupe contrôle, cela confirme davantage que les doses administrées de l'extrait étudié ne sont pas toxiques.

IV.3.1. Toxicité sub-chronique

Cette étude s'est étalée sur une période de 28 jours successifs, durant laquelle plusieurs paramètres ont été étudiés, des paramètres plus au moins complémentaires à fin d'aboutir à un résultat final confirmatif.

IV.3.1.1.Évolution pondéral

Il est intéressant de suivre l'évolution du poids des animaux lors d'une étude toxicologique, car elle peut nous fournir des renseignements préliminaires sur la substance étudiée.

La figure 24 illustre la variation dans le poids corporel des souris exposées à des doses répétées de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rosmarinus officinalis*.

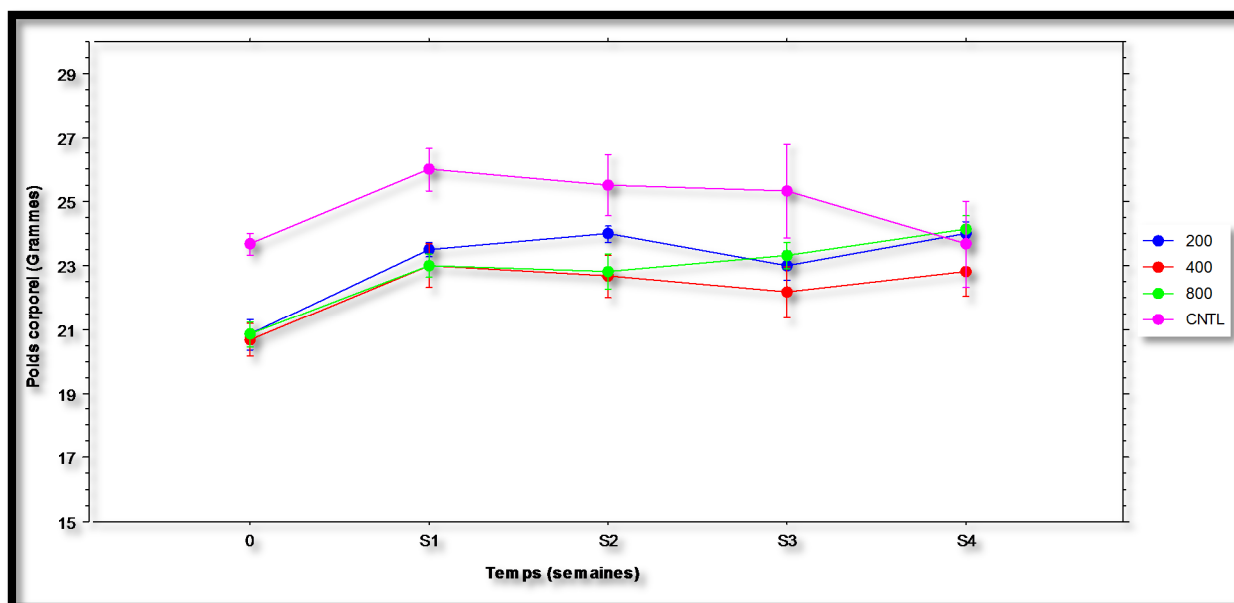


Figure 24 : Variation du poids corporel des différentes doses durant le test de la toxicité sub-chronique.

(200mg/Kg ; 400mg/Kg ; 800mg/Kg ; CNTL : 0 mg/Kg. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type).

Après une semaine de traitement par des différentes doses de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*, une augmentation dans le poids corporel des souris a été enregistrée chez tous les groupes.

Entre la première et la troisième semaine, une stabilité relative dans le poids corporel a été marquée pour tous les groupes de souris étudiées.

Après la troisième semaine une augmentation dans le poids corporel a été notée chez les souris traitées par l'extrait, à la différence du groupe de souris non traitées qui ont connu une diminution considérable dans leurs poids corporel.

Des études ont été faites sur l'administration orale des extraits des plantes médicinales sur le poids corporel des animaux (**Rhiouani et al., 2008 ; Lakmichi et al., 2011**). Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (**El-Hilaly et al., 2004**). Ainsi, la perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal et peut être expliquée, non seulement par l'anorexie (**Betti et al., 2012**), mais aussi par l'altération du métabolisme des animaux.

Ce résultat nous renseigne en partie sur la toxicité de l'extrait étudié. Le poids corporel des souris ayant reçu des doses différentes de l'échantillon (200, 400, 800mg/kg), n'a pas connu de variation considérable (chute), ce qui nous laisse suggérer la non toxicité de l'extrait.

IV.3.1.2. Evaluation de volume d'eau et de la quantité de nourriture consommés

La quantité de la nourriture et le volume d'eau consommés sont représentés sur les figures 25 et 26.

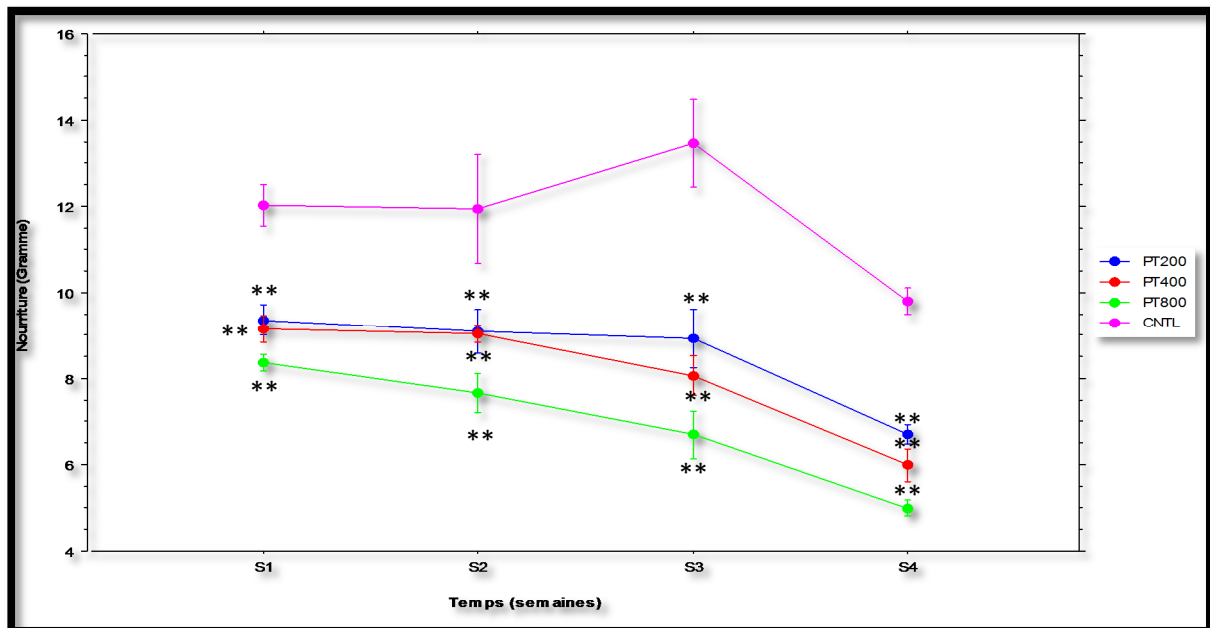


Figure25: Evaluation de la quantité de la nourriture consommée durant le test de toxicité sub-chronique

(PT200 : 200mg/Kg ; PT400 : 400mg/Kg ; PT800 : 800mg/Kg ;CNTL : 0 mg/Kg. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type).

Nous constatons d'après la figure 26, qu'une différence significative a été notée dans la quantité de la nourriture consommée entre les souris traitées et les souris du groupe contrôle. La prise alimentaire la plus importante a été observée chez les souris non traitées.

Similaire au résultat obtenu lors de la toxicité aiguë, les groupes des souris ayant reçu des doses différentes de l'extrait ont montré une prise alimentaire très faible.

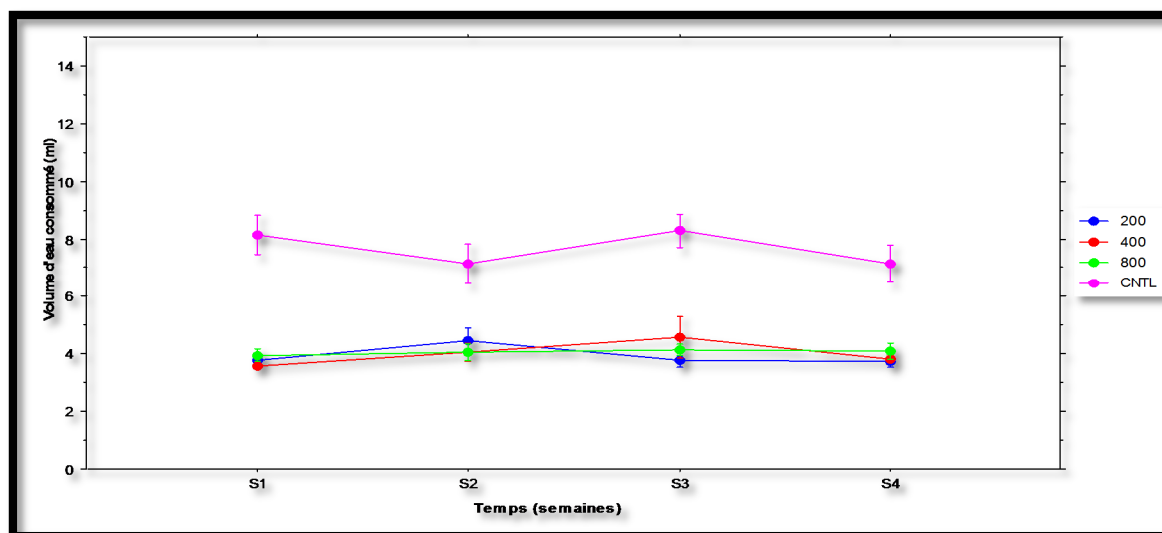


Figure 26 : Evaluation du volume d'eau consommé durant la toxicité sub-chronique

(PT200 : 200mg/Kg ; PT400 : 400mg/Kg ; PT800 : 800mg/Kg ; CNTL : 0 mg/Kg. Les résultats sont exprimés en *moyenne ± écart-type*).

Le volume d'eau consommé par les souris traitées par les différentes doses de l'extrait, est beaucoup plus faible que le volume consommé par les souris du groupe contrôle. Cela reviendrait à des facteurs du stress et autres plutôt que l'effet toxique de l'extrait.

IV.1.2.1.3. La masse relative des organes

Le tableau VII, présente l'effet de l'extrait méthanolique sur le poids relatif des organes à savoir : le cœur, les poumons, la rate, l'estomac, les reins, le foie et le cerveau.

Tableau VII : Évaluation du rapport poids d'organe/100 g de poids corporel de toxicité sub-chronique

Poids de l'organe/ 100g de poids corporel	Dose (mg/Kg)			
	Control	200	400	800
Cœur	0.38±0.06	0.46±0.02	0.48±0.009	0.54±0.06
Rein droit	0.38±0.18	0.48±0.04	0.52±0.01	0.57±0.01
Rein gauche	0.69±0.36	0.46±0.02	0.52±0.03	0.54±0.04
Foie	5.01±1.3	4.30±0.07	4.57±0.30	5.15±0.34
Poumons	0.88±0.13	1.16±0.14*	1.13±0.14	0.98±0.07
Estomac	1.08±0.28	1.26±0.30	1.49±0.17	1.14±.12
Rate	0.20±0.02	0.29±0.04*	0.34±0.07*	0.35±0.09
Cerveau	1.39±0.46	1.50±0.16	1.49±0.12	1.59±0.14

Après l'analyse macroscopique des organes, où nous n'avons pas constaté de changement dans la couleur et le volume des organes, le poids des organes est l'un des paramètres qui nous a aidés à déterminer le degré de toxicité de l'extrait étudié. Lors de cette étude nous nous sommes intéressés beaucoup plus au poids du foie et des reins, qui sont les plus touchés par les substances toxiques.

Le résultat présenté dans le tableau VII, ne montre pas de différence significative entre le poids des organes des souris ayant reçu les différentes doses de l'extrait et ceux des souris du groupe contrôlent. En effet la substance toxique agit généralement sur le foie ou le rein en induisant des dégénérescences cellulaires et des nécroses, qui se traduisent par l'hypotrophie de ces deux organes. Parfois la substance toxique agit en augmentant la masse de l'organe touché.

IV.2.Étude histopathologique

Cette partie de l'étude de la toxicité sub-chronique s'avère la plus importante, et son résultat est le plus rassurant concernant la toxicité de l'extrait administré aux souris à des doses différentes. L'observation microscopique des coupes histologiques des foies et des reins

révèlent tous changement structurel à l'échelle cellulaire, donc atteinte de l'organe en question par la substance toxique.

IV.2.1.Histologie rénales

Les figures (27, 28, 29 et 30) illustrent la structure de parenchyme rénal des différents groupes de souris. Nous constatons que les reins des souris témoins présente une architecture normale avec capsule conjonctivo-adipeuse. Dans la zone cortical, nous observons de petites masse sphériques, les glomérules qui sont entourés d'une capsule (la capsule de Bawman). 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 réabsorbée, le reste constitue l'urine.

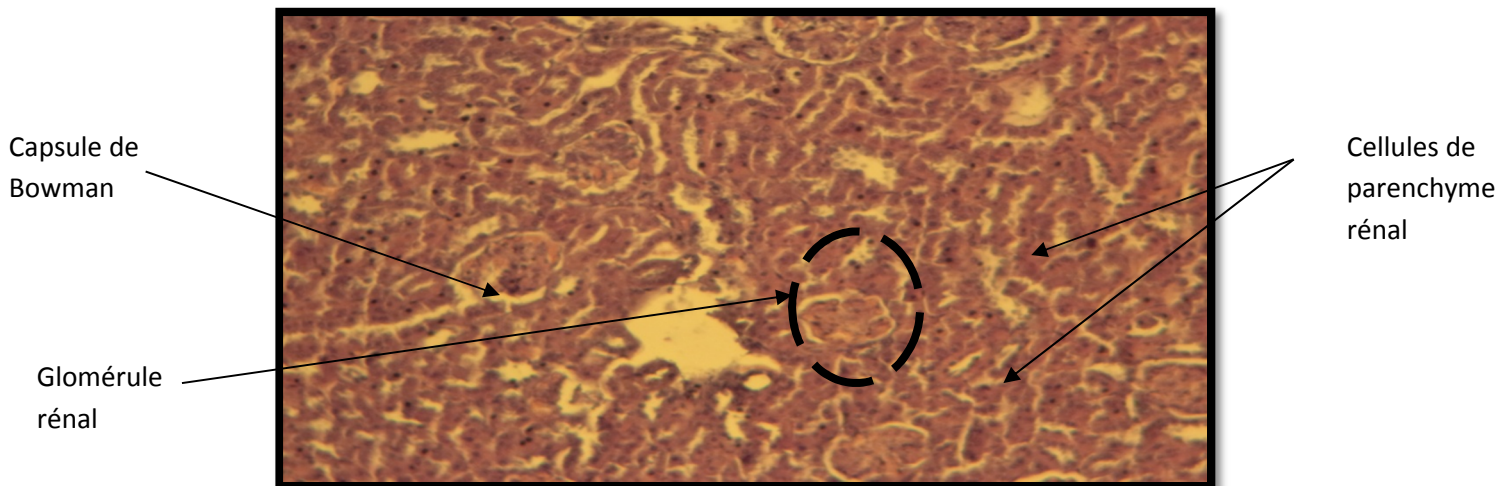


Figure 27 : Parenchyme rénal d'une souris témoin (G10x10)

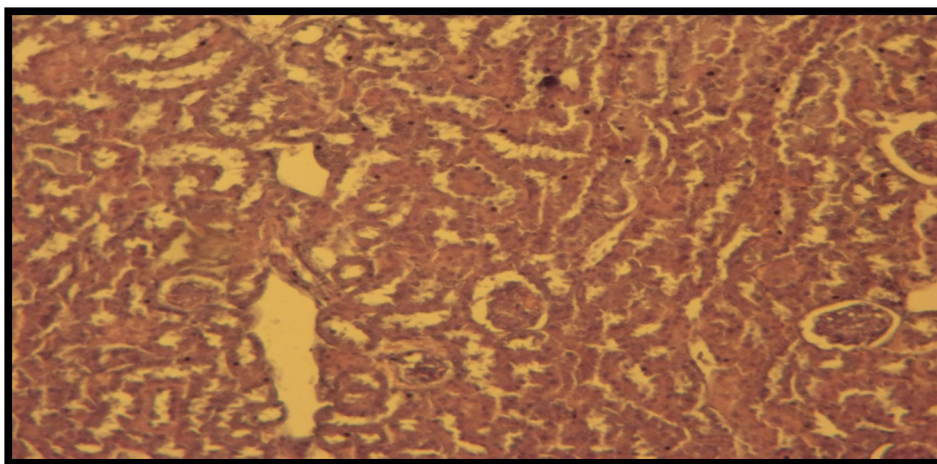


Figure 28 : Parenchyme rénal d'une souris de lot (200mg/kg) (G10x10)

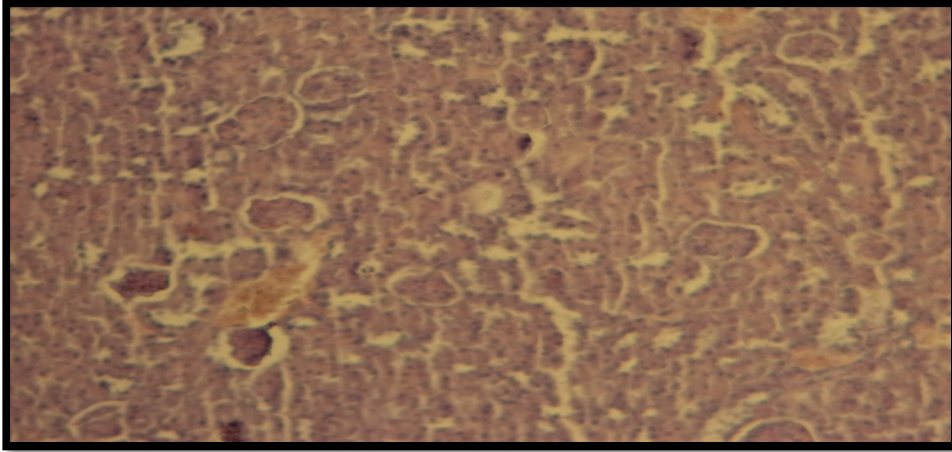


Figure 29: Parenchyme rénal d'une souris de lot (400mg/kg) (G10×10)

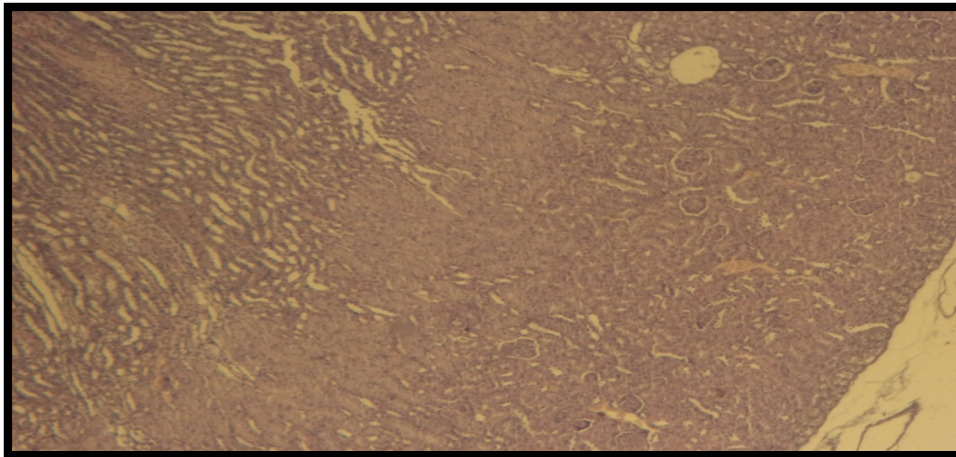


Figure 30 : parenchyme rénal d'une souris de lot (800mg/kg) (G10×10)

Les reins des souris traitées par les différentes doses de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* ne présentent pas de modifications au niveau de parenchyme rénal en comparant avec les souris du groupe témoin. De même, nous n'avons constaté de modification rénale au niveau de la capsule conjoncto-adipeuse des cellules de parenchyme rénal, des glomérules et même au niveau des tubes rénaux, ce qui confirme que les souris sont saines et ne présente aucune anomalie néphrétique.

IV.2.2.Histologie hépatique

Les figures (31, 32,33 et 34) montrent le résultat des coupes histologique réalisées sur les différents groupes de souris. Nous constatons d'après le résultat, que le foie des souris témoins présente un aspect normal sans modification hépatique, avec un parenchyme

d'architecture lobé. Chaque lobe est constitué d'hépatocyte agencés en travées de Remak disposé autour d'une veine centrale appelée veine centrolobulaire qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique au contact des sinusoides. Les travées de Remak sont constituées d'hépatocyte empilés en lames épithéliales d'une seule cellule d'épaisseur alors que les sinusoides occupent les espaces entre les travées (Fig31).

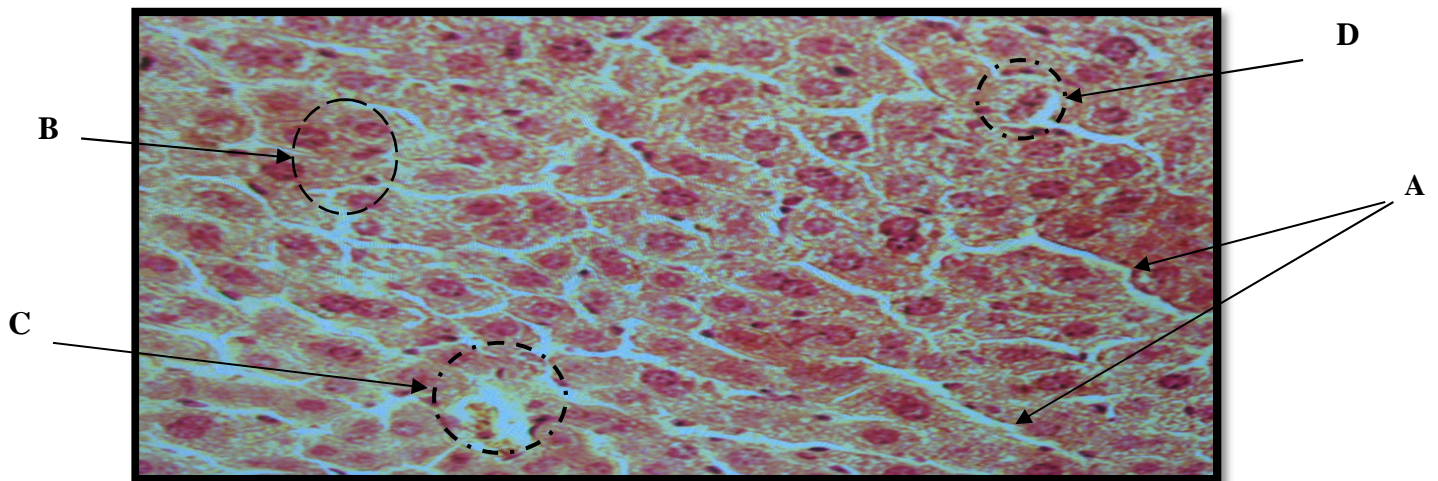


Figure 31 : Parenchyme hépatique d'une souris témoin (G10×10)

A : Sinusoides, **B** : Travées hépatocytaires de Remak, **C** : veine centro-lobulaire ,
D :Hépatocyte

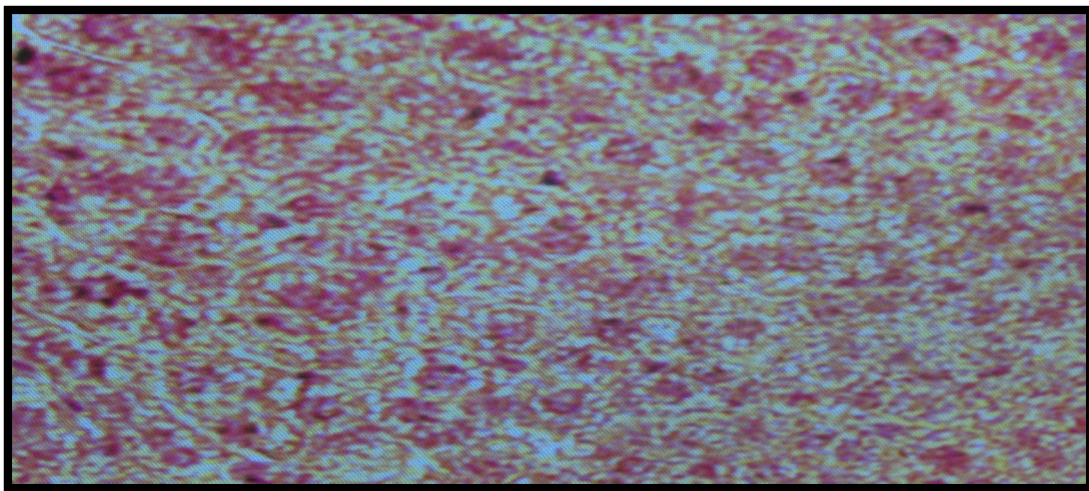


Figure 32 : Parenchyme hépatique d'une souris du lot (200mg/kg) (G10×10).

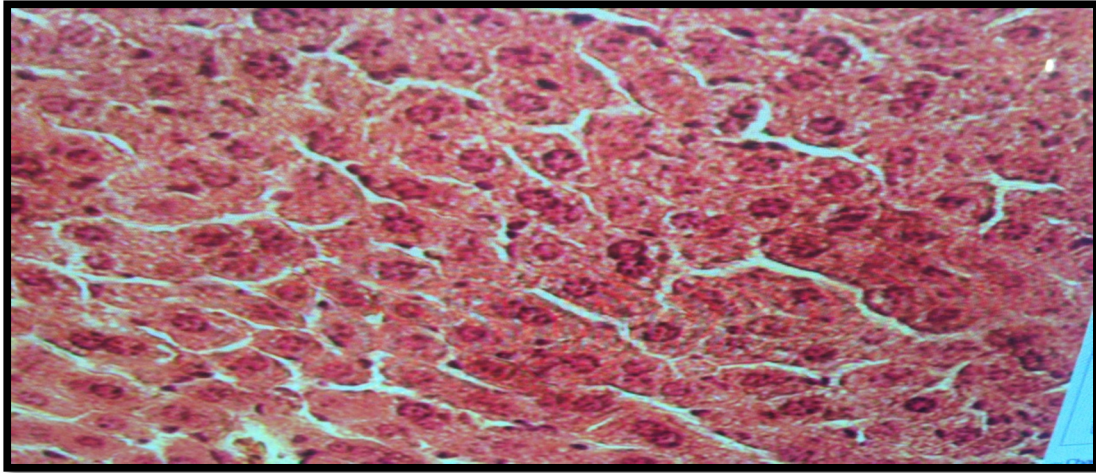


Figure 33 : parenchyme hépatique d'une souris du lot (400mg/kg) (G10×10).

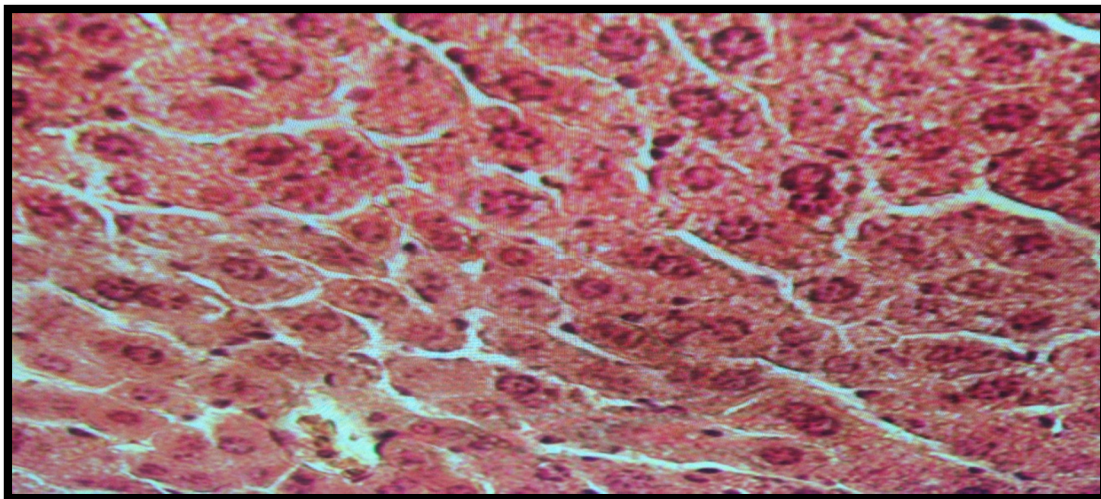


Figure 34 : parenchyme hépatique d'une souris du lot (800mg/kg) (G10×10).

L'examen microscopique des foies des souris traitées par les différentes doses de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* ne montrent aucun changement significatif, présentent une architecture normale et des parenchymes hépatiques normaux par rapport aux souris du groupe témoin (Figure 29), ce qui confirme que les souris sont saines et ne présentent aucune anomalie hépatique.

IV.3.Effet protecteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* contre la pancréatoxicité de la streptozotocine (STZ).

Ce test consiste à démontrer l'effet protecteur de l'extrait étudié contre la pancréatoxicité de la STZ, autrement dit, étudier l'effet préventif de cet extrait contre l'effet diabétogène de la STZ.

La figure 35 représente les valeurs de la glycémie chez les souris étudiées, après 72 heures de l'injection de la STZ.

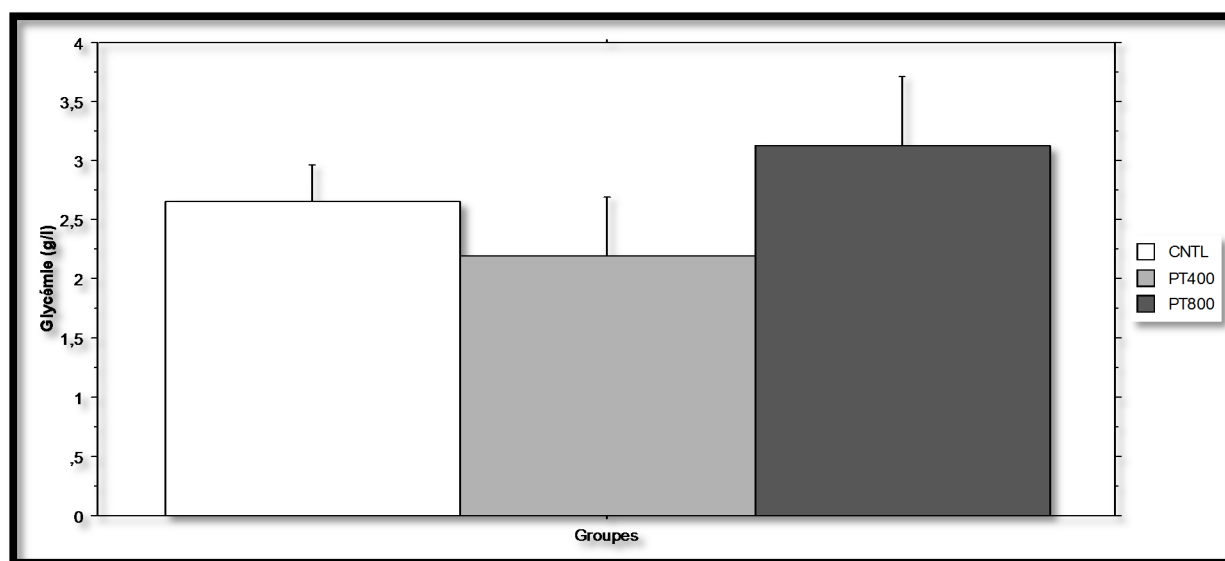


Figure 35 : Evaluation de la glycémie des souris

(PT 400 : lot traité par les polyphénols totaux 400mg/Kg, PT800 : lot traité par les polyphénols totaux à une dose de 800mg/Kg, CNTL : lot non traité .les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type).

Les résultats montrent que la glycémie de souris traitées par la dose 400 mg/kg est légèrement faible (2.25g/l) par rapport à la glycémie des souris non traitées (2.70g/l). Cependant la glycémie des souris traitées par une dose de 800mg/kg est relativement importante (3.10g/l) en comparant avec le groupe contrôle.

Nous pouvons suggérer que l'extrait étudié, possède un faible effet protecteur contre la pancréatoxicité de la STZ, quoique la relation dose-effet n'ait pas été observée, ce qui reviendrait à plusieurs facteurs externes, tels que le stress des animaux durant la mesure de la glycémie.

De façon générale, il est très intéressant de focaliser des études sur cet axe de recherche de molécules bioactives, dont l'effet et de protéger les cellules β pancréatiques contre la destruction causée par des agents diabétogènes quels que soient leur nature chimique et leur origine. Ajoutant aussi que la protection des cellules β pancréatiques par des molécules bioactives est liée étroitement au pouvoir antioxydant de ces dernières.

Notant également que la destruction des cellules β par les agents diabétogènes est causée essentiellement par un stress oxydatif, où la cellule en question n'a pas les capacités de lutter contre ce stress en raison de sa pauvreté en enzymes à effet antioxydant (**Naoaki *et al.*, 2012**).

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Rosmarinus officinalis L., est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle. Ses activités, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, et anti-tumoral sont attribuées à ses différents composants chimiques (huiles essentielles, flavonoïdes, polyphénols...).

Dans la présente étude, l'extraction brute par le méthanol suivie d'une étude phytochimique préliminaire indique la richesse de *Rosmarinus officinalis* en composés phénoliques avec une teneur importante en flavonoïdes.

L'étude de la toxicité aiguë de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*, après administration orale d'une dose unique de 2.5 et 5 g/kg, n'a montré aucun signe de toxicité ni sur le comportement, ni sur l'évolution du poids total, ni sur la quantité de la nourriture et de volume d'eau consommé, ou le poids des organes des souris traitées.

L'étude de la toxicité sub-chronique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*, après administration orale des doses 200, 400, et 800 mg/kg/jours pendant 28 jours, n'a enregistré aucun effet toxique, soit sur l'évolution du poids corporel, la quantité de nourriture et volume d'eau consommé, ou le poids des organes (cœur, foie, reins, cerveau, poumon, estomac, rate) des souris traitées.

Lors de l'étude histopathologique du foie et des reins, aucun changement significatif n'a été observé au niveau de ces deux organes.

L'étude de l'effet préventif des polyphénols totaux de *Rosmarinus officinalis* contre le diabète induit par la STZ chez les souris *Swiss albinos* à des doses 400, et 800 mg/kg n'a montré pas d'effet considérable.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vivo* ne constituent qu'une première étape dans l'évaluation de la toxicité de la plante étudiée, des essais complémentaires seraient nécessaires pour confirmer les performances mises en évidence.

Pour mieux évaluer la toxicité de l'extrait étudié, d'autres études *in vivo* et *in vitro* seraient intéressantes. De même, des études approfondies sur la toxicité chronique ou des doses plus de 5g/kg, seraient utiles pour pouvoir déterminer la DL₅₀.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- **Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J A., Roca, M.J, Rabe, V.** 2006. Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A*. **1120**: 221-229.
- **Arslan, D, Musa ozcan, M.** 2007. Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*.
- **Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler, J., Halliwell , B.** 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *Food and Chemical Toxicology*. **34**: 449-456.
- **Atik Bekke, F., Bousmaha, L.,Talrb bendiab,S.A.,Boti,j.b.,Casanova.**2007.Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé à la region de Tlemcen.
- **Akrroum, S.**2006.Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vica faba* L. Thèse de magister.Université de Constantine.87p.
- **Athamena, S.** 2009. Etude quantitive des flavonoïdes des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Thèse de magister. Université de Batna.88p.

B

- **Baynes, R.E et Hodgson, E.** 2010. Absorption and Distribution of Toxicants. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. *4th ed. John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 79-114.
- **Bekkara, A.F.,Bousmaha, L.,Taleb Bendiab, S.A.,Boti, J.B.,Casanova J.**2007.Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen.*Biologie & Santé*.**7** :6-11.

- **Boukeloua, A.2009.Characterisation** botanique et clinique et évaluation pharmacotoxicologique d'une préparation topique à base d'huile de Pistacia lentisca L.(Anacardiaceae).Thèse de magister.Université de Constantine.73p.
- **Boussahel, S.** 2011.Etude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Thèse de Magister. Université de Sétif.71p.
- **Bruneton, J.** 1999. Composés phénoliques shikimates-acétates. *In Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. Ed Tec &Doc lavoisier.* 3^{ème} édition. Paris. 1120p.
- **Bruneton, J.** 2009. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 4^{ème} édition. *Technique et documentation Lavoisier,* 267-273.

C

- **Claverie, I & Hedde, H.** 2008.Pharmacologie générale, mécanisme fondamentaux ,2^{ème} Edition Porphyр.pp :48-61.

D

- **Dalmas, V.,Brémond-Gignac, D., Douard, R.,Dupont, S.,Latrémouille, C.,Le Minor, J.M.,Pirro, N.,Sèbe, P.,Vacher C.,Yiou, R.**2009.In :Anatomie générale .Edition Elseiver Masson.pp :173.
- **Delaveau, P.** 1988.polyphénols et tannins dans l'alimentation .*cahier nutrition et diététique* **23**.137-139.
- **Djeddi S., Bouchenah N., Settar, I ;Skaltsa, H.D.** 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds.* **43**: 487-490.

E

- **Edeas, M.** 2004. Les polyphénols et les polyphénols du thé. *Phytothérapie* **5**: 264270.
- **Edoardo, M., Curcuroto, N-G & Ruberto,G** .2010. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochemical Systematics and Ecology* **38**: 659– 670.
- **El.Hilaly, J., Israili,Z.H., and Lyoussi,B.**2004.Acuteand chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology.***91**:43-50.

- **Eloutassi, N.** 2004.Elaboration de procédés biotechnologiques pour la valorisation du romarin (*Rosmarinus officinalis*) marocain. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Benabdellah Maroc. 121p.
- **Erkekoglu, P., Giray, B.K., Başaran, N.**2011. 3R Principle and Alternative Toxicity Testing Methods. *FABAD J. Pharm. Sci.*, **36**: 101-117.
- **Etuk, E.N.(2010).**Animals models for studying diabet mellitus.Agriculture And Biology Journal Of North Amrica.1(2).130-134.

F

- **Frutos P., Hervás G., Giráldez F., Mantecón A.** 2004.Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2 (2): 191-202.
- **Friedmann, R.B & Yong, D.S.**2001.Effects of disease on clinical laboratory tests.5th ed.AACC Press ,pp:22-30.

G

- **Gaw, A., Murphy, M.J., Cowan, R.A., O'Reilly, D.St.J.Stewart M.J,Shepherd J** .2004.Biochimie Clinique ;Edition Elseiver.pp:52-57.
- **Gérolani, R** .2007. Manifestations de l'action des toxiques au niveau hépatique. **In:** Toxicologie. **2nd ed.** *Lavoisier* (Paris), 167-172.
- **Gueguen, Y, Rouas C,Leblond, F.A** .2012.les biomarqueurs d'atteinte rénale *.Néphrologie & Thérapeutique* .**8** :146-155.
- **Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J.** 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. **111**: 476-482.

H

- **He-Lin T., Li-Shun W., Zhong-Xin X., Ru-Tong Z., Dong-Ling J & Jin-Sheng G.** (2010). Correlation Between Blood Glucose Level and Diabetes Signs in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Global Journal of pharmacology* 4(3):111-116.

- **Hennebelle, T.S., Sahbez,F.,Bailleul.**2004.polyphenols vegetaux,source ,utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.pharmacologie phytotherapie springer-verlag 1 :pp :3-6.
- **Hoefler, C.** 1994.Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus Officinalis* nottamtnt des jeunes pousses ; activités cholertiques, anti inflammatoires et diurétiques. Thèse de doctorat.Université de Metz. 146p.
- **Hodge, H.C and Sterner, J.H.** 1949. Tabulation of Toxicity Class. *Americans Industrial Hygien Association Quarterly*, **10**(4):93-96.
- **Hostettmann,K.** 2013. Les plantes anti-age.Neuchatel, U3a.1-12pp .

J

- **Jiang, Y.,Wu, N.,Fu, Y.J.,Wang, W.,Luo, M.,Zhao, C.J.,Zu, Y.J.,Liu ,X.L.**2011.chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology* .**32**: 63-68.

K

- **Kamtchouing,P.,Sokeng,S.D.,Moundipa,P.F.,Watch,P.,Jasta,H.B.,Lontsi,D.**1998. Protective role of *Anacardium Occidentale* extractagainst streptozotocininduced diabetes in rats.*Journal of Ethnopharmacology*.**62**:95-99.
- **Kirk, R., Wilhelmus,M.D.**2001.The Draize Eye Test. SURVEY OF OPHTHALMOLOGY.Ther Apentic Reviews.**45**:493-515.
- **Koolman, J et Roehm, K.H.** 2005.Color Atlas of biochemistry.*2nd Edition Thieme* .pp:336-337.

L

- **Lapointe, G.** 2004. Notions de Toxicologie. *2nd ed. Commission de la santé et de la sécurité du travail* (Québec, Canada), 16-20.
- **Lakmichi,H.,Bakhtaoui,F.Z.,Gadhi,C.A,Ezoubeiri,A.H.,Jahivi,Y.,El-mansouri,A.,Zrara,I and Loutfi.K.**2011.Toxicity profile of the aqueous ethanol root extract of *Corrigiola telefiifolia* pour (Caryophyllaceae) in rodents .*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.1-10.
- **Lhuillier, A.** 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker

(*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.

- **Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Chen, F & Jiang, Y.** 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102:771-77.
- **LU, F. C.** 1992. Toxicologie, Données générales ; procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Edition Masson, Paris, pp : 175-202.

M

- **Makhloufi, A.** 2009. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat. Université de Bechar. 78p
- **Marieb, E.N & Lachaine, R.** 2008. Biologie humaine. Edition Person, pp : 547-549.
- **Marchall, W et Bangert, S.K.** 2005. Biochimie médicale, physiologie et diagnostic. Edition Elsevier, pp : 59-99
- **Markham, K.R. (1982).** Technics of flavonoids identification. *Academic Press* (London) 2: 1-113.
- **Martin, S & Andriantsitohaina, R** .2002. Cellular mechanism of vasculo protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51: 304-315.
- **Mazza G & Miniati E.** 1992. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. CRC Press, 1st éditions, 30-34.
- **Milane, H.** 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres : étude et application thérapeutiques .Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur. 47- 49.
- **Miguel, M.G., Guerrero, C., Rodreignes, H., Brito, J.** 2007. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., effect of harvesting dates, growing media and fertilities. Conf. On energy. Environnement, Ecosystems and sustainable development. 66-70.
- **Morreno, F., Maria, E., Crespo, B., Zelinda, I., Saliva, B., Bichor, M.** 2000. Diabetes Insulin and high glucose modulation Of Phosphatase and reductase enzyme in the

human erythrocytes a comparative analysis in normal and diabetic states. *Research and clinical practice*. **47**:191-198.

- **Munne-Bosch S., Alegre L & Schwarz K** . 2000. The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis L.* Under Mediterranean Climate. *Eur Food Res Technol*. **210**: 263–267.

N

- **Naoki, S., Gumpei, Y., Haruyuki, T., Shinichi, E and Michiki U.** 2012. Animals models of diabetes mellitus for islet transplantation. Hindawi Public Corporation. 11pp.
- **Nassu, R.T., Guaraldo Goncalves, L.A., Azevedo Pereira da Silva, M.A., Beserra, F.J.** 2003. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science*. **63**: 43-49.
- **Newmann, D et Cragg, G.M.** 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. **70**: 461-477.

O

- **O'connell, J .E & Fox, P.F.** 2001. Significance and application of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products. *Dairy journal*. **3** :103-120
- **O.C.D.E. Organisation De Coopération Et Développement Economique n °425** .2008. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses.
- **O.C.D.E. Organisation De Coopération Et Développement Economique n °407** .2008. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Etude de toxicité orale a dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs.
- **Owen, P-L & Johns, T.** 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacologie* **64**:149-160.

P

- **Peng, Y., Yuan, J., Liu, F., Ye, J.** 2005. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **39**: 431-437.

- **Paramveer.D.S.,Chankal,M.,Paresh,M.,Rami,A.,Shrivastav,B.,Nema,R.K.**2010.Effective alternative methods of DL50 help to save number of experimental animals. *J. Chem. Pharm. Res.***2(6)** :450-445.
- **Petiwala, S.M., Puthenveetil, A.G., Johnson, J.J.**2013.polyphenols from the mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer.*frontiers in pharmacology.***4**:1-4.

Q

- **Quezel, P., Santa, S.** 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.

R

- **Rajiv Gandhi, G., Sasi Kumar,P** .2012. Antidiabetic effect of *Marremia emerginate*burn.F.in streptozotocine induced diabetic rats.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine: 281-286.
- **Ramé A et Thérond S.** 2007.Anatomie et physiologie .Edition Elsevier Masson.pp :201-254.
- **Reichi, F.X.** 2004.Toxicologie générale.Dans « Guide pratique de toxicologie ». 2^{ème} édition De Boeck,pp :6.
- **Rhiouani, H., El-Hilaly, J.,Israil,Z.H and Lyoussi,B.**2008.Acute and sub-acute toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Heriavia glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology.***118**:378-386.

S

- **Sava, C., Sirbu, R., Dumitrescu, C.** 2006. Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels. *Scientific study & research* .**4** :785-798.
- **Schalbert,A.,Morand,C.,Rémésy,C.**2002.Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.*Biomed Pharmacother.***2**:276-282.
- **Sharp, E. P., La Regina, C. M.** 1998. The laboratory RAT., ISBN 0-8493-2565-1, pp 29
- **Silbernagl, S et Despopoulos, A.** 2008.Nutrition et digestion.Dans « Atlas de poche de physiologie ».Médecine Sciences Publication.4^{ème} édition.pp :212-216.
- **Silberfeld T.**2012.Biologie végétale.*Abeilles & Fleurs.*735.

- **Stoclet, J-C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M-H., ElBedoui, J., Chataigneau, M &Schikini-Kerth, V.** 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* **500**: 299-313.

T

- **Teuscher, E., Anton,A et Lobestesein,A.**2005.Plantes aromatiques :épices, aromates, condiments et huiles essentielle. *Edition ; TEC & DOC*, Paris, pp : 343.
- **Tsao, R.** 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231-1246.

V

- **Vergé, S., Soulet S., Lacan, F., Mas, T., Arnaudinaud, V., Nay B., Castagnino C., Delaunay J-C., Chèze C., Monti J-P., Deffieux G., Mérillon J-M., Nuhrich A &Vercauteren J.**1999. Les polyphénols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **138**: 75-90.
- **Verma, S.R.,Rahman, L.U.,Mishra, S.,Verma, R.K.,Chauhan, A.,Singh A.**2011. Changes in essential oil content and composition of leaf and leaf powder of *Rosmarinus officinalis* cv. CIM-Hariyali during storage. *Maejo Int. J. Sci. Technol.***5** (02):181-190.
- **Viala A et Botta A.** 2005..Notions sur la toxicologie. **In: Toxicologie. 2nd ed.** *Lavoisier* (Paris) ,1026-1037.

W

- **Wang, W., Wu, N., Zu Yand Y Fu.** 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry.* **108**, 1019-1022.
- **Wattiez, A.S.,Dupuis ,A.,Courteix,C.**2012.Le rat STZ-diabétique :modèle adapté à l'étude de la neuropathie diabétique douloureux ?.*Douleur anal.***25** :38-45.
- **Wissemann, H.** 1999. The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proceeding and Nutrition Society.* **58**: 139-146.

Z

- **Zeghab, N.** 2009. Etude de contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de magister. Université Mantouri Constantine. 84pp.

Glossaire

Glossaire

- ❖ **Anti inflammatoire** : Traiter une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent telles que les manifestations rhumatismales, les fractures, les stomatites et les lésions génitales et urinaires.
- ❖ **Antioxydant** : Lutte contre le stress oxydatif, protège la cellule d'une oxydation par les radicaux libres et empêche l'altération des composés organiques.
- ❖ **Capsule de Bowman** : est un sac en forme de coupelle, au début de l'élément tubulaire d'un néphron dans le mammifère rénale qui effectue la première étape de la filtration du sang pour former l'urine.
- ❖ **Catabolisme** : est la succession de procédés chimiques qui aboutissent à la dégradation des composés moléculaires absorbés par l'organisme dans le but de générer de l'énergie.
- ❖ **Cellules de Kupffer** : Sont les macrophages spécifiques trouvés dans le foie et notamment dans le lobule hépatique où elles sont très nombreuses (jusqu'à environ 30 % de toutes les cellules hépatiques chez l'être humain). Elles bordent les vaisseaux capillaires sinusoides qui irriguent et drainent le foie.
- ❖ **Cétogenèse** : Voie métabolique de métochondrie permettant la transformation des acétyl-coenzym A exédentaires en corps cétonique.
- ❖ **Cétotoxicité** : est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.
- ❖ **Dicotylédones** : Plantes angiospermes (plantes à fleurs) dont la graine contient deux cotylédones.
- ❖ **Endothélium** : Tissu formé de cellules plates et constituant le revêtement interne du cœur et les vaisseaux.
- ❖ **Epithélium** : Sont des tissus constitués de cellules étroitement juxtaposées (ou jointives), sans interposition de fibre ou de substance fondamentale (en microscopie optique, ce qui les distingue des tissus conjonctifs). Les cellules sont associées les unes aux autres grâce à des jonctions intercellulaires.
- ❖ **Glomérule** : Constitue le principal filtre du néphron et il est situé dans la capsule de Bowman. le glomérule est semi-perméable, laissant passer l'eau et les déchets solubles, pour qu'ils soit excrétés hors de la capsule de Bowman sous forme d'urine.

- ❖ **Glycogène** : Le glycogène est un polysaccharide constitué d'une longue chaîne de plusieurs molécules de glucose. Le glycogène est la forme de réserve du glucose et est stocké principalement dans le foie et les muscles.
- ❖ **Hémolyse** : Destruction normale ou pathologique des hématies (globules rouges).
- ❖ **Hépatocytes** : Sont des cellules polyédriques à noyau clair contenant un ou deux volumineux nucléoles. Leur cytoplasme à un aspect granuleux. Les plages les plus basophiles correspondent à des amas de réticulum endoplasmique rugueux et les plages claires à des enclaves glycogéniques ou lipidiques.
- ❖ **Lamiaceae (labiée)** : Famille de plantes dicotylédones de l'ordre des lamiales.
- ❖ **Lamiales** : Ordre des plantes de la classe des dicotylédones, comprenant la sauge, le romarin...etc.
- ❖ **Métabolisme** : est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre aux stimulus de son environnement.
- ❖ **Néoglucogenèse** : La synthèse de glucose à partir de précurseur non glucidique.
- ❖ **Parenchyme** : Tissu organique assurant le fonctionnement des glandes et des organes du corps humain.
- ❖ **Pétiole** : Du latin *petiolus* «petit pied » désigne la pièce foliaire, reliant le limbe à la tige.
- ❖ **Spermaphytes ou spermatophytes** : Plante à graines
- ❖ **Tératogénicité** : est un effet indésirable potentiel de certains médicaments : c'est la capacité de ces médicaments à provoquer des anomalies ou des déformations fœtales.
- ❖ **Toxicocinétique** : Étude du sort d'une substance toxique dans l'organisme. La quantité de substance qui agit avec l'organisme pour causer un effet néfaste dépend de quatre facteurs biologiques principaux qui sont : l'absorption, la distribution, le métabolisme (ou la biotransformation) et l'excrétion.
- ❖ **Travées de Remak** : Sont des travées cellulaires d'hépatocytes, les cellules du foie ; ces travées sont rayonnantes à partir du lobule occupé par une veine, la veine centrolobulaire.
- ❖ **Xénobiotique** : substance possédant des propriétés toxiques même à faible concentration. En toxicologie, substance étrangère au consommateur qui peut causer des troubles plus ou moins importants. Ce sont des polluants, des contaminants et des résidus de produits agrochimiques et vétérinaires.

Annexes

Annexes 1

Matériel utilisés

- Appareil photo SONY DIGITAL STILL CAMERA
- Agitateur (VELP scientifica),
- Balance de précision (RADWAG),,
- Etuve (MMM-Group),
- Micropipettes,
- Microtome (Leica),
- pH- mètre (Martini instruments),
- Spectrophotomètre (UNICO),
- Trousse à dissection contenant,des aiguilles,des pinces hémostatiques,la sonde cannelée,la paire de ciseaux fins,de gros ciseaux,aiguilles de fixation ect,
- Vortex (VELP scientifica).

Produits utilisés

- Acide gallique,
- Carbonnate de soduim (Ca_2CO_3),
- Trichlorrure d'Aluminium (AlCl_3),
- Ether de pétrol,
- Formol à 10%,
- Méthanol,
- Quercétine,
- Réactif de follin-cioccalteu.

Annexe 2

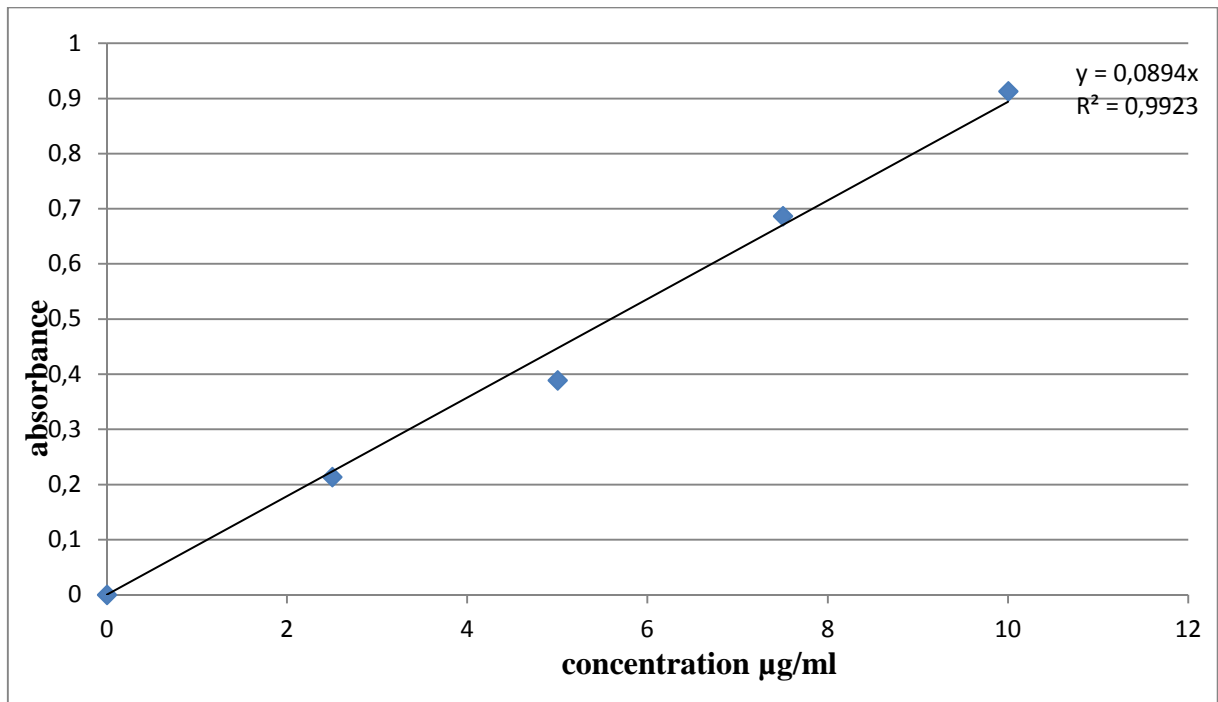


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

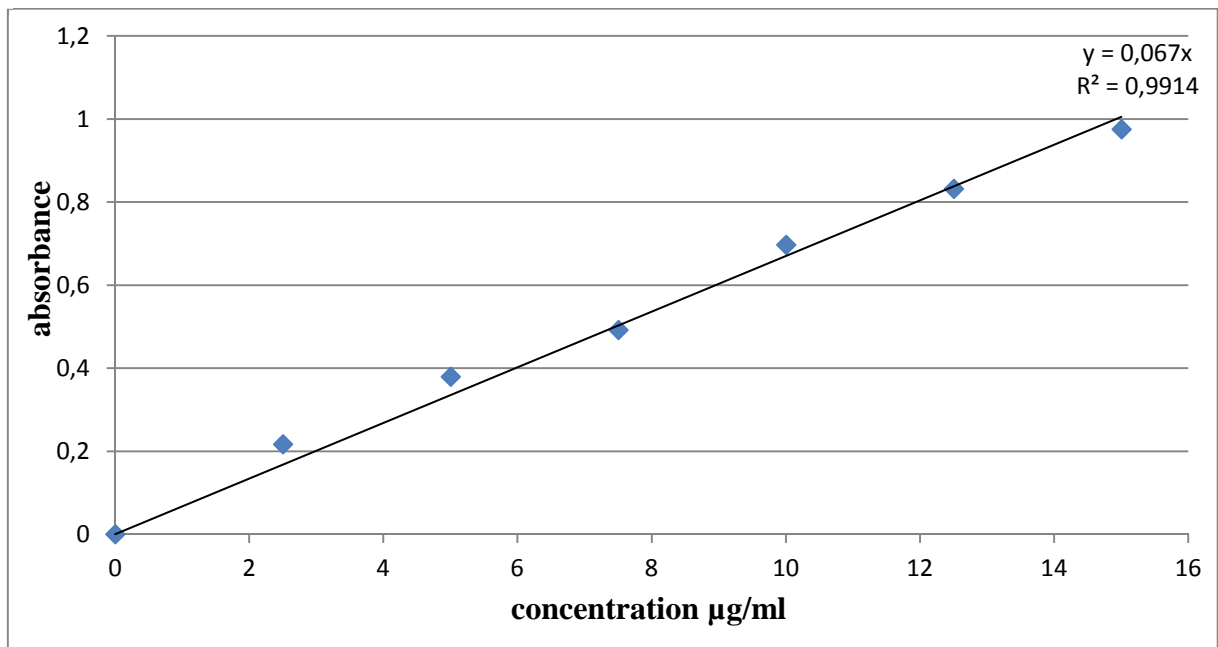


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe 3

➤ **Préparation de l'eau physiologique (NaCl 0.9%)**

900 mg de sel NaCl dissoute dans 100ml de l'eau distillé.

➤ **Préparation de formol à 10%**

87 ml de l'eau distillé

13 ml de formol pure

Résumé

Rosmarinus officinalis communément appelée romarin, c'est une plante aromatique de la famille des Lamiacées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, et anti-oxydantes, fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, et agro-alimentaires.

L'étude de la toxicité des poly-phénols de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur des souris Swiss albinos femelles, basée sur les tests suivant ; toxicité aigue, toxicité sub-chronique , l'effet préventif de l'extrait contre le diabète induit par la streptozotocine ,n'a révélé aucun signe de toxicité après l'évaluation du poids corporel, la pesée des organes, et l'étude histopathologique.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, Toxicité aigue, subchronique,, poly-phénols, extrait méthanolique

Abstract

Rosmarinus officinalis commonly called rosemary is an aromatic plant in the family Lamiaceae, valued for its aromatic properties and anti-oxidant, is the subject of recent research in the pharmaceutical and agro-food.

The study of the toxicity of the polyphenols of the methanol extract of *Rosmarinus officinalis* on female albino Swiss mice, based on the following tests; acute toxicity, sub-chronic toxicity, the preventive effect of the extract against diabetes induced by streptozotocin, showed no signs of toxicity after the evaluation of body weight, organ weight, and histopathologic study.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, acute toxicity, subchronic, poly-phenols, methanol extract