

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N°d'ordre :.....

Série :.....

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Magister

En Chimie Organique

Option

Phytochimie

Intitulé :

**CARACTERISATION PHARMACOTOXICOLOGIQUE ET ETUDE
PHYTOCHIMIQUE DE : *Centaurea dimorpha*.**

Par

Mr : ABABSA Zine el abidine

Devant le Jury :

Président :	Mr. A. Belattar	Prof.	Université de Constantine
Rapporteur :	Mr. K. Medjroubi	Prof.	Université de Constantine
Examineurs :	Mr. S. Akkal	Prof.	Université de Constantine
	Mr. R. Benkniouar	M. C.	Université de Constantine

Juin 2009

Remerciements

Je remercie le professeur: K Medjroubi, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et d'avoir accepté d'encadrer mon travail.

Je remercie le professeur : A.Belattar qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier aussi le professeur: S .Akkal, pour son soutien, son aide scientifique et technique, et pour son acceptation de juger ce travail.

Je remercie Mr: R .Benknioir d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Mr : A .Menad, professeur au sein de la faculté de Biologie, Université Mentouri-Constantine, pour ses efforts lors de la réalisation de la partie biologique de ce travail.

Je remercie Mr : H. Laouar, maître de conférences au sein du département de biologie de l'université Ferhat Abbas de Sétif, pour son aide et ses disponibilités surtout dans la phase de l'identification des plantes.

Je remercie Mr : M. Kaabache, docteur au sein du département de biologie de l'université Ferhat Abbas de Sétif, pour son aide et ses connaissances botaniques.

Je remercie Mr : Y. Hamdi pacha, professeur au sein du département de biologie, université de Constantine, pour ses attributions à ce travail, et ses orientations, surtout lors de la réalisation des tests biologiques au niveau de son laboratoire.

Je remercie mon professeur, Mr : L.Djarri, pour ses orientations et ses précieux conseils

Je remercie infiniment la doctorante: S .Azzouzi pour tout ce qu'elle m'a apporté, transmis et appris lors de ce travail.

Je remercie vivement la doctorante: S. Louaâr, pour ses précieux conseils et ses disponibilités.

Sans oublier de remercier le doctorant mostapha et la magistérante nadjah pour leur énorme contribution et leur soutien moral qu'ils m'avaient apporter afin de mener à bien ce travail.

Je remercie infiniment Mr : A .Chaterbache et Mr : A. HANNI pour leur énorme aide et soutien surtout lors de la rédaction de ce mémoire.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	11
----------------------------	----

CHAPITRE I

LES FLAVONOÏDES

I.1. Introduction.....	13
Flavonoïdes, Distribution, Classification	14
I.2.1. Classification des flavonoïdes selon la composition chimique	15
I. 3. Les propriétés pharmacologiques et toxicologiques des flavonoïdes.....	17
I. 3. 1. Les flavonoïdes et la santé	17
I. 3. 2. Quelques activités pharmacologiques des flavonoïdes.....	19
I. 3. 2. 1. L'activité antioxydante des flavonoïdes :.....	19
I. 3. 2. 2. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes :.....	20
I. 3. 2. 3. L'inhibition des enzymes :.....	21
I. 3. 2. 4. Autres activités des flavonoïdes :.....	22

CHAPITRE II

ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOÏDES

II. 1. Analyse structurale des flavonoides.....	23
II. 1. 1. Méthode chromatographique.....	23
II. 1. 2. Méthodes spectroscopique	25
A. Spectrophotométrie UV -Visible	25
B. Spectroscopie RMN ¹ H :.....	30
C. Spectroscopie RMN ¹³ C.....	32

CHAPITRE III

GENERALITES SUR LA PHARMACOTOXICOLOGIE

III. 1. Définition de la toxicologie.....	33
III. 2. Définition d'un poison ou un toxique.....	34
III. 3. Le toxique et l'organisme.....	34
III. 3. 1. La voie respiratoire (inhalation).....	35
III. 3. 2. La voie cutanée (peau).....	36
III. 3. 3. La voie orale (ingestion)	36
III. 3. 4. Les autres voies.....	36
III. 4. Le cheminement d'un toxique dans l'organisme.....	37
III. 4. 1. L'entrée (ou l'absorption).....	38
III. 4. 2. Le transport et la distribution (ou la répartition)	39
III. 4. 3. La biotransformation (ou le métabolisme).....	39
III. 4. 4. L'excrétion	39
III. 5. L'effet toxique.....	40
III. 5. 1. L'effet toxique	40
III. 5. 2. La survie et l'évolution d'un effet toxique	41
III. 5. 2. 1. La notion d'exposition.....	41
III. 5. 2. 2. L'atteinte toxique.....	41
III. 5. 2. 3. La gravité de l'intoxication.....	42
III. 5. 2. 4. Les effets fonctionnels et lésionnels.....	42
III. 5. 2. 5. Les organes cibles.....	43
III. 5. 2. 6. La réversibilité et l'irréversibilité.....	43
III. 5. 2. 7. La spécificité de l'intoxication.....	43
III. 5. 3. La classification des effets toxiques.....	44
III. 6. La relation entre la dose et l'effet toxique.....	44
III. 7. Les facteurs qui influencent les effets toxiques.....	45
III. 7. 1. La toxicité.....	45
III. 7. 2. L'individu.....	45
III. 7. 3. L'environnement.....	46
1 Toxicité par administration unique : Toxicité aiguë.....	48
2 Toxicité par administration répétée : toxicité sub-aiguë et chronique.....	48

III. 8. L'évaluation d'un effet toxique	49
III. 8.1. La toxicité aiguë.....	51
III. 8.2. La toxicité chronique.....	53
III. 9. Principales manifestations toxiques	53
III.9.1. Description des manifestations selon différents types d'effets toxiques.....	53
III. 9. 1. 1. L'irritation et la corrosion.....	53
III. 9. 1. 2. La cancérogénicité (effet cancérogène).....	55
III. 9. 1. 3. La mutagénicité (effet mutagène).....	58
III. 9. 1. 4. L'allergie (la sensibilisation).....	59
III. 9. 1. 5. Les effets sur la reproduction et le développement.....	61
III. 9. 2. Description des manifestations par systèmes biologiques et organes	
Cibles.....	62
III. 9. 2. 1. L'hépatotoxicité.....	63
III. 9. 2. 2. La néphrotoxicité.....	63
III. 9. 2. 3. La neurotoxicité.....	63
III. 9. 2. 4. La dermatotoxicité.....	64
III. 9. 2. 5. La toxicité de l'appareil respiratoire.....	64
III. 9. 2. 6. La toxicité cardiovasculaire.....	65
III. 10. Toxicité des flavonoïdes	65

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE

IV. 1. L'étude chimique de l'espèce: <i>Centaurea dimorpha</i>	66
IV. 1. 1. La matière végétale.....	66
IV. 1. 2. Description botanique de la plante.....	66
IV. 1. 3. Place dans la systématique.....	66
IV. 2. Extraction.....	67
IV. 3. Séparation chromatographique de l'extrait CH ₂ Cl ₂	69

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

V. 1. Elucidation des produits.....	72
V. 1. 1. Elucidation du produit F ₁₉ B.....	72
V. 1. 1. 1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton.....	72
V. 1. 1. 2. Le comportement chromatographique du produit F ₁₉ B.....	73
V. 1. 1. 3. La spectroscopie UV-Vis du produit F ₁₉ B.....	72
V. 1. 2. Elucidation du produit F ₁₉ A.....	75
V. 1. 2. 1. La spectroscopie RMN ¹ H du produit F ₁₉ A.....	75
V. 1. 2.2. Le comportement chromatographique du produit F ₁₉ A.....	75
V. 1. 2. 3. La spectroscopie UV-Vis.....	76

CHAPITRE VI

TESTS BIOLOGIQUES

VI. Tests Biologiques des extraits des espèces <i>Centaurea dimorpha</i> , <i>Centaurea pullata</i> et de <i>Centaurea niceansis</i>	78
VI. 1. Etude de la toxicité de l'extrait chloroformique de l'espèce <i>Centaurea dimorpha</i>	78
VI. 1. 1. Animaux utilisés.....	78
VI. 1. 2. Procédure expérimentale.....	78
VI. 1. 3. Le stade d'observation.....	78
VI. 1. 4. Les résultats pharmacotoxicologiques (les signes cliniques sur les souris).....	79
VI. 2. Etude de l'activité antibactérienne des l'extraits d'acétate d'éthyle des espèces : <i>Centaurea pullata</i> et de <i>Centaurea niceansis</i>	81
VI. 2. 1. Protocole expérimentale.....	81
VI. 2. 2. Résultats des essais sur l'activité antibactérienne.....	81
Conclusion générale.....	83
Références bibliographiques.....	84
Annexes.....	91
Résumés.....	98

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes classes de flavonoïdes.....	16
Tableau 02 : L'évidence épidémiologique des effets des flavonoïdes consommés alimentairement sur la santé.....	18
Tableau 03 : Préviation de la structure à partir de la fluorescence sous lumière de Wood.....	23
Tableau 04 : Relation R_f et structure flavonique.....	24
Tableau 05 : Les déplacements observés dans la présence des réactifs ajoutés.....	29
Tableau 06 : Déplacement et multiplicité des protons du noyau A.....	30
Tableau 07 : Déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B.....	31
Tableau 08 : Effets toxiques sur certains tissus et systèmes biologiques.....	41
Tableau 09 : Gravité d'un effet toxique.....	42
Tableau 10 : Interactions possibles entre certains produits chimiques.....	47
Tableau 11 : Les formes d'intoxication.....	50
Tableau 12 : Principaux effets liés aux différents stades du développement humain.....	62
Tableau 13 : Les fractions obtenues	70
Tableau 14 : Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO) du produit $F_{19}\text{B}$	72
Tableau 15 : Comportement chromatographique du produit $F_{19}\text{B}$	73
Tableau 16 : Résultats de la spectroscopie UV-Vis du produit $F_{19}\text{B}$	74
Tableau 17 : Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) du produit $F_{19}\text{A}$	75

Tableau 18 : Comportement chromatographique du produit F ₁₉ A.....	75
Tableau 19 : Résultats de la spectroscopie UV du produit F ₁₉ A.....	76
Tableau 20: Signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant le 1 ^{er} jour après traitement aigu du produit F ₁₉ B.....	79
Tableau 21: Signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant les 13 jours restants après traitement aigu du produit F ₁₉ B.....	79
Tableau 22: Signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant le 1 ^{er} jour après traitement aigu du produit F ₁₉ A.....	80
Tableau 23: Signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant les 13 jours restants après traitement aigu du produit F ₁₉ A.....	80
Tableau 24: Résultats des tests sur l'activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle des espèces : <i>Centaurea pullata</i> et de <i>Centaurea niceansis</i>	82

Liste des figures

Fig 01 : Benzol γ -pyrone.....	14
Fig 02 : Réaction des flavonoides après addition de NaOAc et NaOAc+H ₃ BO ₃	26
Fig 03: Les complexes stables entre flavonoïdes et AlCl ₃	28
Fig 04 : Les voies d'absorption usuelles.....	35
Fig 05 : Cheminement d'un produit dans l'organisme.....	38
Fig 06 : Les différents types d'études.....	50
Fig 07 : Détermination de la dose létale 50 (DL 50).....	52
Fig 08: Irritation et corrosion de la peau.....	54
Fig 09 : Irritation et corrosion des yeux.....	55
Fig 10 : La cancérogénicité.....	57
Fig 11 : L'effet mutagène.....	58
Fig 12 : La sensibilisation.....	60
Fig 13: Protocole d'extraction de la plante « <i>Centaurea dimorpha</i> ».....	68
Fig 14 : Structure chimique du produit F ₁₉ B.....	74
Fig 15 : Structure chimique du produit F ₁₉ A.....	77
Fig 16 : Spectre RMN ¹ H (400MHz, DMSO) du produit F ₁₉ B	91
Fig 17 : Spectre HSQC (400 MHz, DMSO) du produit F ₁₉ B.....	92
Fig 18 : Spectre COESY (400 MHz, DMSO)du produit F ₁₉ B	93
Fig 19: Spectres UV-Vis du produit F ₁₉ B.....	94
Fig 20 : Spectre RMN ¹ H (400MHz, CD ₃ DO) du produit F ₁₉ A	95
Fig 21: Spectres UV-Vis du produit F ₁₉ A.....	96

Introduction générale

Dans le monde des vivants, les plantes occupent une partie primordiale, ceci a poussé l'homme à les exploiter dans la nutrition et la médecine.

L'efficacité des plantes médicinales est due aux produits synthétisés par le métabolisme secondaire naturel qui se fait au niveau des cellules et des tissus de ces Plantes.

La richesse verte et vierge de notre pays l'Algérie, avec sa grande diversité, a poussé les chercheurs algériens à les étudier et les analyser qualitativement et quantitativement, pour explorer la grande Flore algérienne. Dans ce cadre vient notre travail, qui présente la continuité de ce qui a été réalisé dans notre laboratoire, qui a étudié plusieurs types de plantes Algériennes, et spécialement le genre *Centaurea*; qui sont des plantes piquantes de la famille *Compositae*, cette dernière englobe 1000 genres et plus de 25000 espèces (1).

Les plantes du genre ont été le but de plusieurs études phytochimiques, qui ont abouti à la séparation de différents produits, comme: les hydrocarbures non saturés (2-3), les graisses (4), et parmi les produits du métabolisme secondaire de ce genre qui ont été séparés on trouve: les Flavonoïdes (5) et les sesquiterpènes (6-7).

Le choix de l'espèce est basé sur des critères chimiques et biologiques; sur le plan chimique, le genre *Centaurea* est riche en composés Flavonoïques, et une diversité en Lactones sesquiterpènes. Sur le plan biologique; ce genre est connu par ses propriétés médicales et pharmaceutiques pour lesquelles, il est utilisé pour faire guérir différentes maladies (8).

Le but de ce travail est concentré sur deux points:

- 1- Extraction, étude et détermination de la structure des composés flavonoïques.
- 2- Etude de la toxicité de ces produits flavonoïques.

Après avoir séparé et identifié les deux flavonoïdes F₁₉B et F₁₉A à partir de l'extrait chloroformique de l'espèce *Centaurea dimorpha*, puis les tester in vivo pour connaître leurs propriétés toxicologiques, il nous a paru important d'étudier les autres extraits du même

genre *Centaurea* avec deux autres espèces qui sont : *pullata* et *niceansis* ; d'où le but est de réunir plus d'informations sur ce genre.

I.1. Introduction

Le mot « flavonoïde » a été introduit en 1952 par HINREIER pour désigner tous les pigments ayant un squelette C₆-C₃-C₆ analogue à celui des flavones, lui-même dérivant du Latin *flavus* qui signifie jaune [9].

Les flavonoïdes sont presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aures, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigment : tel est le cas des flavones et des flavonols incolores co-pigmentant et protégeant les anthocyanosides [10].

Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen, condition de la survie de l'espèce végétale [10].

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet.

I.2. Flavonoïdes, Distribution, Classification

L'étude des Flavonoïdes a suscité notre intérêt, du fait de leur intérêt pharmacologique, de leurs nombreuses implications dans des domaines biologiques et de leur diversité structurale (plus de 4000 structures flavoniques identifiées à l'heure actuelle) [11].

Ils constituent l'un des grands groupes de phénols, et sont des constituants caractéristiques des plantes vertes à l'exception des algues [12].

On signale qu'environ 2% du carbone photosynthétique global sont incorporés dans la biosynthèse flavonique [11-12].

Abondants dans les plantes supérieures, on les rencontre essentiellement dans les feuilles et les fleurs. Mais ils sont également signalés dans les racines, le bois, l'écorce, le pollen, le nectar, les baies et les grains [12]. Leur concentration dans la cellule végétale excède souvent $1\mu\text{M}$ [13].

Très répandus dans les végétaux, les flavonoïdes existent sous forme de combinaisons, les plus fréquentes étant les hétérosides [9]. Ainsi, les flavonoïdes glycosylés se trouvent principalement dans les vacuoles et leurs aglycones sont présents dans les zones lipophiles, comme les glandes (à sécrétion) huileuses ou les couches de cire [13], telles les glandes de l'odorat du castor, la propolis (abeilles à sécrétion), et les ailes des papillons. Quant à leurs aglycones O-méthylés on les trouve dans le cytoplasme [14].

On peut les rencontrer aussi dans les chloroplastes des feuilles des plantes supérieures [15]. Comme il est possible de les localiser fixés sur les héli-cellules des parois cellulaires [16].

Les génines sont des dérivés polyhydroxylés, parfois méthoxylés ou méthylés de la chromone ou benzol γ -pyrone, Fig. 1 [17].

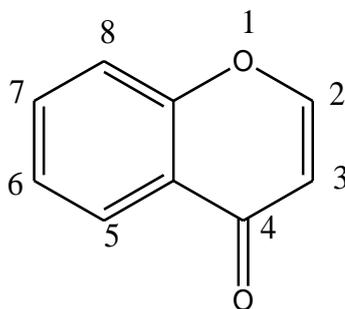


Fig 01 : Benzol γ -pyrone

I.2.1. Classification des flavonoïdes selon la composition chimique

Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées ci-dessus, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C₅-C₇ et C₄.

a- Flavones, Flavonols

Ces molécules représentent la majorité des flavonoïdes connus. Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et en C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C₄ [10].

b- Flavanones et dihydroflavonols

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie.

Dans les Flavanones naturelles, le carbone C₂ est normalement de configuration (2S). Si, pour les dihydroflavonols, quatre isomères sont théoriquement possibles, la presque totalité des composés de la série connus à ce jour sont de configuration 2R ou 3R, le phényle et l'hydroxyle étant en *trans* [10].

c- Biflavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones, très réactifs, C₆ ou C₈. La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavanones [10].

d- Chalcones, aurones

Les chalcones, dépourvus de l'hétérocycle central, sont caractérisés par la présence d'un chaînon tri-carboné cétonique dont la liaison α - β est insaturée [10].

e- Les anthocyanes

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, et bleu en milieu basique : ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. Ils ont une structure C₆-C₃-C₆ dans laquelle l'élément en C₃ est sous forme d'ions pyrilium, alors que l'oxygène a une structure oxonium ionique. Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidique [10].

Tableau 01 : les différentes classes de flavonoïdes.

CLASSES		Nom de la famille	Nom	Hydroxylation
Dérivés	Structure			
Phenyl-2-chromone		Flavone Flavonol Flavanone (C ₂ -C ₃ liaison simple)	Apigénine Myricétine Butine	5, 7, 4' 3, 5, 7, 3', 4', 5' 7, 3', 4'
Phenyl-2-chromone		Catéchines (flavanols-3)	Gallocatechine	5, 7, 3', 4', 5'
Phenyl-3-Chromone		Isoflavone	Genisteine	5, 7, 4'
Flavylium		Anthocyanidine	cyanidine	3, 5, 7, 3', 4'
Chalcone		Chalcone	Buteine	3, 4, 2', 4'
Aurone		Aurone	Aureusidine	4, 6, 3', 4'

I. 3. Les propriétés pharmacologiques et toxicologiques des flavonoïdes:

I. 3. 1. Les flavonoïdes et la santé :

Les flavonoïdes sont des composés non-nutritifs [18]. Un montant considérable de recherche a été orienté vers leur activité antioxydante et la propriété de fixation de plusieurs espèces oxydantes, ainsi que leurs propriétés anti-mutagéniques et anticancérigènes. Cependant, le grand intérêt a été donné à leur potentiel dans la prévention de maladies cardiovasculaires [19].

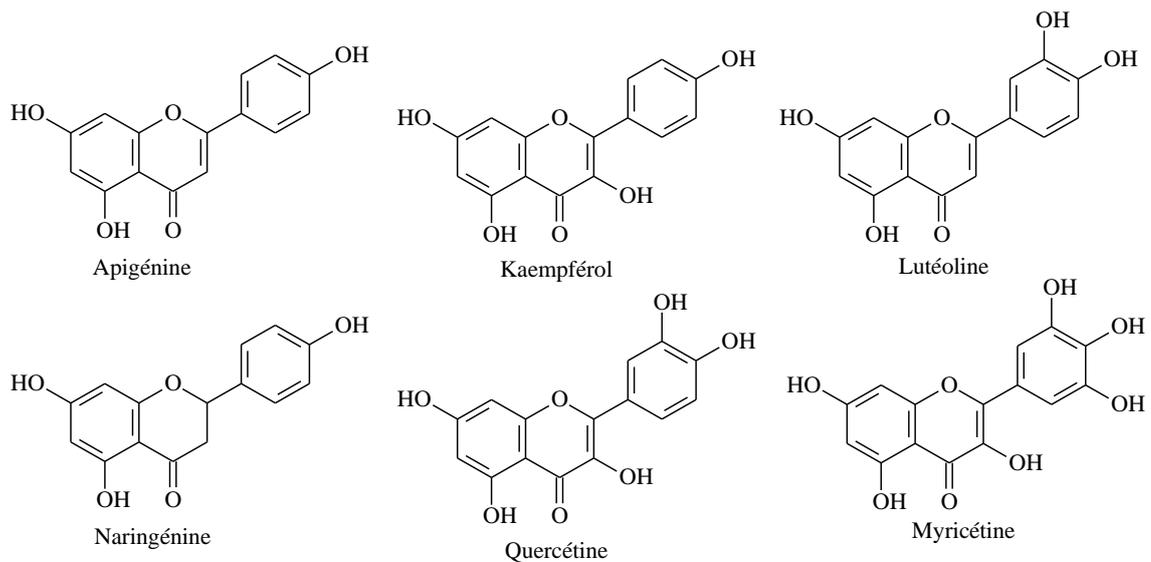
Le thé, les oignons et les pommes sont la principale source d'apport des flavonoïdes (le thé 48% de la prise totale, les oignons 29% et les pommes 7%) [20], par conséquent, les chercheurs concluent que la prise des flavonoïdes est le facteur le plus fortement lié à la diminution du risque de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires chez les sujets âgés.

Parmi les flavonoïdes dont les activités sont reconnues, on a les flavonols : la quercétine (Q), le kaempférol (K), la myricétine (M) et les flavones : l'apigénine (A) et la luteoline (L), existent dans 28 légumes et 9 fruits [21]. La quercétine est le majeur flavonoïde diététique (il est représenté par des prises de 16 mg/jour), suivi du kaempférol (4 mg/jour), myricétine (1,4 mg/jour), lutéoline (0,92 mg/jour) et enfin l'apigénine (0,69 mg/jour) [20]. Une étude épidémiologique de l'effet des flavonoïdes diététiques sur la santé (la consommation alimentaire des flavonoïdes) est rassemblée dans le tableau 02.

Ce tableau porte aussi, les rapports inverses entre les fruits et les légumes prises et le cancer des poumons [22], et entre la consommation de l'oignon et le carcinome de l'estomac (stomach carcinoma) [23], seulement un léger rapport préventif a été trouvé entre la consommation alimentaire des flavonoïdes et la mortalité du cancer [24]. Par contre, la mise en évidence de l'effet protecteur antioxydant des flavonoïdes dans la prévention des maladies cardiovasculaires, bien que ce ne soit pas concluant [25].

**Tableau 02 : L'évidence épidémiologique des effets des flavonoïdes consommés
alimentairement sur la santé [25,26].**

Les effets sur la santé	Le flavonoïde pris	Réf.
I-les maladies cardiovasculaires :		
✓ Risque réduit des maladies cardiovasculaires	Q, K, M, A, L	[27],
✓ "	Q, K, M, A, L	[28],
✓ "	Q, K, M	[29],
✓ "	Q, K, M, A, L	[30].
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et les maladies cardiovasculaires	Q, K, M, A, L	[31]
✓ Aucune association entre la quercétine prise et l'accident vasculaire cérébral	Q	[32]
✓ Augmentation du risque de la cardiopathie ischémique	Q, K, M	[33]
✓ Risque réduit de l'infarctus myocarde	Q, K, M, A, L	[27]
II- Cancer :		
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et le cancer	Q, K, M, A, L	[34],
✓ "	Q, K, M, A, L	[35]
✓ Aucune association entre le flavonoïde pris et le cancer des poumons	Q, K, M, L	[36]
✓ Relation inverse entre le flavonoïde pris et le cancer des poumons	Q, K, M, A, L	[37],
✓ Relation inverse entre le flavonoïde pris et le cancer de l'estomac	Q, K, M, L	[38]



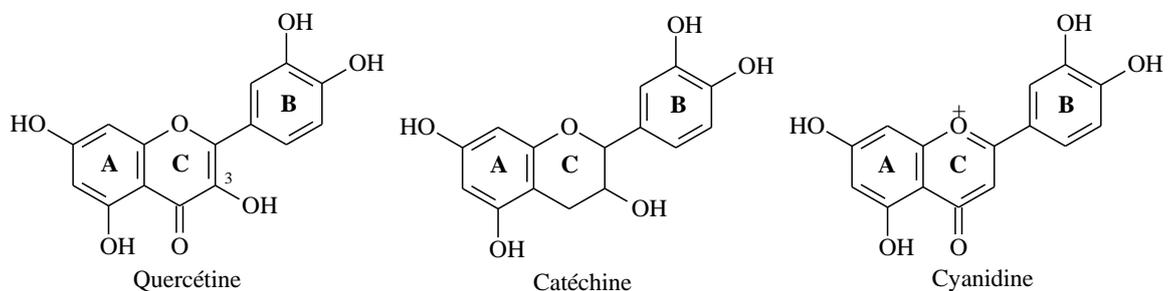
Les résultats positifs rassemblés dans le tableau (11), ont contribué à l'augmentation dramatique dans l'usage des plantes. Il faut signaler que la prise incontrôlée des flavonoïdes peut entraîner des activités pro-oxydatives ou mutagéniques, en outre l'inhibition des enzymes qui constituent la clé des métabolismes des hormones [39].

I. 3. 2. Quelques activités pharmacologiques des flavonoïdes :

I. 3. 2. 1. L'activité antioxydante des flavonoïdes :

Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes.

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certains rapports entre la structure flavonique et l'activité antioxydante. En outre, la comparaison entre la quercétine, la catéchine et la cyanidine démontre l'importance de la présence de l'hétérocycle (C) [40].



La présence du groupe hydroxyle 3-OH attaché à la double liaison $C_{(2)}=C_{(3)}$, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position $C_{(4)}$ est exigé

pour la grande efficacité de l'activité antioxydante [41]. Cette activité antioxydante atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle.

La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique annule l'activité antioxydante des flavonoïdes [42,43].

Dans la plupart des articles récents, l'activité antioxydante est mesurée, en utilisant le dosage de la peroxydation lipidique (LPO) [44]. Il existe une relation entre la structure flavonique, et l'inhibition de la peroxydation lipidique :

1. Le groupement hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle (C) [20] :

Il a été trouvé que les flavonoïdes possédant un groupement 3-OH libre tel que : la morine, la myricétine, la quercétine, (+)-Catéchine, la fisétine et d'autres ont une capacité inhibitrice plus grande comparé à ceux qui n'ont pas, tel que les flavones : la diosmétine, l'apigénine et les flavanones : l'héspertine et la naringénine.

2. La double liaison $C_{(2)}=C_{(3)}$ [20] : La réduction de cette double liaison réduit le potentiel antioxydant.

3. Dans certains cas, la présence du groupement carbonyle en $C_{(4)}$ de l'hétérocycle (C) est essentiel pour le potentiel antioxydant [20] : La catéchine a un potentiel antioxydant plus faible comparé à celui de la quercétine.

4. Le nombre des groupements hydroxyles [20] :

L'activité antioxydante des flavonoïdes augmente avec le nombre des groupes OH substitués sur le noyau B. La myricétine a une activité antioxydante plus grande que celle du kaempférol.

5. Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [20].

6. La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) [45].

7. Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison $C_{(2)}=C_{(3)}$ qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase (X.O.) et du radical peroxyde produit par ce dernier [46].

I. 3. 2. 2. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes :

Il est connu que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne [47], il est logique par conséquent, qu'ils soient des substances antimicro-biennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes [48,49].

Il a été montré que les composés flavoniques les moins polaires, c'est-à-dire les moins substitués par des groupes OH sur le noyau B, sont les plus actifs vis-à-vis des microorganismes [50], cela est renforcé par la découverte que la méthylation des flavonoïdes augmente l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* [51].

Dans le cas du méthicillin-résistant *S. aureus*, les chaînes aliphatiques latérales dans les flavones (dans la position 6 ou 8), rendent la molécule plus lipophile et augmentent son activité antimicrobienne comparé aux flavones non substituées [52]. Il a été montré avec la bactérie cariogénique (*Actinomyces viscosus* et *A. naeslundii*, several *Streptococci*) que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux A et B essentiellement (5-OH), plus une substitution aliphatique sur le noyau A, détermine l'activité antibactérienne des flavones [53]. Cependant, il a aussi été constaté que les flavonoïdes lipophiles (méthoxylés) n'étaient pas de bons agents protecteurs contre les microorganismes [54], cela est confirmé par le fait que les dérivés glycosylés de la quercétine et de la quercétagine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les microorganismes pathogéniques [55,56].

La présence des groupes hydroxyles libre dans les positions 3, 3', 4' et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [57], cela est supporté par le résultat de Puupponen-Pimiä et al. (2001), dans lequel ils ont testé l'activité antibactérienne de la myricétine contre la *Lactobacilli* et *E. coli* [58].

I. 3. 2.3. L'inhibition des enzymes :

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, qui réagissent avec les protéines, ainsi ils peuvent réagir avec les enzymes par des processus biologiques à l'intérieur des cellules [59].

Des expériences menées *in vitro* ont montré que les flavonoïdes inhibent plusieurs enzymes [60,61] tel que l'histidine carboxylase, l'élastase, l'aldose réductase, la lipooxygénase, la cyclooxygénase [62], l'hyaluronidase et la phosphodiérase [63].

Des testes sur plusieurs flavonoïdes ont montré leur capacité d'inhiber les enzymes clés de la respiration mitochondriale : la double liaison $C_{(2)}=C_{(3)}$ et la fonction cétone en $C_{(4)}$ ainsi que les groupes OH occupant les positions 3', 4' et 5' du noyau B sont des caractéristiques importantes de la forte inhibition du NADH-oxydase.

Cos et al. (1998), ont montré que les flavones ont une activité inhibitrice supérieure que celle des flavonols, et que les groupes hydroxyles en position C-3 et C-3' sont indispensables pour la propriété d'épuration des superoxydes.

I. 3. 2.4. Autres activités des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent aussi d'autres activités biologiques et pharmaceutiques, ils sont notamment : anti-allergiques [64], anti-inflammatoires [65,66], analgésiques [67], anti-influenzas [68], antifongiques [69], antivirales [70], on leur reconnaît également une activité anti-malaria [71].

II.1. Analyse structurale des flavonoïdes :

II. 1. 1. Méthode chromatographique :

L'examen des flavonoïdes en lumière ultraviolette est le plus utilisé pour l'identification et la détermination des différents types des flavonoïdes.

Tous les flavonoïdes apparaissent en UV sous forme de spots colorés, permettant de donner de donner des renseignements pour déterminer la structure du produit [41].

Tableau 03 : Prévion de la structure à partir de la fluorescence sous lumière de wood

La Coloration	Type de flavonoïdes
Jaune Pâle	Dihydroxyflavone
Jaune Fluorescent	Flavonol avec 3-OH libre, Aurone, Chalcones, Flavanones
Jaune Vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune Orange (fluorescent)	Flavonol avec OH ou OR en 3
Bleu Claire (fluorescent)	Flavone 5-O- substitué Flavonols avec OR en 3 sans OH en 5
Violet	5,4'-dihydroxyflavone Flavone 3-O substituée et 5-OH, 4'-OH 6-hydroxy ou 8-hydroxyflavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavonols, flavanones
Noir	5, 6, 7- trihydroxyflavonol 5, 7, 8- trihydroxyflavonol

Relation R_f structure :

La relation R_f - structure a été établie par BATE-SMITH et WESTALL [41].

R_f est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme le rapport entre la distance d parcourue par l'origine de la substance ayant migré et la distance D parcourue par l'origine et le front du solvant :

$$R_f = d/D$$

R_f est une valeur caractéristique d'un composé pour des conditions de chromatographie donnée (éluant, température). R_f est égale à 1, dans le cas de produit très solubles dans la phase mobile et insolubles dans la phase stationnaire. Inversement R_f est nul lorsque le produit est trop peu soluble dans la phase mobile.

Tableau 04 : Relation R_f et structure flavonique

Structure flavoniques	R_f
Augmentation des groupes hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux [42]
Glucosylation	R_f augmente dans les solvants aqueux R_f diminue dans les solvants organiques [42]
Méthylation des hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants aqueux et augmente dans les systèmes de solvants organiques [42]

II. 1. 2. Méthodes spectroscopique :

A. Spectrophotométrie UV –Visible :

Les flavonoïdes sont capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fractions chimiques responsables de cette absorption sont dites Chromophores. Les groupements chimiques comme l'hydroxyle et le méthoxyle sont susceptibles de modifier la couleur de base offerte par le chromophore. Ainsi l'effet bathochrome correspond à une modification de la structure moléculaire par addition de groupements chimiques auxochromes. L'étude de ces propriétés se fait par la spectrophotométrie UV –Visible qui est une méthode très importante pour la détermination des composés flavoniques. Son importance réside dans :

- l'utilisation des faibles quantités de produit.
- La facilité d'analyse
- L'obtention d'informations très importantes sur la position des hydroxyles sur le squelette flavonique.
- Le principe de cette méthode est basé sur le fait que chaque produit à un spectre d'absorption dans le méthanol et l'addition des réactifs provoque un changement dans ce spectre donne des indications précises sur le squelette flavonique [43].

a - Absorption dans le méthanol :

L'absorption ultraviolette des flavonols dans le méthanol neutre donne deux bandes :

- la bande I : apparaissant entre 320 et 380 nm correspondant à l'absorption du système cinnamoyle et faisant intervenir la conjugaison de groupement carbonyle C₄ avec le noyau B.
- la bande II : apparaissant entre 240-280 nm correspondant à l'absorption du système benzoyle.

b- Absorption en présence des réactifs :

L'utilisation des réactifs spécifiques permet d'indiquer la nature des substituent sur le squelette flavonique.

Présence de NaOH :

NaOH est une base forte, elle ionise tous les hydroxyles phénoliques de la molécule, ce qui indique un déplacement bathochrome de la bande I.

L'enregistrement du spectre en présence du NaOH ce fait en deux temps : instantanément, et après cinq minutes :

- un déplacement bathochrome de 45-65 nm de la bande I accompagné d'une stabilité de la densité optique qui confirme la présence d'un OH libre en 4'.
- Un déplacement bathochrome de 50-60 nm de la bande I accompagné d'une diminution d'intensité, indique la présence d'un OH en 3.
- La présence d'un hydroxyle libre en position 7 peut être confirmée par l'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm.

En présence de NaOAc et NaOAc+H₃BO₃ :

L'acétate de sodium NaOAc est une base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule 3, 7 et 4'. [44] Elle provoque un effet bathochrome de 5 à 20 nm, sur la bande II qui signal la présence d'un hydroxyle libre en 7.

L'addition d'acide borique en présence de l'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande I avec 12 à 13 n.m indique un système orthodihydroxyle.

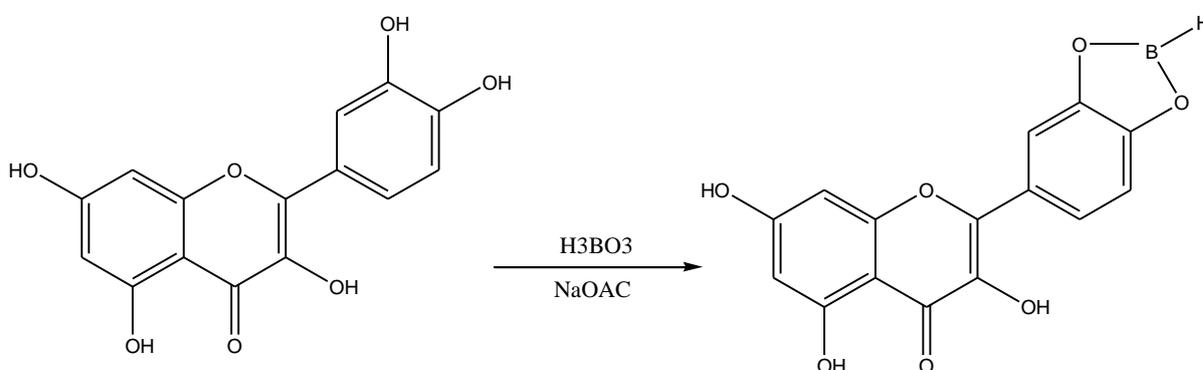


Fig 02 : réaction des flavonoides après addition de NaOAc et NaOAc+H₃BO₃

En présence de AlCl_3 et $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$:

La présence (ou absence) de système ortho dihydroxyle dans les flavonoïdes peut être déduit à partir de l'analyse de leur spectre dans le méthanol avant et après l'addition de chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique.

Dans ces cas la formation d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en 5 (ou en 3) et d'un complexe labile avec le système Ortho dihydroxyle sur les cycles A ou B [41].

L'utilisation de AlCl_3 pour la détection de groupement ortho dihydroxylé, se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique neutre.

L'addition de HCl permet de s'assurer de la stabilité du complexe formé. La présence d'un système orthodihydroxyle est observée, sur le spectre obtenu avec le AlCl_3 acidifié par un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm par rapport au spectre de AlCl_3 . Un déplacement hypsochrome de la bande I de 20 nm est significatif d'une Flavone tri -substitué sur le noyau B.

D'autre part, le spectre obtenue avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ donne un déplacement bathochrome de la bande I de 60 nm, ce qui indique la présence de OH libre en 3, et éventuellement en 5, un déplacement de cette bande de 35 à 55 nm signifié que l'hydroxyle en position 5 est libre.

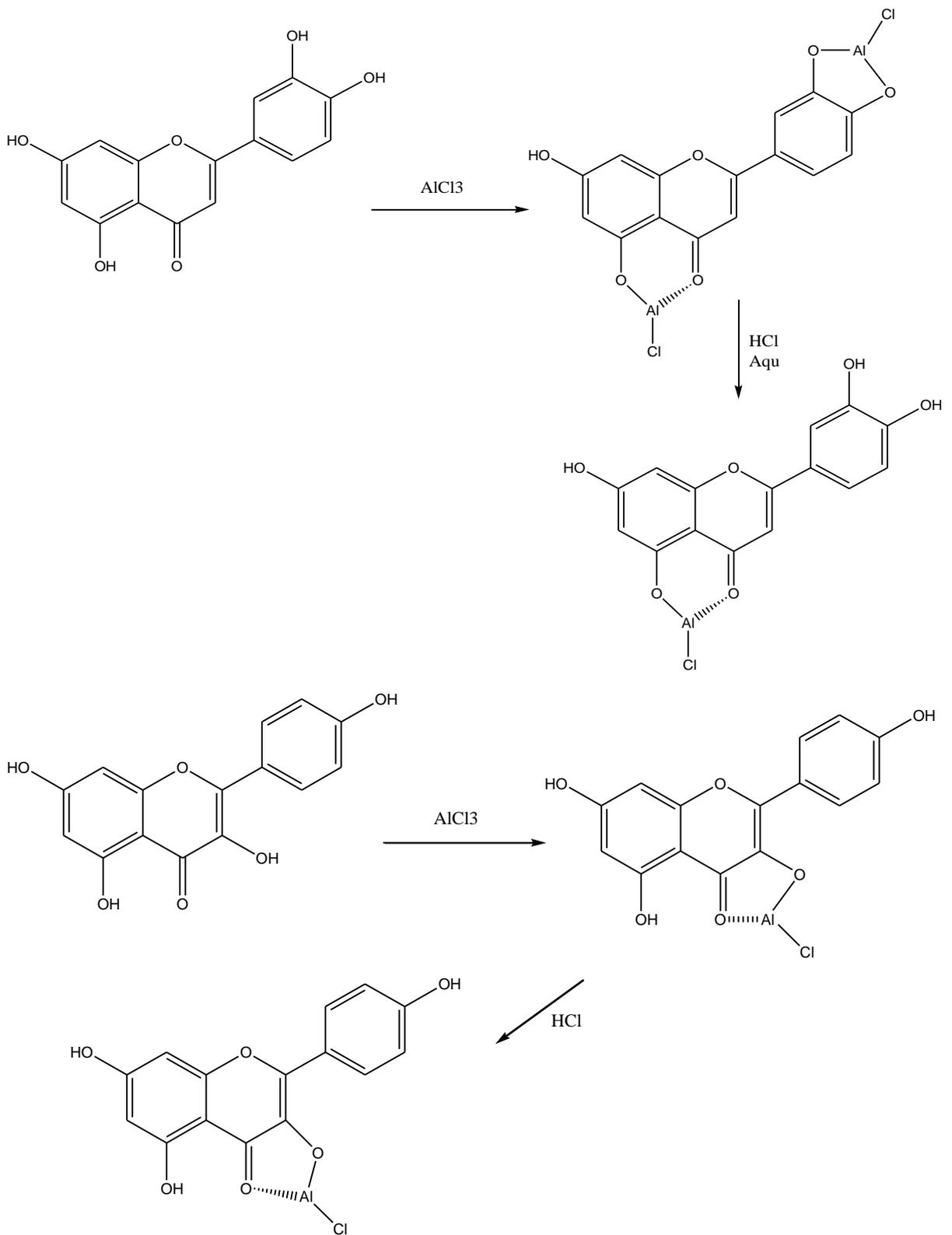


Fig 03: les complexes stables entre flavonoïdes et AlCl_3

Tableau 05 : les déplacements observés dans la présence des réactifs ajoutés

Réactif	Déplacement (n.m)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350 352-385 328-357	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol OR en 3
NaOMe (NaOH)	+45 à +65 1. stabilité d'intensité/MeOH 2. diminution d'intensité		OH en 4' OR en 4' et OH en 3
	L'intensité diminue avec le temps (décomposition)		3',4' OH ou ortho di -OH sur A ou ortho di OH sur B
	Nouvelle bande/MeOH entre 320 à 335		OH en 7
NaOAc		+5 à +20 Déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8	OH en 7
		Pas de déplacement ou très faible	OR en 7
		Spectre qui se décompose avec le temps	5, 6, 7-tri OH ou 5, 7, 8-tri OH
NaOAc+ H ₃ BO ₃	+12 à +36		Ortho di OH sur B
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430		Ortho di OH sur B avec 5-OH
MeOH/ AlCl ₃ + HCl	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6
	+35 à +55		5-OH et 3-OMe
	+50 à +60		OH en 3 avec ou sans OH en 5
AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)	-20 à -40 avec sommet ou épaulement entre (350-360)		Ortho di OH sur B
	-20 à -25		Ortho di OH sur A et Ortho di OH sur B ou tri-OH sur B.

(/) : Par rapport (+) : effet bathochrome (-) : effet hypsochrome

B. Spectroscopie RMN ¹H :

On utilise cette méthode dans l'analyse qualitative des flavonoïdes pour déterminer :

- Le nombre total de proton à partir de la courbe d'intégration.
- Le degré d'oxydation des noyaux A, B et C
- Le nombre des molécules de sucre et le type de liaison anomérique α et β entre le sucre et l'aglycone.
- Le nombre et la position de groupements méthoxyle dans le produit.

a. Proton aromatique :

- Proton du noyau A :

Selon les substitutions possible. Les résonances et les multiplicités des protons H₅, H₆ et H₈ sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 06 : déplacement et multiplicité des protons du noyau A

Flavonoïdes	H ₅ (δ =ppm) (J =Hz)	H ₆ (δ =ppm) (J =Hz)	H ₈ (δ =ppm)(J =Hz)
5-7 di -hydroxy	-	6.00-6.20 $J=2.5$ Hz	6.30-6.50 $J=2.5$ Hz
5-OH 7-hydroxy, glucoside	-	6.20-6.40 $J=2.5$ Hz	6.50-7.00 $J=2.5$ Hz
5, 6, 7-OR R=H, sucre	-	-	6.3 (s)
5, 7, 8-OR	-	6.3 (s)	-
7-OR R=H, sucre	8.00 $d J=9.0$ Hz	6.70-7.10 $dd J=9$ Hz et $J=2.5$ Hz	6.70-7.10 $d J=2.5$ Hz

- Proton du noyau B :

Le déplacement chimique est basé sur les substituent dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C

Tableau 07 : déplacement chimiques et multiplicité des protons du noyau B

Flavonoïdes	Déplacement chimique (ppm) H ₂ , H ₆ (J=8.5Hz)	Déplacement chimique (ppm) H ₃ , H ₅
4'-hydroxy Flavone	7.70-7.90 (<i>d</i>)	6.50-7.10 (<i>d</i>) J=8.5Hz
4'-hydroxy Flavonol	7.90-8.10 (<i>d</i>)	6.50-7.10 (<i>d</i>) J=8.5Hz
3',4' dihydroxy	7.20-7.90	-
3',4',5' tri hydroxy	6.50-7.50 (<i>s</i>)	-

- Proton du noyau C

Le proton H₃ dans la Flavone, résonne sous forme d'un singulet dans l'intervalle (6.20-6.40ppm).

b. protons aliphatiques :

- Protons méthoxyle :

Il se présentent sous la forme d'un signal singulet dans l'intervalle entre 3.5 et 4.5 ppm.

- Protons du sucre :

Les déplacements chimiques des protons anomériques dépendent d'une part du flavonoïde et d'autre part de la position et du type de liaison sucre- aglycone. La constante de couplage entre le proton anomérique du sucre et celui du proton existant en 2'' a une grande importance car elle permet de savoir le type de la liaison entre le sucre et l'aglycone si il s'agit d'une position α ou β .

Pour le sucre glucose, le proton anomérique donne en générale un doublet et sa constante de couplage est de J=7Hz car il est toujours on position β d'après la biogénèse. Pour le rhamnose son proton anomérique donne un doublet aussi mais sa constante de couplage est de J=2.5Hz (position α). On peut aussi reconnaître le sucre rhamnose par le signal du groupement méthyle entre 0.8-1.2 ppm et avec une constante de couplage de J=6Hz.

C. Spectroscopie RMN ^{13}C :

Cette technique permet d'une part d'identifier les atomes de carbone d'un flavonoïde. D'autre part, il est possible d'obtenir des informations sur l'environnement de chaque atome de carbone selon son déplacement chimique.

Les plupart des signaux ^{13}C se situent entre 0 et 220ppm, et le déplacement chimique dépend de l'environnement du carbone dans la molécule.

La technique RMN à une dimension s'est avérée parfois insuffisante d'où la nécessité d'utiliser d'autres techniques notamment la RMN à deux dimensions.

III. 1. Définition de la toxicologie :

La **toxicologie** (du grec "toxicon", poison recouvrant les flèches, et "logos", étude, science) est la science étudiant les substances toxiques (ou poisons), leur étiologie (origine), les circonstances de leur contact avec l'organisme, leurs effets sur celui-ci (organes cibles) et sur l'environnement (écotoxicologie), les moyens de déceler et de les combattre (voies d'élimination, antidotes).

Elle s'intéresse aux effets de l'exposition à des toxiques, quelle que soit la voie d'entrée dans l'organisme (inhalation, contact, ingestion...), et que celle-ci soit seulement *potentielle* et asymptomatique (on parle alors de toxines), ou responsable de signes cliniques associés (syndrome) réalisant une intoxication proprement dite.

L'intoxication étant un processus dynamique, la toxicologie hospitalière relève souvent d'une procédure d'urgence, mobilisant le clinicien dans une démarche simultanément diagnostique (étiologie toxique ou autre), analytique (interprétation des résultats de la biologie) et thérapeutique (traitement symptomatique, réanimation).

L'étiologie des intoxications et intonations est très variée : pollution atmosphérique, exposition professionnelle, intoxication alimentaire, intoxication médicamenteuse, envenimation ou empoisonnement. Les cibles sont également variées : les neurotoxiques affectent le cerveau ou le système nerveux, d'autres produits ou les mêmes affecteront préférentiellement certains organes (glandes, poumons, foie, rein.)

Les toxines peuvent être d'origine animale (venin lors d'envenimation ophidienne par la vipère aspic, par exemple), végétale (empoisonnement par la Belladone ou *Atropis belladonna*), fongique (champignon vénéneux, comme l'amanite phalloïde, par exemple) ou chimique (intoxication par les métaux lourds, par exemple). Dans sa partie expérimentale et réglementaire, la toxicologie étudie et analyse expérimentalement la toxicité des produits (médicaments humains ou vétérinaires, produits phytosanitaires...) préalablement à leur commercialisation.

L'intoxication dépend souvent d'effet de seuils, le toxicologue se réfère donc à de nombreuses références qui sont des seuils, normes ou doses tolérables ou admissibles, dont par exemple :

La " Dose Journalière Admissible " (DJA) (pour les résidus de pesticides) La " Dose Journalière Tolérable " (DJT), ou DHTP (Dose hebdomadaire tolérable provisoire) ou (pour les métaux lourds) La " Dose Limite Annuelle " (DLA) (pour les radionucléides).

Ces seuils sont calculés pour des toxiques pris individuellement, et non pour des cocktails de polluants qui peuvent agir en synergie (positive ou négative) ou avec des effets de potentialisation,

sachant également qu'il existe des niveaux de sensibilités liés au patrimoine génétique, à l'état général de santé, à l'histoire immunitaire, et également à l'âge (le fœtus et l'embryon, ou le jeune enfant sont beaucoup plus sensibles aux toxiques que les adultes). La toxicologie, et plus encore l'écotoxicologie ne sont donc pas des sciences exactes

La dose mortelle peut être faible (le millionième de gramme pour la toxine botulique ou le plutonium, respectivement à court terme, ou à moyen ou long terme). Certains produits n'ont un effet toxique que chez des individus génétiquement prédisposés, ou exposés à un effet synergique avec une autre molécule ou affection. La toxicité est évaluée expérimentalement chez l'animal par la détermination de la Dose Létale 50 (DL50).

III. 2. Définition d'un poison ou un toxique :

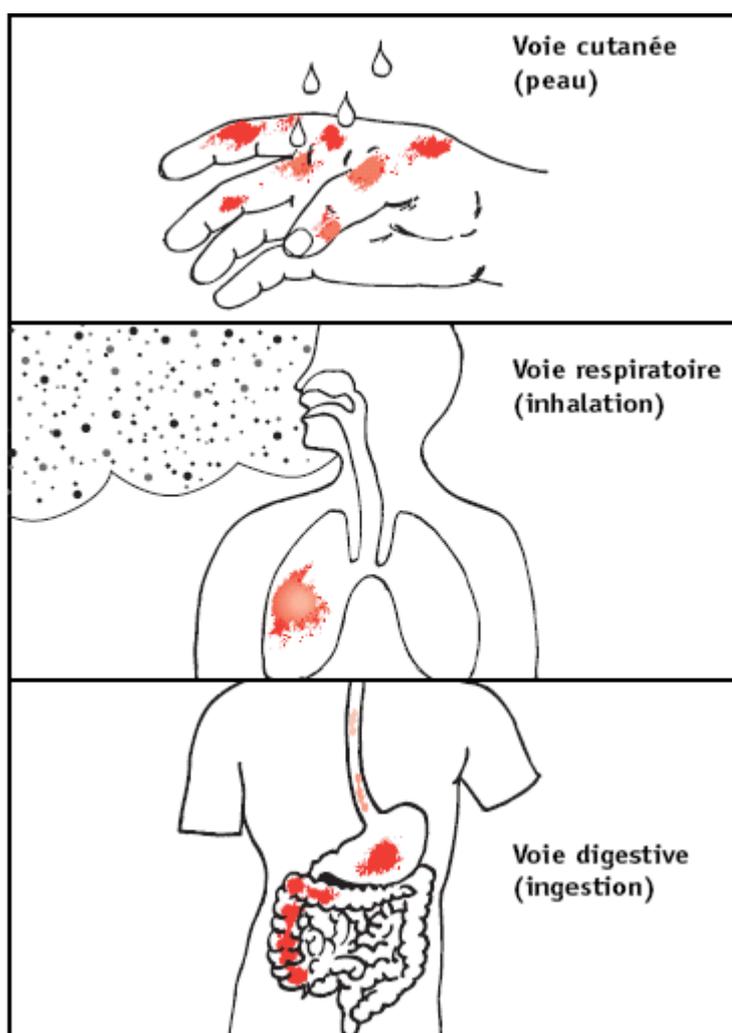
Un poison, ou toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort. [76]

III. 3. Le toxique et l'organisme :

L'organisme doit être exposé à un produit toxique pour qu'un effet nocif se manifeste. Dans ce cas, le produit peut agir au point de contact (effet local) ou pénétrer dans l'organisme (effet systémique). Certains produits agissent pendant leur contact avec la surface exposée, soit la peau et les yeux, par exemple les acides qui causent des brûlures chimiques graves. D'autres doivent pénétrer dans l'organisme pour provoquer des effets nuisibles.

Les principales façons de les absorber sont l'inhalation (voie respiratoire), l'absorption par la peau (voie cutanée) et l'ingestion (voie digestive) (figure 05).

Fig 04 : Les voies d'absorption usuelles.



III. 3. 1. La voie respiratoire (inhalation) :

Les poumons sont les organes où se font les échanges gazeux entre l'air des alvéoles et le sang des vaisseaux capillaires qui tapissent les alvéoles pulmonaires. Ils sont le siège de la respiration, qui permet l'absorption et l'élimination des gaz.

Dans la majorité des milieux de travail, la **voie respiratoire** représente la principale voie d'entrée des contaminants. La forte possibilité que l'air ambiant soit contaminé par des vapeurs, des gaz, des fumées, des poussières, etc. explique cette situation. Il suffit de penser notamment à l'inhalation de fumées de soudure. De nombreux facteurs sont à considérer dans l'absorption d'un produit par les poumons.

Pour les gaz et les vapeurs, il s'agira de la concentration, de la durée d'exposition, de la solubilité dans l'eau et les tissus, de la réactivité et du débit sanguin et pour les particules (ex. :

poussières, fibres, fumées, brouillards, brume, pollen, spores), il s'agira des caractéristiques physiques (le diamètre, la forme, etc.) et de l'anatomie de l'arbre respiratoire.

III. 3. 2. La voie cutanée (peau) :

La peau est une barrière imperméable qui recouvre toute la surface du corps et qui le protège. Cette enveloppe protectrice recouvre presque tout l'organisme et fait obstacle à la pénétration de nombreux contaminants. Toutefois, cette barrière n'offre pas une protection complète, car elle n'enveloppe pas la totalité du corps et qu'elle présente des failles, dont la base des poils et les pores. C'est un passage important, puisque plusieurs toxiques peuvent pénétrer dans l'organisme en traversant la peau à la suite d'un contact avec un liquide, un solide ou des vapeurs (ex. : certains solvants employés pour nettoyer des pièces mécaniques ou encore des diluants ou des décapants qui sont utilisés sans protection).

L'absorption cutanée est influencée par de nombreux facteurs tant physico-chimiques (ex. : pureté, grosseur de la molécule, solubilité) qu'individuels (ex. : hydratation de la peau, présence de lésions cutanées) et anatomiques (ex. : endroit du corps mis en contact avec le toxique).

III. 3. 3. La voie orale (ingestion) :

En milieu de travail, l'**ingestion** n'est généralement pas considérée comme une voie d'exposition importante. Il ne faut cependant pas la négliger, car des méthodes de travail inadéquates peuvent conduire à une ingestion accidentelle. De plus, de mauvaises habitudes peuvent également être à l'origine d'une exposition par ingestion, notamment manger, boire ou fumer dans des lieux de travail contaminés.

III. 3. 4. Les autres voies :

Il existe d'autres voies d'entrée, appelées parentérales, d'une importance généralement moindre et propres à certains milieux de travail, par exemple les injections accidentelles d'un médicament et les piqûres d'aiguilles en milieu hospitalier.

III. 4. Le cheminement d'un toxique dans l'organisme :

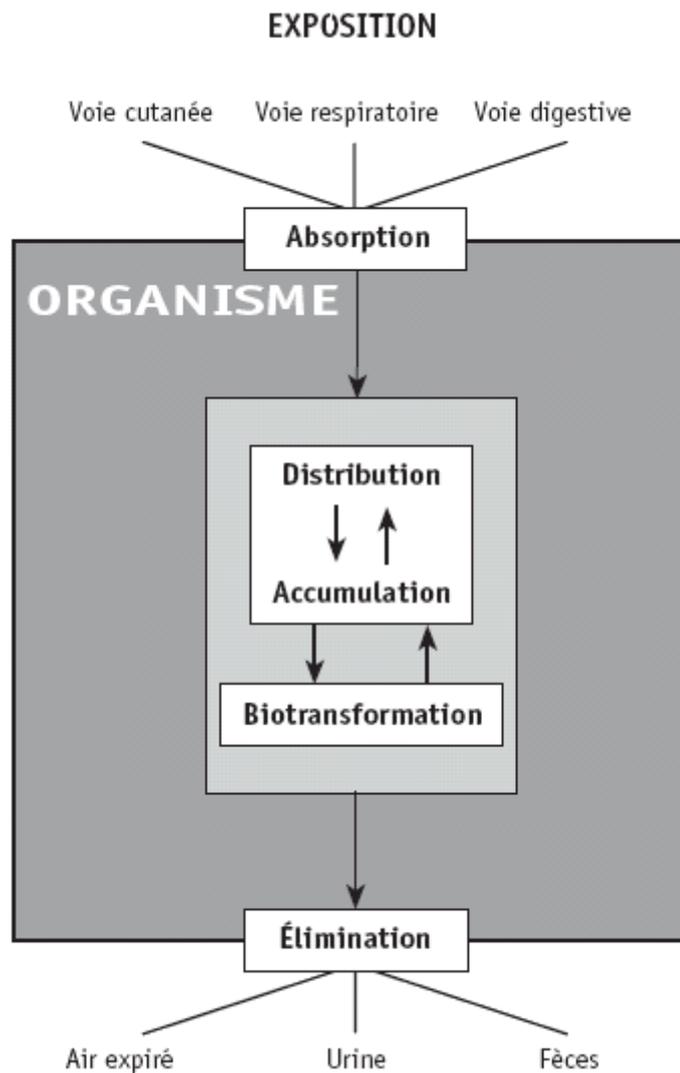
Un produit qui pénètre dans l'organisme peut avoir des **effets** bénéfiques (médicaments) ou néfastes (toxiques). Inversement, l'organisme peut agir sur ce produit : c'est ce qu'on appelle le **métabolisme**. La réponse de l'organisme à un toxique dépend, entre autres, de la quantité du produit présent dans un tissu ou un organe. Plusieurs facteurs interviennent dans les processus d'action toxique, notamment les phases toxicocinétiques et toxicodynamiques.

La **toxicocinétique** s'intéresse à l'influence qu'exerce l'organisme sur un toxique. Cette influence découle des processus (l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'élimination) qui gouvernent le cheminement du toxique dans l'organisme. Elle détermine la disponibilité physique de la substance.

La **toxicodynamie** s'intéresse à l'influence qu'exerce un toxique sur l'organisme et aux facteurs qui interviennent dans la réponse toxique. Elle détermine la disponibilité biologique de la substance. Ce n'est qu'après cette phase que nous pourrons observer les effets toxiques d'une substance. [77]

Dans cette section, il sera question des quatre principales étapes du cheminement d'un produit dans l'organisme (figure 06).

Fig 05 : Cheminement d'un produit dans l'organisme.



III. 4. 1. L'entrée (ou l'absorption) :

On appelle absorption le processus de **pénétration** d'un produit dans l'organisme. Il s'agit d'une étape importante, car, tant qu'il n'a pas pénétré dans la circulation sanguine, un produit ne peut causer d'action toxique systémique, c'est-à-dire à des endroits éloignés du point de contact initial.

Divers facteurs peuvent influencer le processus d'absorption d'un produit : sa nature, sa solubilité, la perméabilité des tissus biologiques au point de contact, la durée et la fréquence de l'exposition, etc.

III. 4. 2. Le transport et la distribution (ou la répartition) :

Après avoir atteint la circulation sanguine, le produit peut être transporté dans tout l'organisme. C'est ce qu'on appelle la **distribution**. En plus de l'oxygène, de divers éléments nutritifs essentiels au fonctionnement de l'organisme et des déchets, le sang transporte aussi des toxiques. Ceux-ci peuvent alors entrer en contact avec des cellules et se fixer dans certains tissus. Ainsi, les pesticides organochlorés comme le DDT se concentrent dans les tissus adipeux. Ils peuvent y rester emmagasinés sans causer d'effets toxiques pendant une période plus ou moins longue. En revanche, ils peuvent causer des effets toxiques dans d'autres tissus ou organes où ils sont présents en quantités moindres.

La nature, l'intensité et la localisation de ces perturbations dans l'organisme diffèrent d'un produit à l'autre et dépendent souvent de la dose.

III. 4. 3. La biotransformation (ou le métabolisme) :

Pendant ou après son transport dans le sang, le toxique peut entrer en contact avec différentes cellules de l'organisme qui ont la capacité de le transformer.

L'ensemble des réactions de la transformation métabolique est appelée **biotransformation**, tandis que les produits de la biotransformation sont appelés métabolites. Il peut en résulter un produit moins toxique (détoxification) ou plus toxique (activation), l'accumulation ou l'élimination du produit et de ses métabolites.

La transformation des toxiques est surtout effectuée par le foie, véritable laboratoire chimique de l'organisme, qui contient une multitude d'enzymes (substance protéique qui catalyse une réaction chimique dans l'organisme). Il enrichit le sang d'éléments nutritifs et le purifie en concentrant et en éliminant beaucoup de substances. D'autres organes tels que les poumons et les reins peuvent aussi transformer des toxiques.

III. 4. 4. L'excrétion :

Ce processus consiste à rejeter le produit inchangé ou ses métabolites à l'extérieur de l'organisme. L'**excrétion** peut se faire par voie rénale (l'urine), gastro-intestinale (les selles), pulmonaire (l'air expiré), cutanée (la sueur) ou lactée (le lait). Par exemple, le sang transporte de nombreux produits vers les reins, dont plusieurs déchets provenant du métabolisme. Les reins filtrent le sang, remplissant ainsi une fonction essentielle au maintien de l'équilibre des éléments sanguins et assurent l'élimination de nombreux produits.

III. 5. L'effet toxique :

III. 5. 1. L'effet toxique :

Les effets toxiques, très divers par leur nature, l'organisme cible et mécanisme d'action ; résultent de l'interaction biochimiques entre le toxique et l'organisme.

L'effet toxique est donc le résultat d'un processus souvent complexe et il peut entraîner une série de réactions physiologiques et métaboliques.

L'effet toxique est lié à la **voie d'absorption**, à la **gravité** des lésions, au **temps d'apparition**, ainsi qu'au **type** des lésions.

On entend par **effet local** celui qui survient au point de contact, tandis qu'un **effet systémique** survient ; après sa distribution dans l'organisme ; à un endroit éloigné du point de contact initial. Certains effets toxiques sont **réversibles**, ils disparaissent plus ou moins rapidement après l'arrêt de l'exposition, tandis que d'autres sont **irréversibles**, ils persistent ou même s'intensifient après l'arrêt de l'exposition.

Un **effet aigu ou immédiat** se fait sentir dans un temps relativement court (minutes, heures, jours), tandis qu'un **effet chronique ou retardé** ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (semaines, mois, années).

Un **effet morphologique** aboutit à un changement de la morphologie d'un tissu visible en microscopie optique ou électronique, tandis qu'un **effet fonctionnel** détermine un changement dans les fonctions d'un organe (foie, rein, etc.).

Les différents effets toxiques sont représentés dans le (tableau 09).

Tableau 08 : Effets toxiques sur certains tissus et systèmes biologiques.

Système et organe exposé	Effet toxique
Oeil	Irritation, corrosion
Peau	Irritation, corrosion, dermatose
Système digestif	Irritation, corrosion
Système cardiovasculaire	Rythme cardiaque anormal
Système nerveux central	Dépression (nausée, vomissement, étourdissement)
Système nerveux périphérique	Neuropathie (perte de sensation, trouble de la coordination)
Système respiratoire	Irritation, corrosion, essoufflement
Système sanguin	Carboxyhémoglobinémie
Système urinaire	Urine très foncée, sang dans les urines

III. 5. 2. La survie et l'évolution d'un effet toxique :

III. 5. 2. 1. La notion d'exposition :

La majorité des toxiques doivent généralement pénétrer dans l'organisme pour produire des effets néfastes, sauf ceux causant des effets locaux. Généralement, pour qu'un effet toxique puisse se produire, il faut que l'organisme soit exposé à un toxique, que ce toxique y pénètre et que l'organisme en absorbe une quantité suffisante pour perturber son fonctionnement. La figure 6 résume la séquence de ces événements.

III. 5. 2. 2. L'atteinte toxique :

Les organismes fonctionnent dans des conditions relativement constantes (pH, oxygène, autres). C'est ce que l'on appelle l'homéostasie ou la constance du milieu intérieur. Les organismes vivants cherchent à maintenir cet équilibre afin de conserver un degré optimal de fonctionnement. Le corps humain est un ensemble de systèmes finement rodés qui peut s'adapter à de nombreuses situations d'agression, tant biologiques que physiques ou chimiques. Les processus d'adaptation de l'organisme fonctionnent continuellement pour veiller à maintenir cet équilibre. Quand cet

équilibre est perturbé, cela entraîne un dysfonctionnement, c'est l'effet toxique. Il y a alors mobilisation d'une partie de l'organisme et parfois de tout l'organisme ; des réactions diverses sont déclenchées pour répondre à l'agression et rétablir l'équilibre rompu.

L'organisme peut résister à une agression toxique en autant qu'elle s'effectue à l'intérieur des limites de ses mécanismes de détoxification, d'homéostasie et de réparation. Au delà, les mécanismes de compensation ne peuvent suffire à la tâche. Le système de défense ne peut alors contrer les effets toxiques et des manifestations, réversibles ou non, peuvent s'ensuivre.

III. 5. 2. 3. La gravité de l'intoxication :

La gravité, l'intensité et la nature des symptômes liés à une exposition à un toxique varient en fonction de plusieurs facteurs tels que la toxicité du produit, la dose reçue, la voie d'exposition et la susceptibilité de l'organisme. L'évaluation et le pronostic sont très variables et sont liés aux symptômes ainsi qu'à leur évolution (tableau 10).

Tableau 09 : Gravité d'un effet toxique

	Degré de gravité			
	Bénin	Modéré	Grave	Fatal
Effet	Modification biochimique	Augmentation du volume et du poids d'un organe	Atteinte morphologique d'un organe	Décès
Exemple	Inhibition des cholinestérases causée par l'exposition au malathion	Hyperplasie du foie causée par l'exposition au chlorure de vinyle	Neuropathie avec trouble de la motricité lors de l'exposition à l'hexane	Arrêt respiratoire causé par une intoxication grave aux cyanures

III. 5. 2. 4. Les effets fonctionnels et lésionnels :

Les effets causés par un toxique peuvent se traduire en changements fonctionnels ou lésionnels (morphologie). Les premiers touchent l'atteinte transitoire d'une fonction de l'organisme ou d'un organe (ex. : une modification de la fréquence respiratoire lors de l'exposition à un

asphyxiant simple) sans créer de lésions et ils sont généralement réversibles. Les seconds causent une lésion à un ou à plusieurs tissus ou organes (ex. : fibrose pulmonaire causée par l'exposition chronique à la silice cristalline) sans que le sujet présente des signes cliniques et sont souvent irréversibles. Enfin, des altérations biochimiques peuvent également se produire sans être accompagnées de changements morphologiques apparents (ex. : l'inhibition des cholinestérases causée par les insecticides organophosphorés).

III. 5. 2. 5. Les organes cibles :

Les toxiques ne produisent pas des effets de même intensité sur tous les organes (ex. : le rein) ou les tissus (ex. : le sang). Ils s'attaquent à des organes en particulier, les organes cibles, pour des raisons qui ne sont pas toujours comprises. Il peut y avoir plusieurs raisons, dont une sensibilité plus grande de ces organes, une concentration plus élevée du toxique et/ou de ses métabolites, etc. Par exemple, le foie est un organe cible pour le chlorure de vinyle.

III. 5. 2. 6. La réversibilité et l'irréversibilité :

Certains effets toxiques sont **réversibles** (ils disparaissent plus ou moins rapidement après l'arrêt de l'exposition) tandis que d'autres sont **irréversibles** (ils persistent ou s'aggravent après l'arrêt de l'exposition).

Des changements adaptatifs causés par un produit chimique dans un tissu ou un organe peuvent être accompagnés de changements fonctionnels et morphologiques. De tels changements peuvent être réversibles si on prévient ou arrête l'exposition.

Cependant, dans certains cas, l'interruption de l'exposition n'est pas suivie d'une récupération. Il s'agit alors de changements irréversibles. Ainsi, pour un tissu tel que celui du foie, qui a une importante capacité de régénération, la majorité des atteintes sont réversibles ; au contraire, elles sont généralement irréversibles lorsqu'il s'agit d'une atteinte du système nerveux central, les neurones ne pouvant pas être facilement remplacés. Des effets tels que la cancérogénicité et la tératogénicité sont généralement considérés comme des effets irréversibles.

III. 5. 2. 7. La spécificité de l'intoxication:

Les intoxications ne sont pas toujours imputables au travail. Par exemple :

- de nombreux toxiques sont utilisés sans précautions au cours de loisirs tels que le bricolage (ex. : solvants, colles) et le jardinage (ex. : insecticides, herbicides) ;

- l'intoxication par le plomb peut être causée par de l'eau potable contaminée ; et
- l'intoxication au monoxyde de carbone peut être causée par un système de chauffage défectueux (ex. : poêle au gaz propane).

III. 5. 3. La classification des effets toxiques:

Les effets toxiques peuvent être classés de diverses façons, selon, par exemple :

- la durée : aiguë, chronique ;
- le type d'action : locale, systémique ;
- le mécanisme d'action : stimulant, inhibiteur ;
- la voie de pénétration : respiratoire, cutanée, digestive ;
- le tissu ou l'organe affecté : sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique) ;
- la nature de l'effet : irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérigène ;
- l'utilisation : pesticides, savons, solvants ;
- l'étiquetage : matière corrosive ; et
- la famille chimique : hydrocarbures aromatiques, alcools.

La classification des toxiques est donc abordée de plusieurs points de vue. Elle dépend souvent du domaine d'application, de l'objectif poursuivi par un organisme ou même du champ d'activité d'un individu.

III. 6. La relation entre la dose et l'effet toxique :

Un principe important en toxicologie veut que **toutes les substances chimiques soient toxiques**, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. Mais le fait d'inhaler, de toucher et même d'ingérer des substances chimiques n'entraîne pas nécessairement l'apparition d'un tel effet.

La **dose** est la quantité d'une substance à laquelle un organisme est exposé. Des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques. C'est ce qu'on appelle la relation **dose-effet** ou **exposition-effet** (relation entre l'exposition et l'intensité d'un effet). L'exemple suivant illustre bien cette relation : si une personne inhale accidentellement une substance très volatile, la manifestation des effets toxiques dépend de la quantité de vapeurs inhalées et du seuil d'apparition de ces effets. Ainsi, au delà de la dose seuil, les effets seront d'autant plus toxiques que la personne aura inhalé davantage de

vapeurs.

- La notion de seuil toxique est importante, car elle peut servir à fixer des normes. La valeur seuil représente la quantité minimale sous laquelle il ne se produit pas d'effet. Au-dessus de ce seuil, l'effet observé dépend de la dose, et ce, bien qu'il y ait théoriquement des exceptions : par exemple, les cancérogènes génotoxiques. Ce seuil s'explique par le fait que le corps humain est constitué d'un grand nombre de cellules, de tissus et d'organes ayant une sensibilité variable et qu'il possède des mécanismes de défense ou d'adaptation. Le même principe s'applique à une population d'individus, car l'effet ou les nombreux effets possibles peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'un toxique. C'est ce qu'on appelle la **relation dose-réponse** ou **exposition-réponse**,

III. 7. Les facteurs qui influencent les effets toxiques :

III. 7. 1. La toxicité:

Les toxiques ne présentent pas tous le même degré de toxicité. Certains ont une faible toxicité, même si on les absorbe en grande quantité, par exemple le sel de table, tandis que d'autres ont une forte toxicité, même si on en absorbe de faibles quantités, notamment les dioxines. On peut en partie expliquer de telles variations par les différences qui existent entre la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement de l'organisme. De plus, les caractéristiques physico-chimiques, par exemple la grosseur des poussières, la volatilité et la solubilité dans l'eau, interviennent également dans la réponse toxique. Ainsi, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des toxiques proprement dits se révèle importante pour en évaluer la toxicité.

III. 7. 2. L'individu :

La population humaine est un groupe hétérogène au sein duquel il existe une grande variabilité entre les individus. Ceux-ci peuvent être affectés différemment par une même dose toxique, et une personne peut y réagir différemment selon le moment (relation dose-réponse).

Deux principales catégories de facteurs contribuent à expliquer la nature et l'intensité des effets toxiques.

a-Facteurs génétiques :

Des différences génétiques peuvent intervenir dans la capacité des individus à transformer des toxiques.

b-Facteurs physiopathologiques :

-L'âge

La sensibilité aux effets toxiques est habituellement plus grande chez les enfants et les personnes âgées.

-Le sexe

Il existe des différences entre les hommes et les femmes, notamment en ce qui concerne le métabolisme des toxiques.

-L'état nutritionnel

La toxicité peut être influencée par la masse de tissus adipeux, la déshydratation, etc.

-L'état de santé

Les individus en bonne santé sont plus résistants, car ils métabolisent et éliminent les toxiques plus facilement que ceux qui souffrent de maladies hépatiques ou rénales.

-La grossesse

Il se produit des modifications de l'activité métabolique des toxiques au cours de la grossesse.

Nos connaissances sur l'interaction de tous ces facteurs et de nombreux autres aspects demeurent incomplètes. En effet, il est souvent difficile, sinon impossible, d'évaluer la sensibilité d'un individu ou d'une population et de prédire quelle sera la réponse biologique d'un organisme à une exposition à un toxique.

III. 7. 3. L'environnement :

Certains facteurs environnementaux, c'est-à-dire les éléments extérieurs à l'individu, peuvent influencer la toxicité. La lumière et la température peuvent notamment modifier les effets d'un toxique. Mentionnons comme exemple la réaction photoallergique au cours de laquelle la peau exposée à l'éthylène diamine peut devenir plus sensible à la lumière.

En milieu de travail, l'exposition à des mélanges de produits chimiques est une réalité et figure parmi les problèmes les plus importants à prendre en considération.

Les mélanges y sont souvent complexes et peuvent être constitués de composés similaires, de produits de transformation, de produits de réaction ou de résidus (déchets). L'exposition

simultanée ou séquentielle à plusieurs produits peut entraîner des conséquences imprévues qui peuvent différer de la somme des réponses causées par chacun des composants du mélange. C'est ce que l'on appelle une **interaction toxicologique**. Les interactions toxicologiques peuvent être néfastes (augmentation de la toxicité d'un autre produit) mais aussi, dans certaines situations, avantageuses (réduction des effets toxiques d'un autre produit). Par exemple, l'ingestion d'alcool éthylique augmente les effets toxiques du trichloréthylène ; en revanche, administrer de l'alcool éthylique en cas d'intoxication permet de diminuer la toxicité de l'alcool méthylique.

Il existe différents termes pour décrire les interactions toxicologiques : addition, synergie, potentialisation ou antagonisme (tableau 11).

- Addition (additivité) : la réponse est égale à la somme des réponses des substances prises individuellement, il n'y a pas d'interaction.
- Synergie : la réponse est supérieure à la somme des réponses des substances prises individuellement.
- Potentialisation : elle se produit lorsqu'une substance ayant peu ou pas de toxicité augmente la réponse d'une autre substance.
- Antagonisme : la réponse est inférieure à la somme des réponses des substances prises individuellement.

Tableau 10 : Interactions possibles entre certains produits chimiques [78]

Interaction		Modèle	Effet
Additivité	Addition	$1 + 2 = 3$	Aucune interaction
Supra additivité	Synergie	$1 + 2 = 5$	Augmentation
	Potentialisation	$0 + 3 = 5$	
Infra additivité	Antagonisme	$0 + 3 = 2$	Diminution
		$-2 + 3 = 1$	

Les plantes (médicinales ou non) peuvent être source de nouvelles molécules candidates bio médicaments. Cependant, l'usage de plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé; mais avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle espèce pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue, et apprécier si celle-ci confirme sa réputation. De plus, il est impératif de vérifier

également l'absence de toxicité des plantes employées. L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé peut-être perçu comme une alternative aux médicaments, en particulier dans les pays du Sud où ces médicaments sont souvent chers, peu accessibles et quelquefois contrefaits.

1 Toxicité par administration unique : Toxicité aiguë

Elle se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux et fournit pour autant que cela est possible, l'indication de la DL50 avec ses limites de confiance (95%). L'étude sur l'animal de laboratoire doit être effectuée sur un nombre égal d'animaux mâles et femelles. La durée de l'observation des animaux est précisée par l'expérimentateur.

En général elle n'est pas inférieure à une semaine.

L'étude de la toxicité aiguë permet d'exprimer la dose qui tue 50% des animaux d'expérience (DL50) ainsi que la dose maximale sans effet toxique (DME) c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin.

2 Toxicité par administration réitérée : toxicité sub-aiguë et chronique :

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active examinée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifères dont une non-rongeur. Une des deux épreuves durera 2 à 4 semaines, l'autre 3 à 6 mois. Le choix de la ou des voies d'administration doit tenir compte de la voie pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas codifiés strictement mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais. Il est utile de choisir la dose la plus élevée de façon à faire apparaître des effets nocifs, les doses inférieures permettent alors de situer la marge de tolérance du nouveau produit chez l'animal. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance, de la formule sanguine et des épreuves

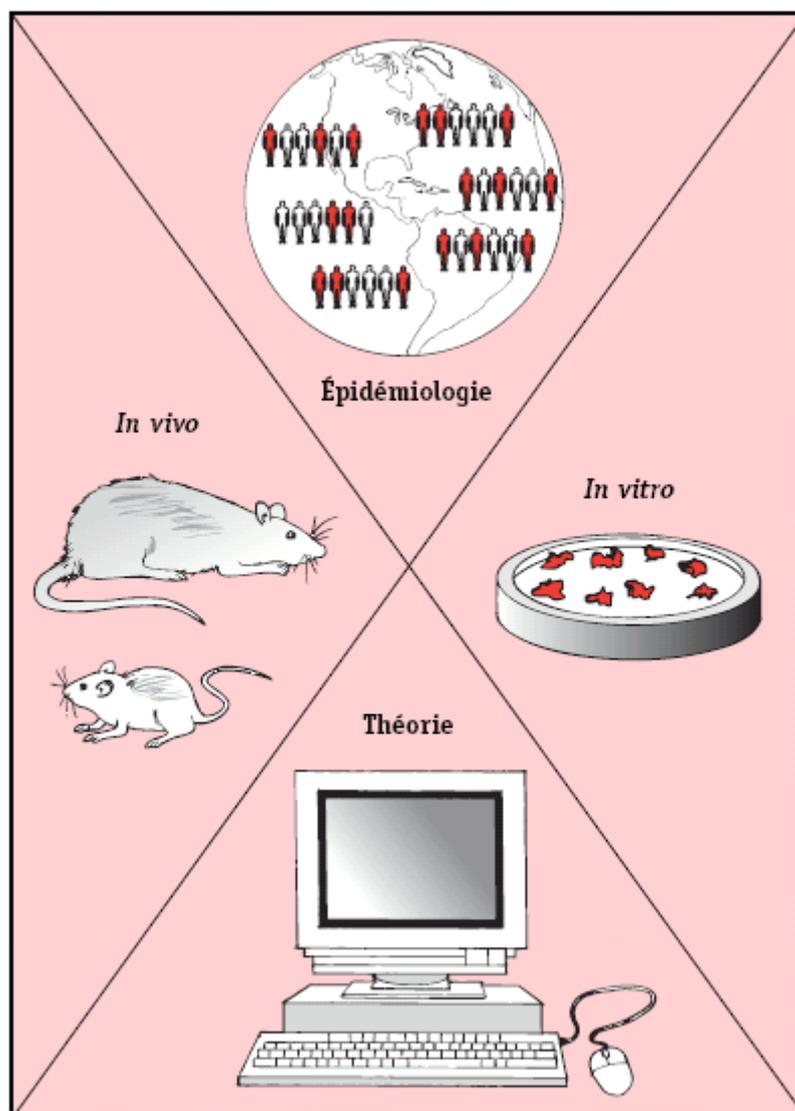
fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes extérieurs ainsi que la base des comptes rendus nécropsiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent.

III. 8. L'évaluation d'un effet toxique :

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études **qualitatives** (non mesurables) ou **quantitatives** (mesurables) adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories (figure 07) :

- les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas;
- les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris);
- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules; et
- les études théoriques par modélisation (ex. : structure-activité).

Fig 06 : Les différents types d'études.



On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxication selon la fréquence et la durée de l'exposition (tableau 12).

Tableau 11 : Les formes d'intoxication

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition
AIGUË	Unique	< 24 heures
SUBAIGUË	Répétée	<= 1 mois
SUBCHRONIQUE	Répétée	de 1 à 3 mois
CHRONIQUE	Répétée	> 3 mois

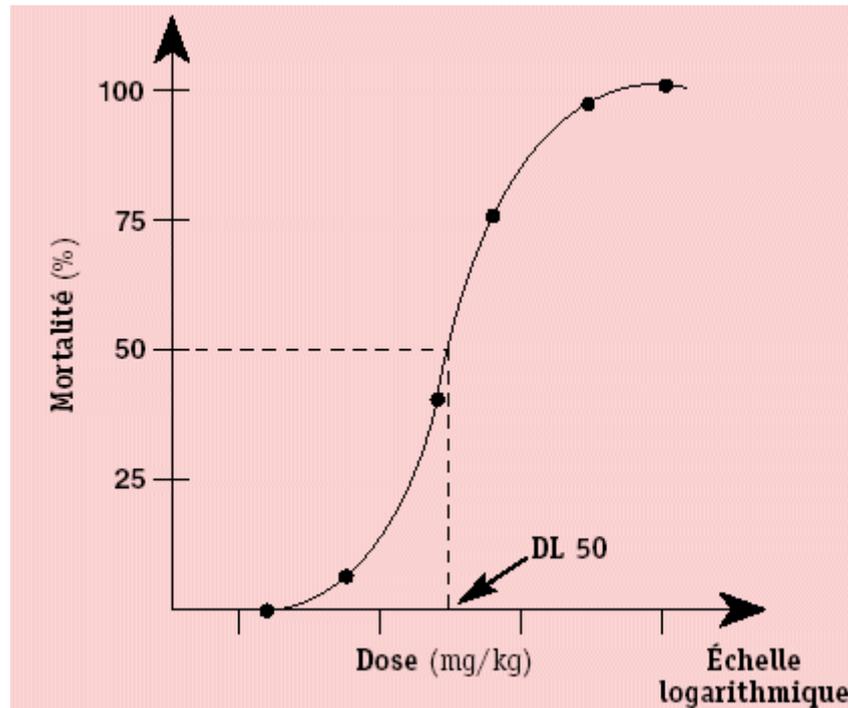
Cependant, la distinction entre exposition aiguë et effet aigu ainsi qu'entre exposition chronique et effet chronique est souvent difficile à faire. Certains effets sont également difficiles à classer dans une catégorie, puisqu'une exposition aiguë peut causer un effet chronique. Ainsi, le pronostic entre l'exposition et l'effet n'est pas nécessairement prévisible (tableau 12).

III. 8. 1. La toxicité aiguë (à court terme) :

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL50). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances. La DL50 correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. On administre généralement le produit à **des rats ou à des souris** répartis en plusieurs groupes, et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 % (figure 08).

Lorsqu'il s'agit d'un toxique qui est inhalé, on parle de concentration létale 50 (CL50) pour exprimer la concentration du toxique dans l'air inspiré qui cause la mort de 50 % des animaux.

Fig 07 : Détermination de la dose létale 50 (DL 50)



L'indice DL 50 sert fréquemment pour exprimer la toxicité aiguë ainsi que pour classer et comparer les toxiques. Il a cependant 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 l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de la journée, etc.

Il existe d'autres méthodes d'étude de la toxicité, par exemple les tests d'irritation et de corrosion de la peau et des yeux, qui font généralement partie d'un programme d'évaluation toxicologique.

III. 8. 2. La toxicité chronique :

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler irréversibles (ex. : la neurotoxicité de l'hexane). L'évaluation de la toxicité aiguë ne permet pas de prédire ce type de toxicité d'une substance. Des études destinées à évaluer la toxicité chronique doivent donc être effectuées. Celles-ci durent plusieurs mois ou années et supposent l'administration de plus d'une dose à des intervalles variant selon la méthode employée.

Le terme chronique caractérise bien l'objet de ce type d'évaluation. Ces études, qualifiées de pluridisciplinaires, sont généralement effectuées par plusieurs chercheurs spécialisés dans différents aspects de la toxicologie, par exemple l'immunotoxicologie et la cancérogénicité. Elles supposent généralement la collaboration de chercheurs de divers domaines scientifiques, comme la chimie, la biochimie, la biologie et la médecine.

III. 9. Principales manifestations toxiques :

III. 9. 1. Description des manifestations selon différents types d'effets toxiques :

III. 9. 1. 1. L'irritation et la corrosion :

L'**irritation** est une réaction réversible de la peau ou des muqueuses à des produits (figures 09 et 10). Cette réaction peut varier en gravité selon les tissus ou les organes affectés :

- la peau (le contact avec des produits tels que les décapants à peinture et les détergents peut causer une rougeur et de l'inflammation).
- les yeux (le contact avec une eau savonneuse peut causer une conjonctivite).
- les voies respiratoires (l'inhalation de gaz tels que l'ammoniac ou le chlore peut causer de la bronchoconstriction, un oedème pulmonaire et de la difficulté à respirer).
- les voies digestives (l'ingestion accidentelle d'eau de javel peut causer des brûlures d'estomac).

La **corrosion** consiste en des dommages irréversibles causés à des tissus par suite du contact avec un produit. On qualifie de corrosifs les produits qui peuvent causer la destruction des tissus vivants (figures 09 et 10), et de matériaux tels que les métaux et le bois.

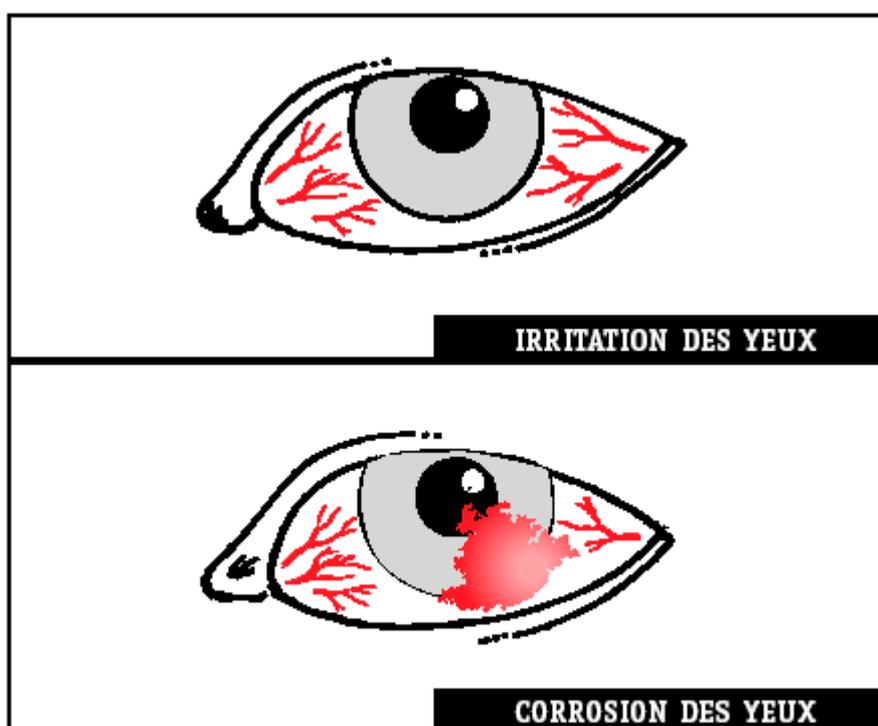
- Le contact de l'acide fluorhydrique avec la peau peut causer une ulcération profonde, un blanchiment et une nécrose (figure 09).

- Le contact de l'acide chlorhydrique avec les yeux peut causer une brûlure qui se manifeste par un larmoiement, une conjonctivite et une possibilité de lésions permanentes de la cornée (figure 10).

Fig 08: Irritation et corrosion de la peau



Fig 09 : .Irritation et corrosion des yeux



III. 9. 1. 2. La cancérogénicité (effet cancérogène) :

Il existe entre les cellules de l'organisme une interaction qui fait en sorte que chaque tissu a une taille et une organisation adaptée aux besoins de l'organisme. Dans certaines situations, des cellules ne répondent plus aux signaux des autres cellules et n'obéissent plus qu'à elles-mêmes. Ce sont les cellules cancéreuses.

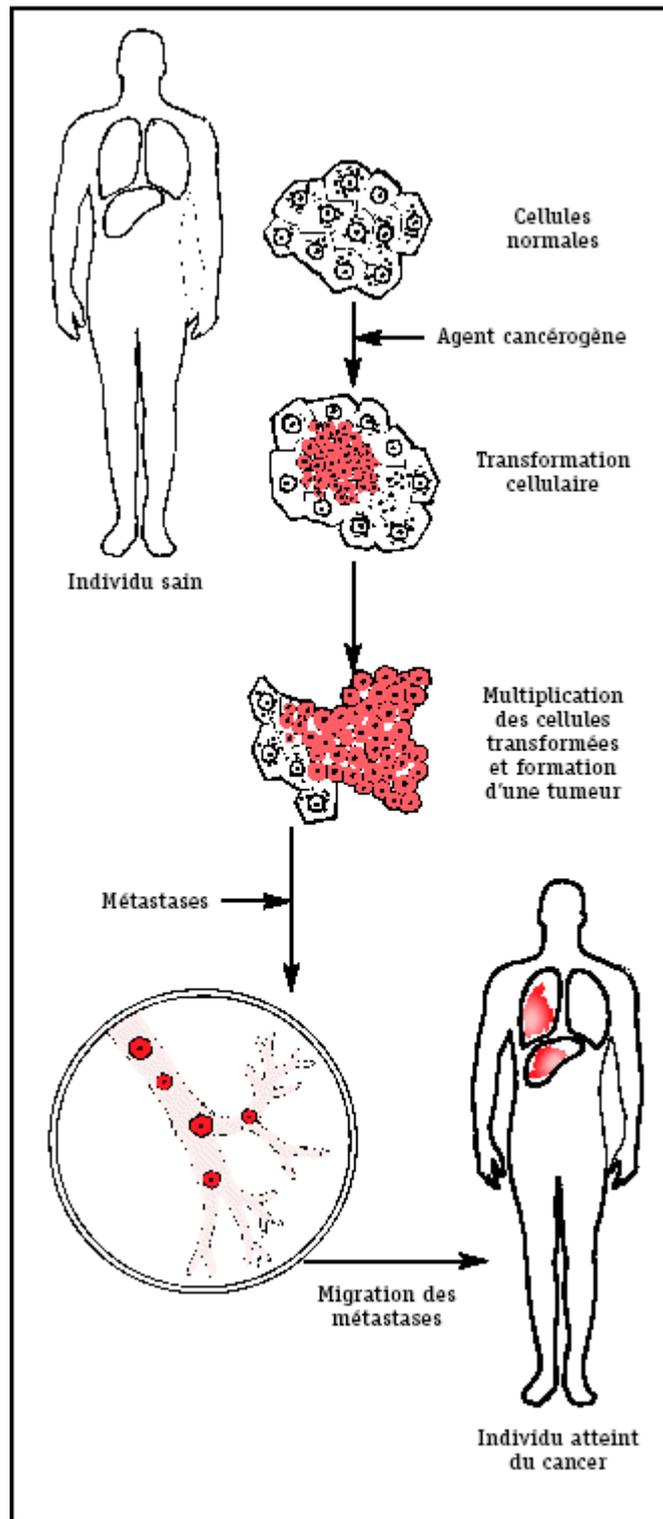
Le **cancer** est une maladie qui se caractérise par une croissance et une multiplication incontrôlée de cellules anormales dans un organe ou un tissu de l'organisme. En se multipliant, ces cellules anormales forment une masse appelée **tumeur**. Il existe deux types de tumeurs : la tumeur bénigne et la tumeur maligne. On appelle **tumeur bénigne** la tumeur qui n'envahit pas le tissu d'origine ou qui ne se propage pas dans d'autres organes. On appelle **tumeur maligne** celle qui peut envahir et détruire les tissus sains avoisinants ou se répandre dans le corps. C'est cette dernière que l'on qualifie de tumeur cancéreuse. Un agent qui cause le cancer est qualifié de cancérogène.

Une tumeur maligne qui se répand (dissémination) forme ce que l'on appelle des **métastases** (figure 11). La métastase est une cellule cancéreuse qui quitte le foyer de croissance initial et s'attaque aux tissus avoisinants, emprunte la circulation lymphatique pour atteindre les ganglions, passe dans le sang et colonise d'autres organes, formant ainsi des foyers secondaires.

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse peut survenir à n'importe quel moment de la vie de la cellule. Cette transformation peut être la conséquence d'une agression par un cancérigène. Généralement, une telle transformation suppose une cascade d'événements biologiques dont l'ensemble du processus peut s'échelonner sur une longue période au cours de la vie d'une personne.

Chaque type de cancer est différent et la progression d'un même cancer est différente d'une personne à l'autre.

Fig 11 : La cancérogénicité



Plusieurs causes sont reliées au cancer : l'alimentation, le tabac, l'exposition prolongée au soleil, certains virus et certains produits chimiques. Parmi ces derniers, mentionnons : le benzène

(cancer du sang), le chlorure de vinyle (cancer du foie) et la bêta-naphtylamine (cancer de la vessie).

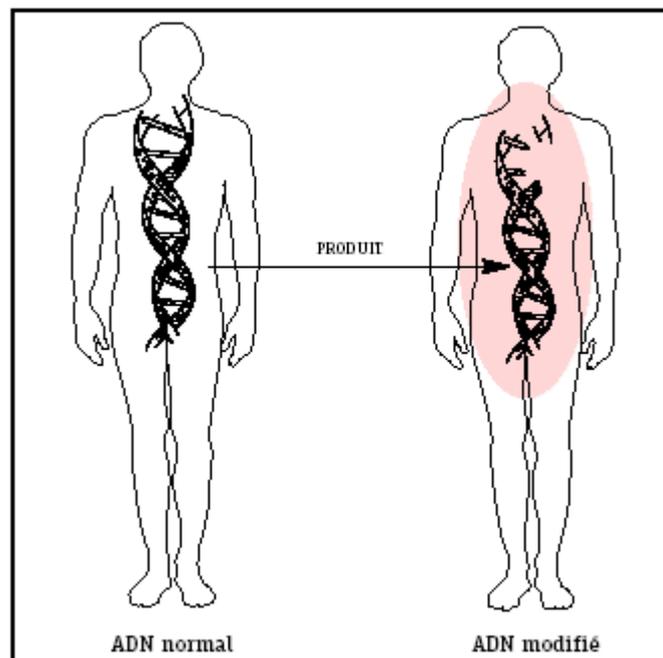
III. 9. 1. 3. La mutagénicité (effet mutagène):

Une **mutation** est un changement qui se produit dans le matériel génétique de la cellule, c'est-à-dire l'ADN (acide désoxyribonucléique). L'ADN se trouve à l'intérieur du noyau de la cellule et constitue le support matériel de l'hérédité. Son rôle est essentiel pour la transmission de l'information génétique d'une cellule à la génération suivante. Les conséquences des modifications dépendront du type de cellules modifiées (figure 12).

Il existe deux types de cellules susceptibles d'être affectées : la cellule **somatique** et la cellule **germinale**. Les cellules somatiques comprennent toutes les cellules du corps (ex. : cellules hépatiques, neurones), sauf les cellules germinales.

Les cellules germinales sont les spermatozoïdes et les ovules.

Fig 12 : L'effet mutagène



Un agent **mutagène** est celui qui va induire une mutation (figure 12). Si la mutation se produit dans une cellule somatique, il pourra en résulter la mort de la cellule, un cancer ou d'autres effets néfastes. Si la mutation se produit dans une cellule germinale, elle pourra avoir des conséquences sur la descendance. Toutefois, si une cellule est transformée par un mutagène, il n'en résultera pas nécessairement une conséquence néfaste, car tous les mutagènes ne causent pas

nécessairement d'effet biologique décelable. De plus, l'organisme peut réparer une partie plus ou moins importante des altérations.

Il existe des tests permettant de repérer les produits ayant un potentiel mutagène (ex. : aberration chromosomique, dominance létale). Les résultats de ces tests facilitent l'identification et la classification des agents mutagènes de nature chimique (ex. : acrylamide, cyclophosphamide) ou physique (ex. : radiations ionisantes).

III. 9. 1. 4. L'allergie (la sensibilisation) :

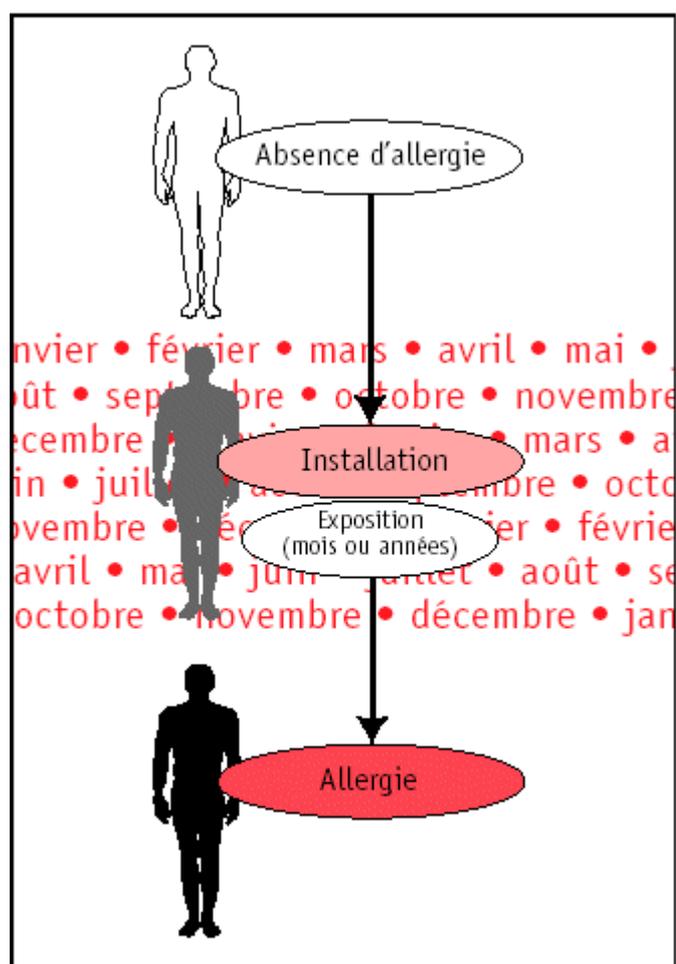
L'organisme humain possède divers systèmes de défense qui lui permettent de reconnaître les substances favorables à son bon fonctionnement. Lorsque l'organisme répond d'une façon excessive ou exagérée à des produits chimiques étrangers qui ne provoquent habituellement pas de réaction immunologique, on parle d'allergie.

L'**allergie** est une réaction indésirable de l'organisme à des agents chimiques, physiques ou biologiques généralement inoffensifs pour la plupart des gens. La réaction allergique survient lorsque le système immunitaire de l'individu reconnaît par méprise une substance comme étrangère, appelée alors allergène. L'organisme la reconnaît et fabrique des substances pour la neutraliser et l'éliminer, ce sont des anticorps. Le système de défense peut toutefois se dérégler et en venir à fabriquer des anticorps contre des substances inoffensives. Pour qu'il y ait allergie, il faut :

- un contact entre l'allergène et l'organisme; et
- une faculté particulière à se sensibiliser, qui peut être héréditaire ou qui peut se développer par suite de l'action de nombreux facteurs.

Le contact de la substance avec l'organisme déclenche un mécanisme qu'on appelle **sensibilisation** (figure 13). Le terme **sensibilisant** qualifie les agents susceptibles de causer une telle réaction. L'exposition qui provoque la sensibilisation ne correspond pas nécessairement à la première exposition, car un individu peut être exposé pendant une longue période à un allergène avant que la sensibilisation ne se manifeste. On ne naît pas allergique. On le devient par un contact prolongé ou répété avec une substance.

Fig 13 : La sensibilisation:



Les allergènes peuvent emprunter plusieurs voies : la voie aérienne, la voie cutanée, l'ingestion et l'injection. Les deux premières sont les plus fréquentes en milieu de travail et créent également beaucoup de problèmes dans la vie courante :

- Les allergènes aériens (moisissures, poils d'animaux, pollen de l'herbe à poux) peuvent causer de l'écoulement nasal, des éternuements, de la congestion, du larmoiement, du picotement et le gonflement des yeux. Si ces symptômes nous apparaissent surtout comme incommodants, n'oublions pas qu'ils peuvent s'aggraver et conduire à des complications médicales ; de plus, l'inhalation d'allergènes (tels que les isocyanates qu'on trouve dans certaines peintures) peut être dangereuse et causer de l'asthme.
- Les allergènes de contact (herbe à puce, nickel) peuvent causer des éruptions et des démangeaisons.
- Les allergènes injectés (morsures, piqûres d'insectes) peuvent causer des éruptions, de la fièvre, des nausées, des vomissements et des crampes d'estomac.

- Les allergènes ingérés (aliments et leurs constituants, tels que les oeufs et les arachides) peuvent être la cause d'éruptions et d'une manifestation allergique violente (telle qu'un choc anaphylactique).

III. 9. 1. 5. Les effets sur la reproduction et le développement :

De nombreuses personnes s'interrogent sur la possibilité que des produits chimiques, présents dans leur milieu de travail, puissent avoir des répercussions sur leur capacité à concevoir et avoir des enfants en bonne santé. La **toxicologie de la reproduction** s'intéresse aux troubles de la reproduction, aux effets non héréditaires sur l'embryon et le fœtus, ainsi qu'à ceux pouvant affecter l'enfant de la naissance à la puberté. La gamme des effets observés peut être sommairement regroupée comme suit :

- les effets sur la fertilité.
- les effets sur le développement (prénatal et postnatal).
- les effets durant la lactation.

Les effets toxiques peuvent affecter la **fertilité**, tant chez l'homme que chez la femme. Les atteintes de la libido, du comportement sexuel, de la spermatogenèse, du développement ovulaire (oogenèse) ou de la capacité de fécondation sont parmi les effets néfastes possibles qui peuvent se manifester (ex. : les anomalies spermatiques causées par l'exposition au dibromo-1,2 chloro-3 propane ou DBCP).

La **toxicité sur le développement** peut apparaître à la suite d'une exposition, avant, pendant ou après la conception et peut prendre diverses formes (tableau 13). Les **malformations congénitales** représentent les effets qui sont les plus publicisés et qui apparaissent comme étant les plus dramatiques, et souvent les plus visibles. Cependant, il peut également y avoir d'autres atteintes *in utero*, telles que des retards de développement et des troubles fonctionnels de l'embryon et du fœtus. Ils peuvent alors être regroupés sous les termes d'**embryotoxique** ou **foetotoxique** et d'**effet postnatal** en fonction du stade de développement (embryon ou fœtus) selon qu'ils se produisent avant la naissance (prénatale) ou après la naissance (postnatale). Par exemple, l'exposition au monoxyde de carbone, présent dans les gaz d'échappement des moteurs à combustion interne et dans les gaz d'émission s'il y a combustion incomplète des matières combustibles, peut produire des effets embryotoxiques ou fœtotoxiques ainsi que de la toxicité postnatale.

La **lactation** est une étape importante durant la période postnatale. En effet, l'allaitement maternel présente un avantage nutritionnel important pour le bébé, puisque le lait maternel est un

aliment naturel qui contient les nutriments essentiels à son développement (acides gras, vitamines, minéraux, etc.). Il est donc important que ce soit un aliment sain. Bien qu'il existe plusieurs données relativement aux effets des médicaments sur le lait et l'allaitement, il y a cependant peu d'études relatives à la contamination du lait maternel par des substances chimiques présentes en milieu de travail. Plusieurs substances sont excrétées dans le lait (ex. : aldrine, perchloroéthylène, plomb, toluène), mais les conséquences sur le bébé allaité et sur l'allaitement sont encore très peu documentées.

Tableau 12 : Principaux effets liés aux différents stades du développement humain

Période	Préconception	Prénatale			Postnatale (lactation)
		I (2 semaines)	II (3-8 semaines)	III (9-38 semaines)	
Événement biologique majeur	Fonction de reproduction	Conception et implantation	Formation des organes	Augmentation de la taille des organes	Croissance et maturation
Effet principal	Infertilité	Mortalité prénatale	Tératogénéicité et embryotoxicité	Tératogénéicité et foetotoxicité	Trouble physiologique

III. 9. 2. Description des manifestations par systèmes biologiques et organes cibles:

III. 9. 2. 1. L'hépatotoxicité:

C'est une atteinte du foie. Le **foie** est un organe vital, tout comme le cœur et les poumons. Il remplit de multiples fonctions et son rôle est très important dans le maintien de l'équilibre général. Il participe à la digestion, à l'emmagasinage des aliments ainsi qu'à la détoxification, en aidant l'organisme à se débarrasser de ses poisons, et à l'élimination. Il a un rôle important dans la transformation des substances circulant dans le sang, dont les substances toxiques qui y sont véhiculées et qui dans plusieurs cas peuvent y être neutralisées. C'est une cible pour de nombreux toxiques à cause de son important débit sanguin et de sa situation par rapport à la circulation sanguine (ex. : le tétrachlorure de carbone, le diméthylformamide, l'ingestion chronique abusive d'alcool éthylique).

III. 9. 2. 2. La néphrotoxicité :

C'est un effet toxique sur le **rein**. Le rein est l'organe d'élimination responsable de la sécrétion de l'urine. Il joue un rôle dans la régulation de l'équilibre des liquides du corps et contribue à débarrasser le sang de ses impuretés, et notamment de certains toxiques (ex. : le cadmium, le chloroforme).

III. 9. 2. 3. La neurotoxicité :

C'est un effet toxique sur le **système nerveux**. Le système nerveux est un ensemble de cellules spécialisées ou non dont l'unité fondamentale est le neurone. Les neurones assurent le transfert de l'information (influx nerveux) d'une partie du corps à une autre afin d'assurer le fonctionnement interne de l'organisme et ses relations avec le milieu extérieur. Le système nerveux est formé de deux ensembles, le système nerveux central (dont l'abréviation courante est S.N.C.) et le système nerveux périphérique (S.N.P.).

Le système nerveux central comprend l'encéphale, lequel est constitué des organes situés dans la boîte crânienne (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et de la moelle épinière. Le **système nerveux périphérique** est quant à lui constitué par les nerfs et leurs renflements (ganglions nerveux). Il existe diverses catégories d'effets neurotoxiques. Donnons comme exemples :

- la dépression du système nerveux central, dont les symptômes sont des maux de tête, des nausées, des vomissements, des étourdissements, etc. qui se manifestent à la suite d'une exposition à des solvants tels que le toluène et le xylène;
- la neuropathie périphérique (affection du système nerveux périphérique) qui peut être produite par des solvants tels que le n-hexane;
- le tétanos, qui consiste en des contractures musculaires et qui est causé par une toxine biologique produite par le *Clostridium tetani*. Cette dernière peut pénétrer dans l'organisme à la suite d'une lésion de la peau ou des muqueuses (ex. : blessure avec un clou) ou à l'occasion de travaux agricoles; et
- la paralysie musculaire causée par une toxine biologique produite par le *Clostridium botulinum* et qui peut résulter de l'ingestion de certains aliments avariés ou de la contamination d'une plaie faite au moment de la manipulation d'un objet contaminé.

III. 9. 2. 4. La dermatotoxicité :

On regroupe sous ce terme l'ensemble des effets toxiques des substances sur la **peau** (dermatose, sensibilisation cutanée). On utilise généralement l'expression dermatoses professionnelles pour les affections de la peau (dermatoses) pour lesquelles un lien a été établi entre la cause et le milieu de travail. Ce sont :

- les dermatoses qui proviennent exclusivement du milieu de travail, à l'occasion d'un contact cutané avec des produits, irritants et corrosifs, ou qui sont consécutives à une intoxication systémique, comme dans le cas de la chloracnée causée par des dioxines (que l'on trouve comme contaminant dans certains produits à base de biphényles polychlorés ou BPC) ; et
- les dermatoses aggravées par le milieu de travail, comme celles qui peuvent être aggravées par un travail en milieu humide.

III. 9. 2. 5. La toxicité de l'appareil respiratoire :

L'**appareil respiratoire** est constitué des voies aériennes supérieures (nez, pharynx ou gorge), de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires. L'humain est exposé par inhalation à divers agents qui existent sous plusieurs formes (gaz, vapeur, gouttelettes, fines particules) et en diverses tailles et qui ont leur toxicité et leurs caractéristiques physiques propres.

Les toxiques présents dans l'air inspiré sont absorbés dans l'organisme par les voies respiratoires pour ensuite se distribuer dans d'autres tissus et y exercer un effet systémique (dépression du système nerveux central causée, par exemple, par l'inhalation de fortes doses de toluène ou d'essence).

Outre les effets de certains gaz et de certaines vapeurs, signalons également la **pneumoconiose**, maladie pulmonaire causée par l'inhalation prolongée de poussières, la **silicose**, causée par l'inhalation de silice cristalline (maladie qui apparaît généralement après plus de 20 ans d'exposition), l'**emphysème** et le **cancer du poumon**, causés par la fumée de cigarette, et l'**asthme**, induit par des spores de moisissures (ex. : aspergillus) ainsi que par certains enzymes contenus dans des détergents (ex. : les subtilisines).

III. 9. 2. 6. La toxicité cardiovasculaire :

Ce sont les effets sur le **cœur** et les **vaisseaux sanguins**. L'exposition aiguë à des doses élevées de certains fréons, comme le fréon 113, peut provoquer des troubles du rythme cardiaque, tels qu'un ralentissement des battements du cœur (bradycardie).

III. 10. Toxicité des flavonoïdes :

Puisqu'ils sont présents dans la denrée alimentaire de l'homme et ses boissons, et même très utilisées dans les plantes médicinales depuis il y a très longtemps, les flavonoïdes sont considérés comme des produits très peu toxiques, néanmoins cette famille de produit a divers types d'activités dans les cellules mammifères, c'est pour ça il est nécessaire d'explorer ses activités in vivo, afin de maîtriser la toxicité des flavonoïdes, pour les exploiter sans risque dans le domaine de la médecine moderne, cette dernière a vraiment besoin des flavonoïdes, avec leurs activités thérapeutiques diverses et multiples pour aboutir à des diagnostics et des remèdes des différentes maladies. [79]

IV. 1. L'étude chimique de l'espèce: *Centaurea dimorpha* :

IV. 1. 1. La matière végétale :

La matière végétale a été récoltée durant le mois de mai 2008 des environs de la ville de M'SILA, nous n'avons pris en considération que les parties aériennes de la plante.

L'opération de séchage est effectuée dans l'ombre, et loin de l'humidité, la masse de la plante était de 482g.

IV. 1. 2. Description botanique de la plante :

Plante désertique, épines centrales des bractées moyennes ne dépassent pas 15mm de longueur, accompagnées par 4-6 épines basales, épines plus foncées que le corps de la bractée plante à aspect de c-sphaerophala, pubescente tiges, ailées à ailes faiblement épineuses, de 20-30cm, souvent couchées et naissant alors sous un capital central subsessile dans une rosette de feuilles. Akènes de 4mm sur 2, tachetés à aizette plus courte ou subégale et à hile très gros lieux sablonneux.

IV. 1. 3. Place dans la systématique :

Embranchement:	Angiospermes
Classe:	Dicotylédones
Famille:	Composées
Ordre:	Asterales
Tribu:	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce:	<i>Centaurea dimorpha</i>

IV. 2. Extraction :

Après le broyage de la plante, la matière végétale obtenue est mise à une macération dans le méthanol froid, cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures.

Après concentration sous vide à 35°C, l'extrait méthanolique obtenu est dilué avec de l'eau distillée à raison de 500ml pour 1 kg de matière sèche, puis filtration.

-La phase organique est séparée par l'incorporation du CH_2Cl_2 trois fois au filtrat, après la troisième fois la solution est laissée une nuit

La phase organique obtenue après les trois séparations par décantation est séchée par l'addition du dessiccateur Na_2SO_4 anhydre, puis elle est filtrée et concentrée à 35°C.

La masse de l'extrait brut du CH_2Cl_2 était de 1.6g.

-La phase aqueuse a subi une extraction trois fois avec l'acétate d'éthyle (AcOEt), la masse de l'extrait brut de (AcOEt) était de 3g.

-La phase aqueuse a subi une extraction trois fois avec le n-Butanol, la masse de l'extrait brut de n-Butanol était de 5g.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 14

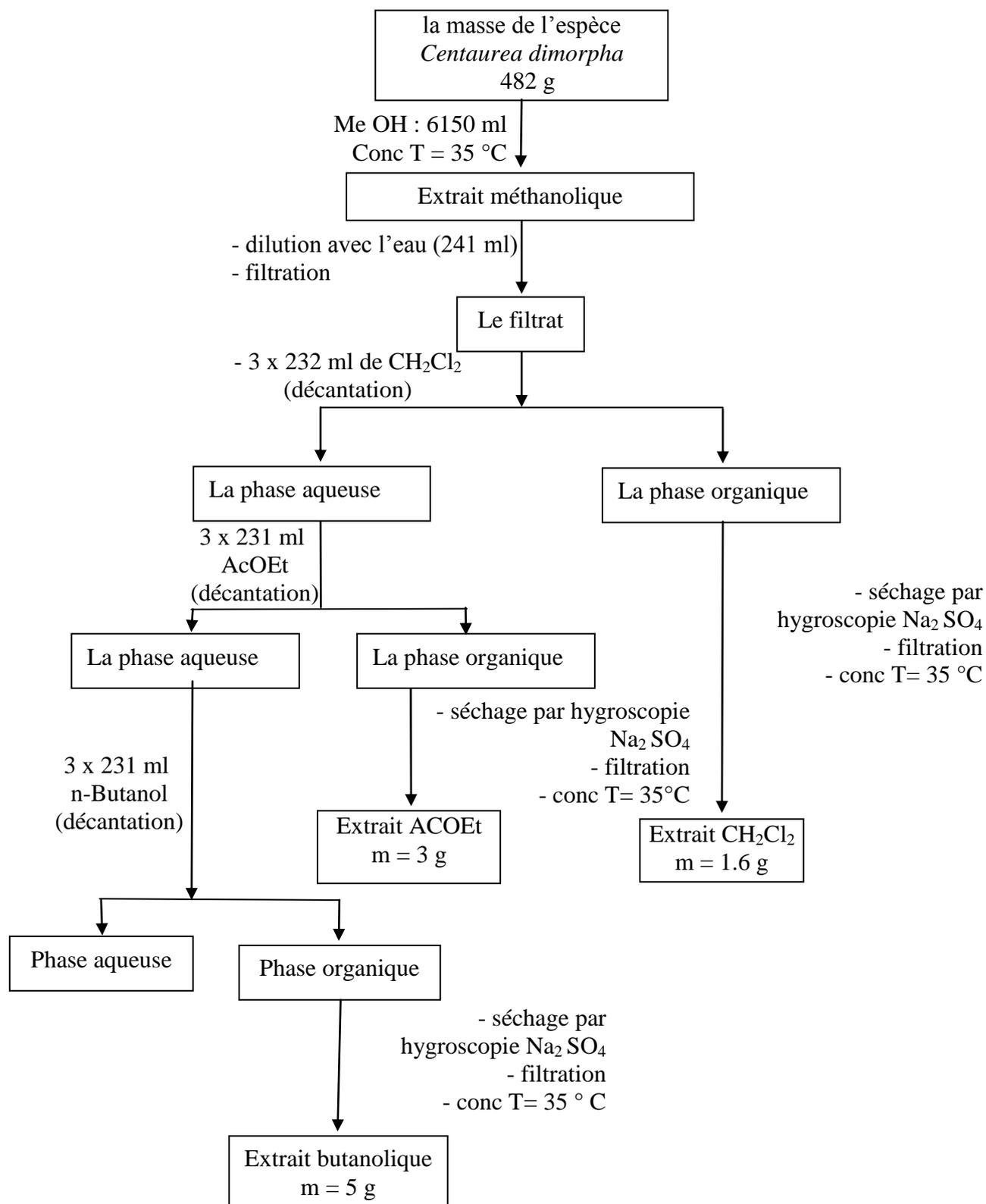


Fig 13: Protocole d'extraction de l'espèce « *Centaurea Dimorpha* »

IV. 3. Séparation chromatographique de l'extrait CH₂Cl₂ :

Le fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ (1.6g) est réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice (60; 0,040-0,063mm) préparé dans le (n-Hexane).

L'éluant utilisé est le n-Hexane, avec l'addition progressive de l'acétate d'éthyle (AcOEt), le volume des échantillons prélevé de la colonne était de 100ml, et les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince (feuilles d'aluminium, gel de silice 60 F₂₅₄ avec 0,2mm d'épaisseur), les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365 nm, puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique (H₂SO₄) et d'acétate d'éthyle (AcOEt), et chauffées pendant 3 minutes à 100°C .

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 13

Tableau 13 : Les fractions obtenues

N° de la fraction	Les échantillons	Système d'élution		Observations
		n-Hexane	AcOEt	
F1	1-5 6-9 10-13 14-17	100%	0%	Des graisses
F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14	18 19 20 21 22-23 24-26 27-29 30-33 34-38 39-41 42-57 58-83 84-88	9	1	Mélange
F15 F16 F17 F18 F19 F20 F21 F22 F23	89-91 92-99 100-101 102 103-112 113-143 144-170 171-191 192-200	7	3	Mélange
F24 F25 F26 F27	201-218 219-220 221-239 240-257	1	1	Mélange
F28 F29 F30	258-266 267-284 285-310	1	2	Mélange
F31	311-318	0%	100%	Mélange complexe
F32	319-324	100% Méthanol	100% Méthanol	Mélange complexe

-à partir de la fraction F₁₉, les deux produits F₁₉A et F₁₉B ont été séparés par chromatographie sur couche mince (poly-amide) par le système :
(Toluene : Méthanol : Méthyl éthyl cétone) (4:3:3).

V. 1. Elucidation des produits :

V. 1. 1. Elucidation du produit F₁₉B :

V. 1. 1. 1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton:

Le profil du spectre RMN ¹H enregistré dans le DMSO, oriente vers la structure d'un Flavonoïde. (Annexe : Fig 17)

On remarque sur le spectre:

Un singulet d'intégration 1H à 6,78 ppm, attribuable à H₈.

Un singulet d'intégration 1H à 6,84 ppm attribuable à H₃.

Un doublet d'intégration 2H à 6,91 ppm attribuable à H_{3'} et H_{5'}.

Un doublet d'intégration 2H à 7,90 ppm attribuable à H_{2'} et H_{6'}.

Un singulet d'intégration 3H à 2,52 ppm attribuable au groupe (-OCH₃).

Un singulet d'intégration 1H à 13,04 ppm attribuable au groupe (-OH).

Le tableau 15 présente tous ces résultats:

**Tableau 14: Déplacements chimiques
du spectre RMN ¹H (400 MHz, DMSO) du produit F₁₉B**

Le déplacement chimique (ppm)	L'intégrale	La multiplicité	la constante de couplage J (Hz)	Proton correspondant
6,78	1H	Singulet	S	H ₈
6,84	1H	Singulet	S	H ₃
6,91	2H	doublet	7.08	H _{3'} et H _{5'}
7,90	2H	doublet	7.08	H _{2'} et H _{6'}
2,52	3H	Singulet	S	(-OCH ₃)
13,04	1H	Singulet	S	(-OH)

Et pour confirmer les positions des deux protons (H₃ et H₈), on a utilisé la technique de l'RMN bidimensionnelle (HSQC et COESY).

Le spectre HSQC (Annexe : Fig 18), montre que l'atome de carbone C₈ qui a un déplacement chimique caractéristique(95.6 ppm), est relié directement au proton H₈ lequel son déplacement chimique est de 6,78ppm, et que l'atome de carbone C₃ qui a un déplacement chimique caractéristique de (104.3 ppm), est relié directement au proton H₃ qui a comme déplacement chimique la valeur 6,84ppm.

Les autres corrélations obtenues dans le spectre HSQC (Annexe : Fig 18) et le spectre COESY (Annexe : Fig 19) de chaque proton correspond exactement à leurs atomes de carbones mentionnés dans le spectre RMN ^1H (Annexe : Fig 17)

V. 1. 1. 2. Le comportement chromatographique du produit F₁₉ B :

Tableau 15 : Comportement chromatographique du produit F₁₉ B

Système	S1	S2	S3
R _f	0.53	0.90	0.04
Couleur sous UV	violet	violet	violet

Le système S1 : (4 : 3 : 3) (Toluène : MeOH : Méthyléthylcétone).

Le système S2 : BAW (4 : 1 : 5). (Butanol : acide acétique : eau)

Le système S3 : acide acétique à 15%.

V. 1. 1. 3. La spectroscopie UV-Vis du produit F₁₉B :

La couleur violette sous UV, plus la valeur maximale de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 335,5nm oriente vers la structure d'un flavone.

L'addition du réactif NaOH provoque un déplacement bathochromique de +60 nm de la bande I sans diminution de l'intensité prouve la présence d'un groupement (-OH) dans la position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à 325,5 nm montre la présence d'un groupe (-OH) en position 7, ceci est confirmé aussi par le déplacement bathochromique de +5 nm de la bande II du méthanol après l'ajout du NaOAc.

Il n'y a pas de déplacement de la bande I après comparaison des deux spectres : AlCl₃/ (AlCl₃+HCl), indique l'absence du groupement ortho di OH sur le cycle B. (Annexe : Fig 20).

Ces résultats obtenus sont représentés sur le tableau suivant :

Tableau 16 : Résultats de la spectroscopie UV-Vis du produit F₁₉B:

Les indicateurs	La bande (I) (nm)	La bande (II) (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	335,5	268,5	
NaOH	395.5	275.5	325.5
NaOAc	348.5	272.5	
AlCl ₃ + HCl	346	275,5	383,5
AlCl ₃ + (HCl + AlCl ₃)	346	276	

La combinaison de ces données spectrales UV et RMN orientent vers la structure suivante:

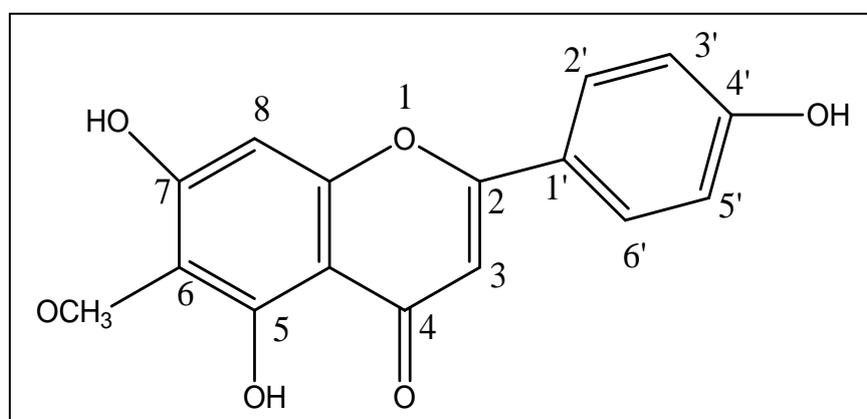


Fig 14 : Structure chimique du produit F₁₉B

Le nom du produit F₁₉B est. **4', 5,7-trihydroxy 6-methoxyflavone** et il est connu sous le nom Hispiduline.

V. 1. 2. Elucidation du produit F₁₉A :

V. 1. 2. 1. La spectroscopie RMN ¹H du produit F₁₉A :

Le spectre RMN ¹H (Annexe : Fig 21) du produit F₁₉A montre :

- apparition d'un doublet à $\delta = 7,86$ ppm attribuable aux H₂,H₆.
- l'apparition d'un doublet à $\delta = 6,93$ ppm attribuable aux H₃,H₅.
- l'apparition d'un singulet à $\delta = 6,60$ ppm correspondant à H₃.
- l'apparition de deux doublets à 6.46 ppm et à 6.21 ppm attribuable à H₈ et H₆ respectivement.

Le tableau 18 présente tous ces résultats:

Tableau 17 : Déplacements chimiques du spectre RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) du produit F₁₉A

Le déplacement chimique (ppm)	L'intégrale	La multiplicité	la constante de couplage J (Hz)	Proton correspondant
7,86	2H	doublet	8.8	H ₂ ,H ₆
6.93	2H	doublet	8.8	H ₃ ,H ₅
6.60	1H	singulet	S	H ₃
6.46	1H	doublet	2.1	H ₈
6.21	1H	doublet	2.1	H ₆

V. 1. 2.2. Le comportement chromatographique du produit F₁₉ A:

Tableau 19 : Comportement chromatographique du produit F₁₉ A:

Système	S1	S2	S3
R _f	0.65	0.02	0.07
Couleur sous UV	violet	violet	violet

Le système S1 : (4 : 3 : 3) (Toluène : MeOH : Méthyléthylcétone).

Le système S2 : BAW (4 : 1 : 5). (butanol : acide acétique : eau)

Le système S3 : acide acétique à 15%.

V. 1. 2. 3. La spectroscopie UV-Vis :

Le spectre UV-Vis du produit F₁₉B dans le méthanol montre qu'il est un Flavone, sa coloration violette sous UV, ainsi que la valeur maximale d'absorbance de la Bande I en présence du méthanol, qui correspond à la longueur d'onde 336nm indique qu'il est un Flavone, c'est-à-dire il ne contient pas de groupement (-OH) en position 3.

Le déplacement bathochromique de la bande I de + 63 nm suite à l'addition de NaOH avec le maintien de la même intensité de l'absorbance prouve qu'il existe un groupe (-OH) en position 4'. avec l'apparition d'un nouveau maximum d'absorbance à 325 nm qui indique l'existence d'un groupement (-OH) à la position 7, cet argument est confirmé par le déplacement bathochromique de la bande II de +6 nm après l'ajout du réactif NaOAc.

L'absence d'un déplacement hypsochromique de la bande I après comparaison des deux spectres AlCl₃ /(AlCl₃+HCl) indique qu'il n'y a pas de groupement ortho di OH sur le cycle B. Par contre l'apparition d'un déplacement bathochromique de la bande I de + 45 nm après la superposition des deux spectres (MeOH- AlCl₃+ HCl) prouve qu'il y a un groupement (-OH) en position 5. (Annexe : Fig 22)

Tous ces résultats sont mentionnés sur le tableau suivant :

Tableau 20 : Résultats de la spectroscopie UV du produit F₁₉A

Les indicateurs	La bande (I) (nm)	La bande (II) (nm)	Autres bandes (nm)
MeOH	336	269	
NaOH	399	275	325
AlCl ₃	381	276	301-341
AlCl ₃ + HCl	381	277	300-339
NaOAc	371	275	301

D'après tous ces résultats, la structure du produit est la suivante :

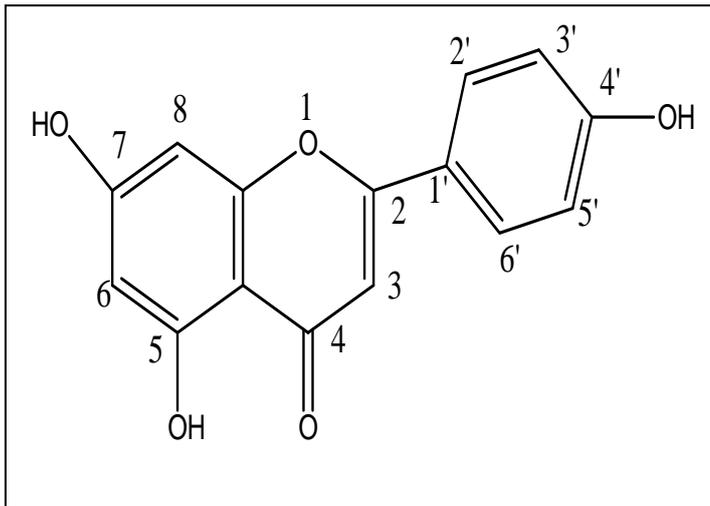


Fig 15 : Structure chimique du produit F₁₉A

5, 7,4'Trihydroxy flavone. Il est connu sous le nom Apigénine.

VI. Tests Biologiques des extraits des espèces *Centaurea dimorpha*, *Centaurea pullata* et de *Centaurea niceansis* :

VI. 1. Etude de la toxicité de l'extrait chloroformique de l'espèce *Centaurea dimorpha* :

VI. 1. 1. Animaux utilisés :

Les études de toxicité aigue sont généralement effectuées sur des rongeurs, et plus particulièrement sur des souris, pour réduire le coup de l'expérimentation et du fait de leur grande sensibilité au pouvoir toxique des drogues.

Des souris blanches (*Mus musculus*) de 75 à 90 jours, pesant 25 à 30g, de souche Swiss, sont utilisées pour les tests toxicologiques.

VI. 1. 2. Procédure expérimentale :

6 souris adultes, males (M) et femelles (F), pesant (20-25)g ont été répartis dans 5 cages plastiques individuelles, avec un libre accès à l'eau et à la nourriture composée d'orge, cicalime et grains de tournesol.

La 1^{ère} cage Témoin (cage de contrôle) contient : 2 souris (1 males et 1 femelle), injectées par de l'eau distillée.

La 2^{ème} cage : contient 1 souris male, injectée par le produit F₁₉B.

La 3^{ème} cage : contient 1 souris femelle, injectée par le produit F₁₉B.

La 4^{ème} cage : contient 1 souris male, injectée par le produit F₁₉A.

La 5^{ème} cage : contient 1 souris femelle, injectée par le produit F₁₉A.

Après avoir soumis les animaux à un jeûne de 24 heures, les différentes solutions sont administrées par voie orale, au volume de 1 ml. La dose administrée est de : 25 mg/kg Poids Corporel.

L'administration du produit est réalisée par gavage (voie orale) à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire.

VI. 1. 3. Le stade d'observation :

Les signes cliniques apparus chez chaque groupe de souris ont été observés continuellement pour une heure après administration et par intervalle de 4 heures au-delà d'une période de 24 heures.

L'observation des symptômes cliniques a été étendue le long de la toxicité aigue (14 jours) chaque jour, pour déceler les effets retardés de l'extrait. Ce suivi des signes cliniques de la

toxicité aigue rend compte des organes cible du médicament (qui sont préférentiellement atteints par le toxique).

VI. 1. 4. Les résultats pharmacotoxicologiques (les signes cliniques sur les souris) :

Le lot contrôle (0 g/Kg) contenant les souris gavées par l'eau distillée n'a montré aucun signe clinique.

L'administration des deux produits élucidés dans la partie chimique; a montré quelques signes cliniques habituels: l'anorexie et l'asthénie, mais pas de symptomatologies cliniques graves durant les 14 jours d'observation.

Les signes observés sont disparus après (4 à 8) heures du gavage, et n'ont pas été reconstaté pendant les 13 jours restants.

Les tableaux (21 et 23) montre les différents signes cliniques observés (1^{er} jour), les observations sont effectuées directement après gavage de la dose aigue, puis chaque 4 heures.

Les tableaux (22 et 24) présente les différents signes cliniques observés chaque jour des (13 jours restants),

Tableau 20: Signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant le 1^{er} jour après traitement aigu du produit F₁₉B.

Dose / Heure	Sex	(0-4)h	(4-8)h	(8-12)h	(12-16)h	(16-20)h	(20-24)h
0 (Témoin)	M	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	F	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
25 mg/kg	M	An+As	An	Ø	Ø	Ø	Ø
	F	An+As	As	Ø	Ø	Ø	Ø

Légende:

Ø : aucune anomalie. **An** : Anorexie. **As** : Asthénie. **Sa** : Salivation. **Sy** : Syncope.

H: Hypoactivité. **T** : tremblement.

Les signes (**Sa. Sy. H.T**) n'ont pas été remarqué.

Tableau 21: signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant les 13 jours restants après traitement aigu du produit F₁₉B.

Dose / Jour	Sex	2 J	3 J	4 J	5 J	6 J	7 J	8 J	9 J	10 J	11 J	12 J	13 J	14 J
0(Témoin)	M	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	F	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	M	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	F	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Tableau 22: signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant le 1^{er} jour après traitement aigu du produit F₁₉A.

Dose / Heure	Sex	(0-4)h	(4-8)h	(8-12)h	(12-16)h	(16-20)h	(20-24)h
0 (Témoin)	M	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	F	∅	∅	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	M	An+As	As	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	F	An+As	As	∅	∅	∅	∅

Tableau 23: signes cliniques de la toxicité aigue chez les 3 groupes de souris, pendant les 13 jours restants après traitement aigu du produit F₁₉A.

Dose / Jour	Sex	2 J	3 J	4 J	5 J	6 J	7 J	8 J	9 J	10 J	11 J	12 J	13 J	14 J
0 (Témoin)	M	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	F	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	M	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
25 mg/kg	F	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

D'après tous ces résultats, on peut constater que les flavonoïdes du genre *centaurea dimorpha* ne sont pas toxiques.

VI. 2. Etude de l'activité antibactérienne des l'extraits d'acétate d'éthyle des espèces : *Centaurea pullata* et de *Centaurea niceansis* :

VI. 2. 1. Protocole expérimentale :

Une concentration de 2% de chaque extrait préparée dans le DMSO a été évaluée pour son activité antibactérienne, en utilisant la méthode de diffusion par disque. Les souches bactériennes utilisées sont les suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter Sp.* Les souches bactériennes sont obtenues du Département de Microbiologie, Faculté de Pharmacologie, Université d'Azhar Egypt. Les Souches sont maintenues dans un agar nutritif et chaque souche bactérienne est utilisée à un inoculum (10^8 cellules/ml).

Les boîtes de pétri sont remplies par 20 ml de milieu de culture Muller-Hinton ensemencé par la suspension bactérienne. 5 disques de papier Wattman (1.16) stérilisé de diamètre de 6mm imprégnés de 0,1 ml d'extrait végétal (2%) sont placés dans chaque boîte de pétri. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 24 h à 37°C. Le Kanamycine (30µg/disc) est utilisé comme témoin de contrôle.

VI. 2. 2. Résultats des essais sur l'activité antibactérienne :

Les résultats sont obtenus en mesurant la zone d'incubation en mm. La discussion est faite en comparant la zone d'incubation de chaque extrait à celle du témoin de contrôle l'antibiotique Kanomycine (30µg/disc).

Tableau 24: résultats des tests sur l'activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle des espèces : *Centaurea pullata* et de *Centaurea niceansis*:

Microorganismes	Zone d'inhibition (mm)		Kanomycine (30µg/disc)
	Extrait C.niceansis 2 %	Extrait C.pullata 2%	
<i>Staphylococcus Aureus</i>	10	14	22
<i>Bacillus subtilis</i>	9	12	19
<i>Escherichia coli</i>	10	12	16
<i>Proteus mirabilis</i>	13	13	10
<i>Klebsiella pneumonia</i>	10	10	13
<i>Pseudomonas auginosa</i>	12	11	15
<i>Citrobacter Sp</i>	9	11	15

D'après les résultats du tableau 25; on remarque que le pouvoir d'inhibition des deux extraits sur les 7 types de bactéries, est proche de celui de l'antibiotique témoin Kanomycine (30µg/disc), avec une meilleure inhibition pour le type de bactérie *Proteus mirabilis*. Qui est supérieur à celui de l'antibiotique témoin *Proteus mirabilis*.

Cette activité antibactérienne des deux extraits a été réalisée pour nous par le Docteur Ahmed Menad du Département de Biologie, Université Mentouri de Constantine, et elle n'a pas été exploitée auparavant.

Conclusion générale

Le but de ce travail est la séparation et la détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce "*Centaurea dimorpha*".

Nous avons séparé à partir de cette espèce deux flavonoïdes, en utilisant les techniques chromatographiques: (chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince). Les structures ont été établies en utilisant les méthodes spectroscopiques : RMN et UV-Vis.

Ces composés sont de type flavones : 4', 5,7-Trihydroxy flavone, et 4', 5,7-trihydroxy 6-méthoxyflavone.

Ces deux produits étaient sujets de test pharmacotoxicologiques in vivo (des souris), d'où les résultats ont confirmés une toxicité très minime des flavonoïdes.

Les deux autres espèces du même genre *Centaurea*, qui ont été utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne, ont prouvé l'effet bactéricide du genre *Centaurea*.

Les perspectives de recherche futures sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce "*Centaurea dimorpha*", afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- Etudier d'autres activités de ces métabolites (anti-inflammatoire, anticancéreuse) afin de confirmer ou d'infirmer l'activité biologique attribuée à cette espèce.

Références bibliographiques

- [1] J. Menz, R.k. Winkelmann, contact dermatitis, 1987, 16, p169.
- [2] F. Bohlmann, S. postulka et J. Ruhuke. chem.Ber.1988, 91, p1462.
- [3] P. Aclinou, A. Boukerb, J. Bouquant et G. massiot, plantes des aures, constituants des racines de centaurea, plantes med et phytothérapie, 1982, p303.
- [4] J. M Viguera, j.sanchez et i.sanchez grassas yaceites, 1996, 15, p181
- [5] R. Riberan gayon-les composés phénoliques des végétaux dunod, paris, 1968.
- [6] a.g.gonzalez, j.m.ortega, j.bermjo et j.l.breton. anales.Soc.Esp.Fis.Quin, 1971, 67, P1243
- [7] H. Skaltsa, D. Lazari, C, Panagouleas, E. Georgiadou, B. garcia et M. S. Sokovic, Phytochemistry, 2000, 55(8), p 908.
- [8] KH. M. Alimov, Questions of pharmacy and pharmacology, Tashkent, 1973, 1, p 94.
- [9] P. Ribereau, Les composés phénoliques des végétaux, 1968.
- [10] Jean Bruneton, Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales, 3^{ème} édition, 1993.
- [11] Jean – François Gonnet, Thèse Lyon, 1989.
- [12] K. R. Markham, Techniques of flavonoïdes identification, 1982, *Academic press*.
- [13] J. B. Harbone, The flavonoïdes, published in 1988 by Champman et Hall.
- [14] Alain Puppo, Phytochemistry, Vol 31, 1992, p 88.
- [15] J. B. Harbone et T.J. Marbry, The flavonoïdes, , Tome II, *academic press*, 1975.
- [16] J. B. Harbone, The flavonoïdes, Advances in Research Science 1986, Published in 1993 by Chapman and Hall.
- [17] M. Paris et M. Hurabielle, Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome I, 1981, Ed: Masson.
- [18] M. G. L. HERTOOG, P. C. H. HOLLMANN. and D.P . VENEMA, Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40 (9), p1591.

- [19] H. M. MELTZER, and K. E. MALTERUD. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scand. J. Nutr.* 1997 , 41 (2), p 50
- [20] N. C. COOK, and S. SAMMAN. Flavonoids-chemistry, Metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem*, 1996 vol 7 (février).
- [21] M. G. L. HERTOOG, P.C. H. HOLLMANN, M.B. KATAN and D.KROMHOUT. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, 1993, 20, p 21.
- [22] L. E. VOORRIPS, R. A. GOLDBOHM, D. T. VERHOEVEN, G. A. Van POPPEL, F. STURMANS, R. J. HERMUS, and P. A. Vanden BRANDT, Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer (Abstr.), *Cancer Causes and Control* 2000, 11(2), p 101.
- [23] E.DORANT, P.A. Vanden BRANDT, R.A. GOLDBOHM, and F. STURMANS, Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma. *Gastroenterology* 1996. 110 (1), p 12.
- [24] H. ADLERCREUTZ, Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection, *Environ. Health Perspect.* 1995, 103 (Suppl 7), p 103.
- [25] P.C. H. HOLLMAN, and KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man, *Arch. Toxicol. Suppl.* 1998, 20, p 237.
- [26] H. BÖHM, H. BOEING, J. HEMPEL, B. RAAB and A. KROKE, Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen., *Z. Ernährungswiss*, 1998, 37 (2), p 147.
- [27] M. G. L. HERTOOG, E. J. M. FESKENS, P. C. H. HOLLMANN, M. B. KATAN and D. KROMHOUT, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet.* 1993, 342 (8878), p 1007
- [28] P. KNEKT, R. JÄRVINEN, A. REUNANEN and J. MAATELA, Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *B.M.J.*, 1996, 312 (7029), p 478.
- [29] M. G. L. HERTOOG, E. J. M. FESKENS, and D. KROMHOUT, Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk, *Lancet.*, 1997, 349(9053), p 699.
- [30] L. YOCHUM, L. H. KUSHI, K. MEYER, and A. R. FOLSOM, Dietary

- flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *Am. J. Epidemiol.* 1999, 149 (10), p 943.
- [31] E. B. RIMM, M. B. KATAN, A. ASCHERIO, M. J. STAMPFER, and W. C. WILLETT, Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Ann. Intern. Med.* 1996 125 (5), p 384.
- [32] P. KNEKT, S. ISOTUPA, H. RISSANEN, M. HELIÖVAARA, R. JÄRVINEN, S. HÄKKINEN, A. AROMAA, and A. REUNANEN, Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2000, 54 (5), p 415.
- [33] M.G.L. HERTOOG, P.M. SWEETNAM, A. M. FEHILY, P. C. ELWOOD, and D. KROMHOUT, Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 65 (5), p 1489
- [34] M. G. L. HERTOOG, E. J. M. FESKENS, P. C. H. HOLLMANN, M. B. KATAN, and D. KROMHOUT, Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study, *Nutr. Canc.*, 1994, 22 (2), p175.
- [35] R. A. GOLDBOHM, P.A. Vanden BRANDT, M. G. L.HERTOOG, H. A. M. BRANTS and G. Van POPPEL, Flavonoid intake and risk of cancer: A prospective cohort study (Abstr.), *Am. J. Epidemiol. Suppl.* 1995, 61S, p 141.
- [36] R. GARCIA-CLOSAS, A. AGUDO, C. A. GONZALEZ and E. RIBOLI, Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain, *Nutr. Cancer*, 1998, 32 (3), p154.
- [37] P. KNEKT, R. JÄRVINEN, R. SEPPÄNEN, M. HELIÖVAARA, L. TEPPÖ, E. PUKKALA and A. AROMAA, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am. J. Epidemiol.* 1997, 146 (3), p 223.
- [38] GARCIA-CLOSAS, R., GONZALEZ, C.A., AGUDO, A. and RIBOLI, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain, *Cancer Causes Control*, 1999, 10 (1), p 71.
- [39] C. F. SKIBOLA, and M.T SMITH, Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol. Med*, 2000, 29 (3/4), p 375.
- [40] C. A. RICE-EVANS, N. J. MILLER, P. G. BOLWELL, P. M. BRAMLEY, and

- J. B. RIDHAM, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res*, 1995, 22 (4), p 375.
- [41] F. SHAHIDI, and P. K. J. P. D. WANASUNDARA, Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 1992, 32 (1), p 67.
- [42] T. YOKOZAWA, C. P. CHEN, E. DONG, T. TANAKA, G. I. NONAKA and I. NISHIOKA, Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochem.Pharmacol.*, 1998, 56(2), p 213.
- [43] G. CAO, E. SOFIC and R. L. PRIOR, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med*, 1997, 22 (5), p 749.
- [44] J. L. RIOS, S. MAÑEZ, M. PAYA, and M. J. ALCARAZ, Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*, *Phytochemistry*, 1992, 31, p 1947.
- [45] K. KITTA, Y. HAGIWARA, and T. SHILAMOTO, Antioxidative Activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from *Green barley leaves*, *J. Agric. Food. Chem*, 1992, 40, p 1843.
- [46] P. COS, L. YING, M. CALOMME, , J. P. HU, K. CIMANGA, B.V. POEL, L. PIETERS, A. J. VLIETINCK and D. V. BERPHE Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, *J. Nat. Prod*, 1998, 61, p 71.
- [47] R. A. DIXON, P. M. DEY and C. J. LAMB, Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol*, 1983, 55, p1.
- [48] M. M. COWAN, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev*, 1999, 12 (4), p 564.
- [49] M. C. RECIO, J. L. RÍOS and A. VILLAR, A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phytother. Res*, 1989, 3 (4), p 117.
- [50] S. CHABOT, R. BEL-RHLID, R. CHÊNEVERT and Y. PICHÉ, yphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions, *New Phytol*, 1992, 122 (3), p 461.
- [51] J. C. IBEWUIKE, F. O. OGUNGBAMILA, A. O. OGUNDAINI, I. N . OKEKE and L. BOHLIN Antiinflammatory and antibacterial activities of C-

- méthylflavonoids from *Piliostigma thonningii*, *Phytother. Res*, 1997, 11 (4), p 281.
- [52] H. TSUCHIYA, M. SATO, T. MIYAZAKI, S. FUJIWARA, S. TANIGAKI, M. OHYAMA, T. TANAKA and M. IINUMA, Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol*, 1996, 50(1), p 27.
- [53] M. SATO, S. FUJIWARA, H. TSUCHIYA, T. FUJII, M. IINUMA, H. TOSA and Y. OHKAWA, Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria, *J. Ethnopharmacol.*, 1996, 54(2.3), p 171.
- [54] L. MENDOZA, M. WILKENS, and A. URZÚA, Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.*, 1997, 58(2), p 85.
- [55] S. K. WAAGE, and P. A. HEDIN, Quercetin 3-O-galactosyl-(16)-glucoside a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity, *Phytochemistry*, 1985, 24(2), p 243.
- [56] M. L. TERESCHUK, M. V. Q. RIERA, G. R. CASTRO and L. R. ABDALA, Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*, *J. Ethnopharmacol*, 1997, 56(3), p 227.
- [57] A. MORI, C. NISHINO, N. ENOKI and S. TAWATA. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, 1987, 26(8), p 223.
- [58] R. PUUPPONEN-PIMIÄ, L. NOHYNEK, C. MEIER, M. KÄHKÖNEN, M. HEINONEN, A. HOPIA and K. M. OKSMAN-CALDENTY Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *J. Appl. Microbiol*, 2001, 90(4), p 494.
- [59] P. M. DEY and J. B. Harborne, *Methods in Plant biochemistry*, Academic Press INC. 1989, p 287.
- [60] I. KUBO, I. KINST-HORI, S. K. Y. CHAUDHURI, KUBO, Y. SANCHEZ and T. OGURA, Flavonols from *Heterotheca inuloides*, Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria, *Bioorg. and Med. Chem*, 2000, 8, p 1749.
- [61] S. J. LEE, H. Y. CHUNG, I. K. LEE, S. U. OH, and I. D. YOO, Structure-

- Activity relationship of Dietary Flavonoids for Inhibitory Activity of Mouse Brain Monoamine Oxidase (MAO) *in vitro*, *Food Sci. Biotechnol*, 2000, 9, p 304.
- [62] K. YAMAKI, D. H KIM, N. RYU, Y. P. KIM, K. H. SHIN, and K. OHUCHI, Effects of Naturally Occurring Isoflavones on Prostaglandin E₂ roduction, *Planta Med*, 2002, p 97.
- [63] PUPPO, A. Effects of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-type Rection, Influence of the Iron Chelator, *Phytochemistry*, 1992, 31, p 85.
- [64] B. HAVSTEEN, *Biochem. Pharmacol*, 1993, 32, p 1141.
- [65] H. MATSUDA, M. YANO, M. KUBO, M. LINUMA, M. OYAMA and M. MIZUNO, Pharmacological Study on *Citrus* fruits unshiu Markovich (2) on Flavonoid Components, *Yakugata Zasshi.*,1991, 111, p 193.
- [66] T. NAKAJIMA, M. I. MANISHI, K. YAMAMOTO, J. C. CYONG and K. HIRAI, Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in *Scutellaria* Root, on Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts, *Planta Med*. 2001, 67, p 132.
- [67] J. A. EMIN, A. B. OLIVEIRA, and A. J. LAPA, Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of a *Citrus* Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46, p. 118.
- [68] E. M. GALATI, M. T. MONFORTE, S. KIRJAVAINEN, A. M. FORESTIERI, A. TROVATO, and M. M. TRIPODO, Biological Effects of Hesperidin, A *Citrus* Flavonoid (Note I), Anti-inflammatory and Analgesic Activity, *Farmaco.*, 1994, 40, p 709.
- [69] H. K. KIM, W. K. JEON, and B.S. KO, Flavanone Gglycoside from *Citrus junos* and their Anti-influenza Virus Activity, *Planta Med.*, 2001, 67, p 548.
- [70] H. N. Y. ELSOHL, A. S. JOSHI, A. C. NIMROD, L. A. WALKER, and A. M. CLARK, Antifungal Chalcones fom *Maclura tinctoria*, *Planta Med*. 2001, 67, p 87.
- [71] A. A. SHAHAT, P. COS, T. D. BRUYNE, S. APERS, F. M. HAMMOUDA, S. I. ISMAIL, S. AZZAM, M. CLAEYS, E. GOOVAERTS, L. PIETERS, D. V. BERGHE and A. J. VLIETINCK, Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med*. 2002, 68, p 539.

- [72] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The Systematic Identification Of Flavonoïdes*, Springer-Verlag, New York, 1970.
- [73] R. Mekkiou, Thèse de doctorat d'état, Université de Constantine ,2005.
- [74] K. R. Markham, *Technic of flavonoïdes identifications*, 1982.
- [75] K. R. Markham, T. J. Marbry, *Ultra Violet Visible and proton Mgnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids*, Chapman and Hall, 1976, p 45.
- [76] Viala et Botta, Alain Viala et Alain Botta, *Toxicologie*, Lavoisier, 2007, 2^{ème} édition, p 03.
- [77] R. Derache, *Toxicologie et sécurité des aliments*, Lavoisier, paris, 1986, p 40.
- [78] <http://www.reptox.csst.qc.ca/Documents/plusEncore/Notions/HTM/Notion02.htm>.
- [79] T.P.Tim Cushnic, Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of Antimicrobial Agents* 26, p347.

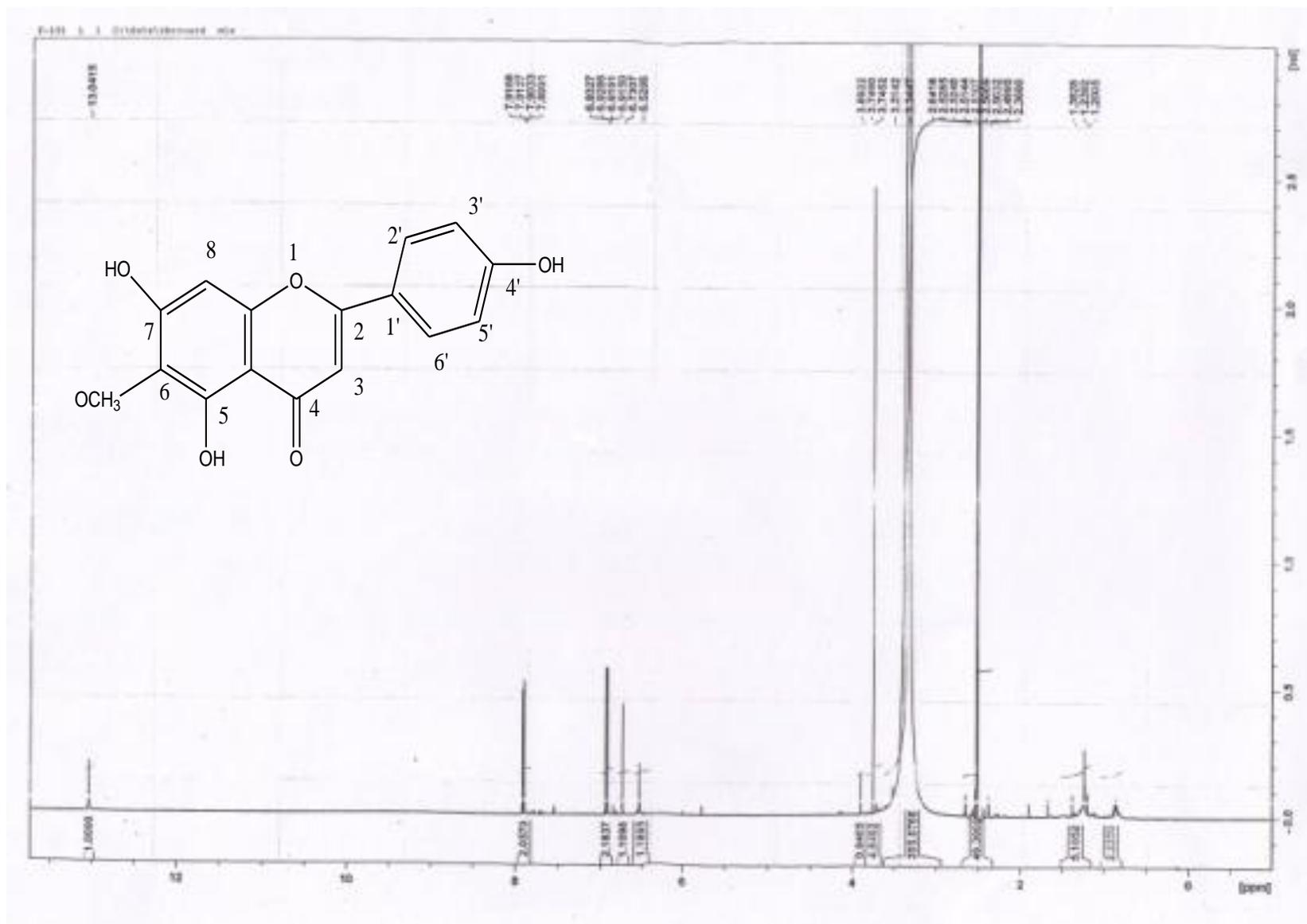
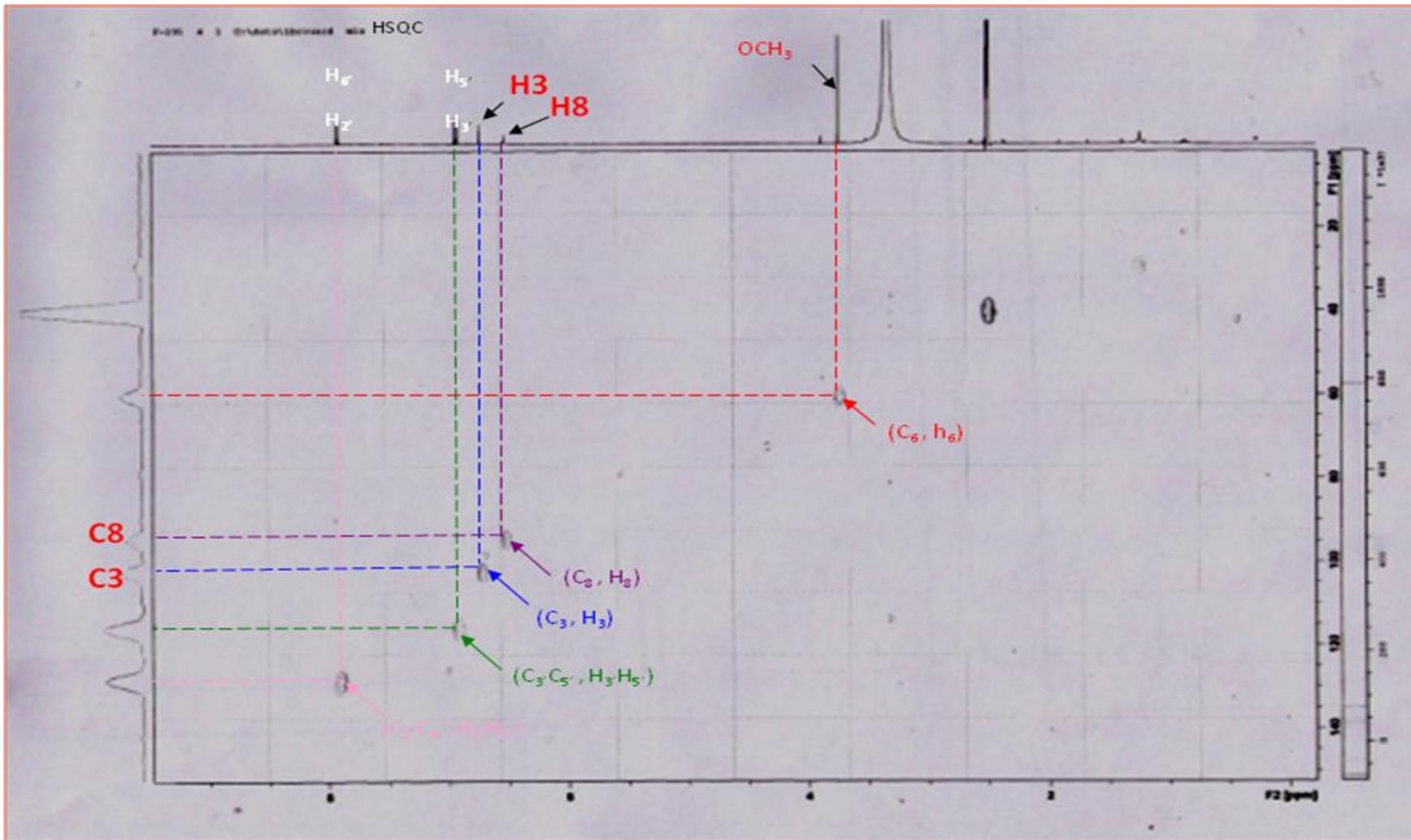
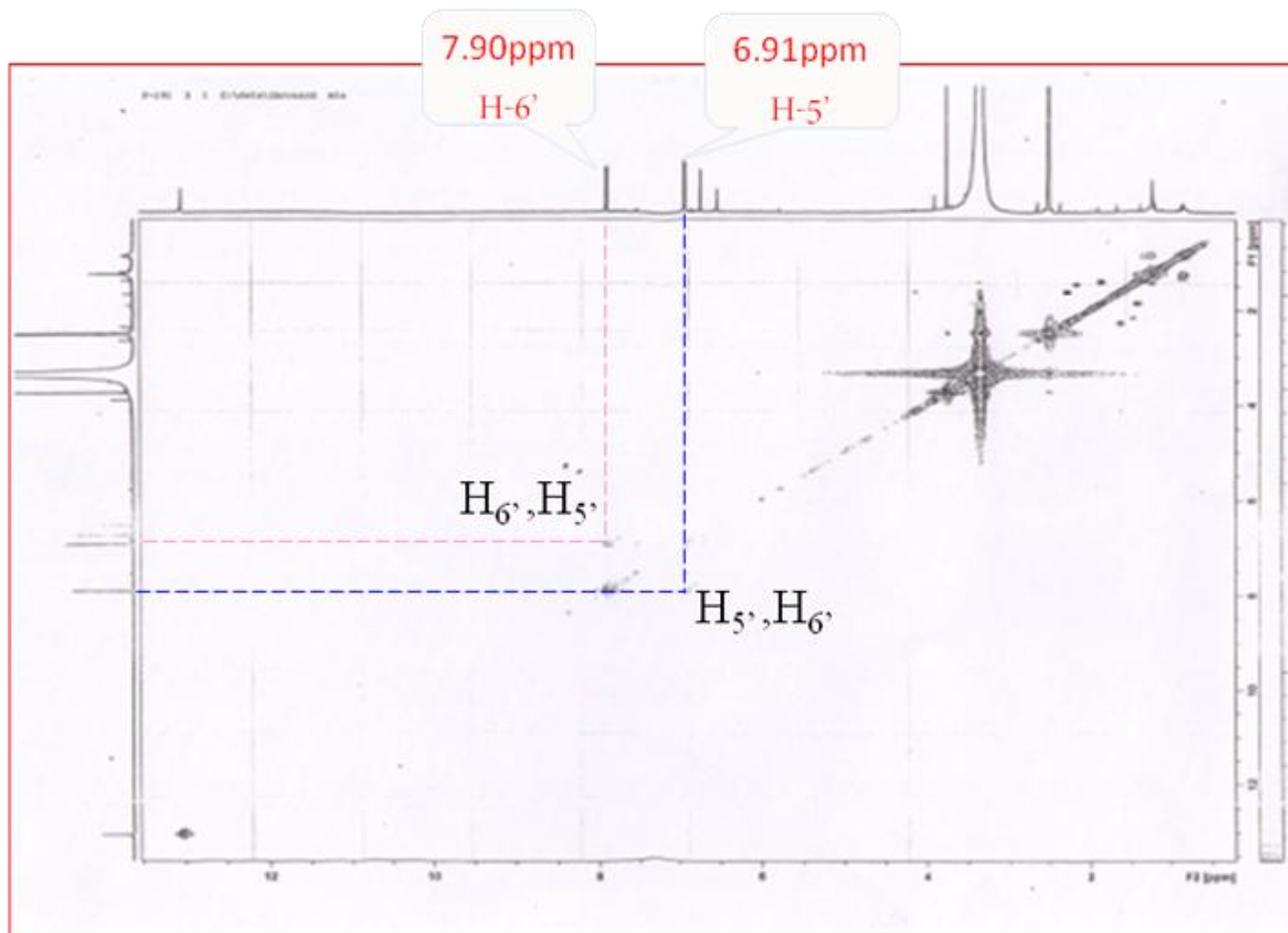


Fig 16 : Spectre RMN ^1H (400MHz, DMSO) du produit F₁₉B



Spectre HSQC (400 MHz, DMSO) du produit F₁₉B



Elucidation du produit F19B

Spectre COESY (400 MHz, DMSO) du produit F₁₉B

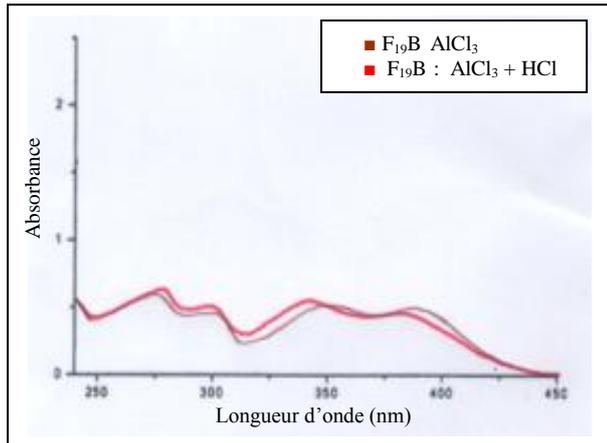
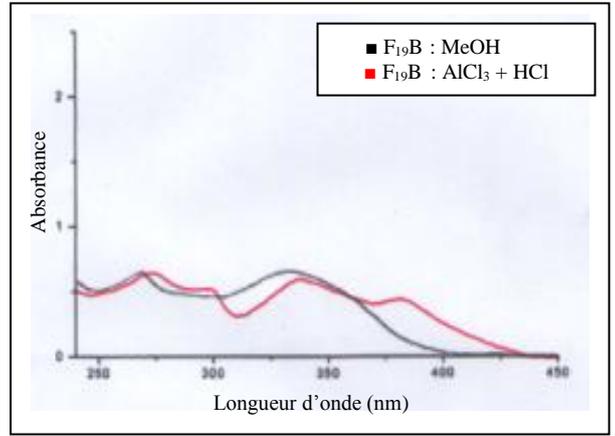
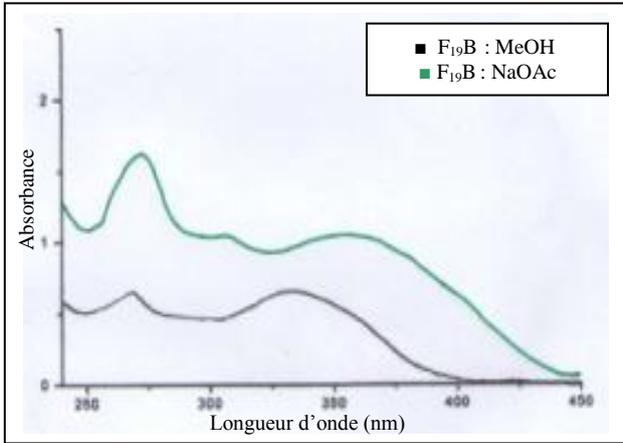
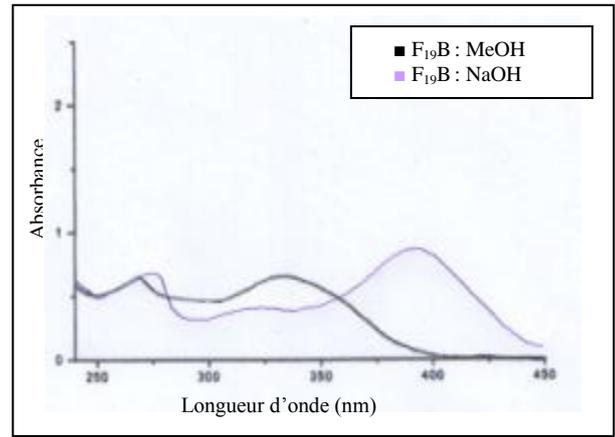
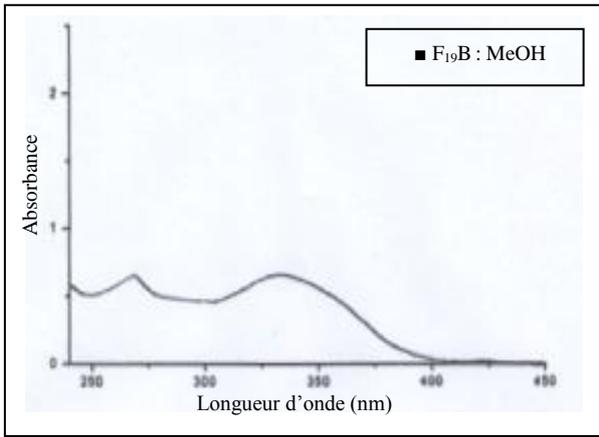


Fig 19 : Spectres UV-Vis du produit F₁₉B

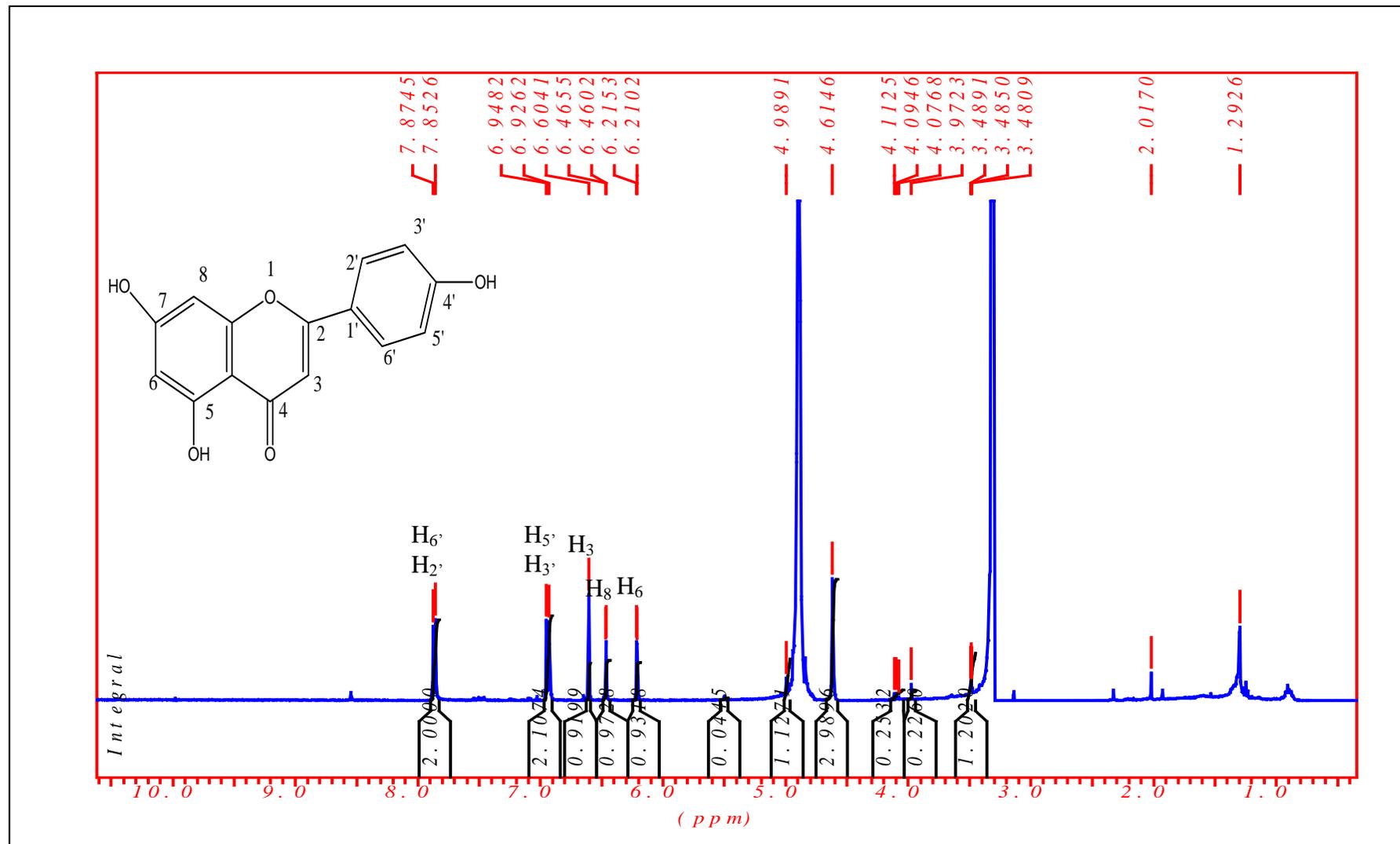


Fig 20 : Spectre RMN ¹H (400MHz, CD₃DO) du produit F₁₉A

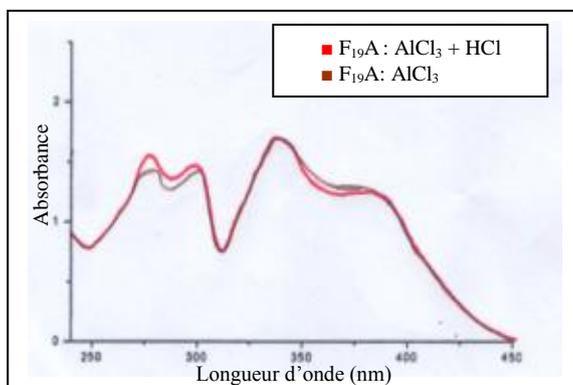
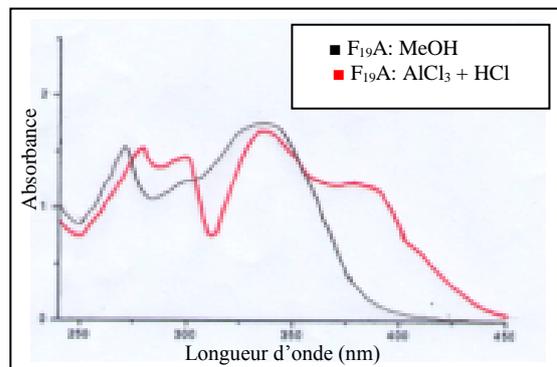
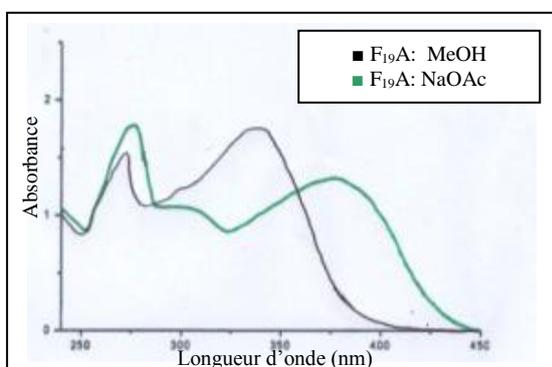
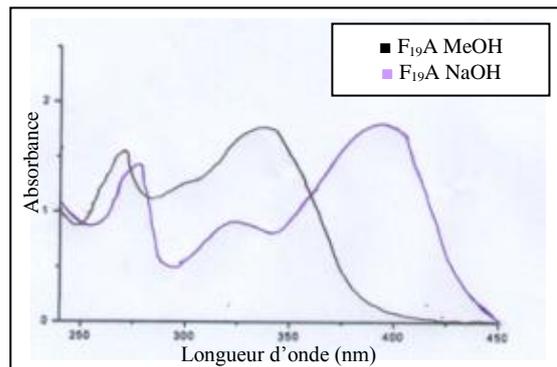
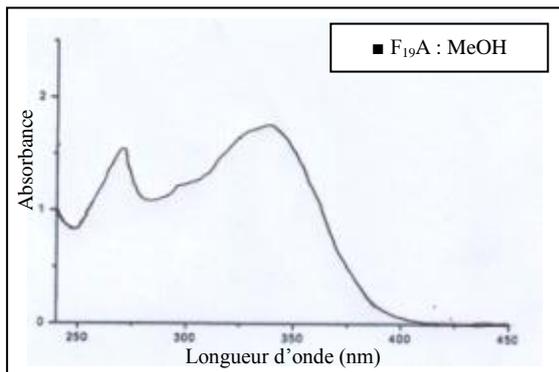


Fig 21: Spectres UV-Vis du produit F₁₉A

Résumé:

Notre travail consistait à déterminer les métabolites secondaires de l'espèce *Centaurea dimorpha*, il rentre dans le cadre des différents travaux réalisés au sein de notre laboratoire, afin d'explorer les richesses de la flore algérienne.

Dans cette étude, nous avons procédé à l'extraction de la plante, puis séparation et purification de deux produits flavoniques par la combinaison de différentes méthodes chromatographiques (chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince, chromatographie sur papier).

L'identification de ces deux produits est effectuée par l'utilisation de différentes méthodes physiques spectroscopiques (UV-Vis, résonance magnétique nucléaire).

Les deux produits isolés de cette espèce sont :

4', 5,7- Trihydroxy flavone.

4', 5,7- trihydroxy 6-methoxyflavone.

Après avoir séparer et identifier ces deux produits; on a effectué des tests biologiques in-vivo (sur les souris), ces tests nous ont permis de connaître les caractéristiques pharmacologiques et toxicologiques de l'espèce *Centaurea dimorph*.

Et afin de mieux explorer notre genre *Centaurea* ; on a étudié l'activité antibactérienne de deux autres espèces de ce genre, qui sont des deux extraits : *Centaurea pullata* et de *Centaurea niceansis*.

Les mots clés :

Centaurea dimorpha

Centaurea pullata

Centaurea niceansis.

Activités pharmacotoxicologiques et biologiques

Flavonoïde

Abstract

This work makes parts of our research program laboratory of Algerian medicinal plants.

He consisted to identify the secondary metabolite of the genus *Centaurea dimorpha*.

The extraction and purification of the different constituents; based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination, performed by physical and spectroscopic methods, such as ultraviolet and nuclear magnetic resonance spectroscopy, allowed us to isolate two products;

4', 5, 7- Trihydroxy flavone.

4', 5, 7- trihydroxy 6-methoxyflavone.

The two products showed good pharmacological and toxicological results.

Then; we are studying the antibacterial activity of another's species of the same genus :

Centaurea pullata

Centaurea niceansis

Key words :

Centaurea dimorpha

Centaurea pullata

Centaurea niceansis.

pharmacological and toxicological activities

Flavonoïde

ملخص :

إنصب عملنا هذا على تحديد أحد نتائج الأيض الثانوي (المركبات الفلافونيدية) لنوع *Centaurea Dimorpha*

و هذا في إطار الجهود المبذولة من طرف مخبرنا قصد إستكشاف الثروة النباتية الجزائرية.

-في دراستنا هذه، قمنا بعملية إستخلاص و فصل وتنقية مركبين فلافونيديين بإستعمال كروماتوغرافيا العمود والطبقة الرقيقة وكروماتوغرافيا الورق، عملية الكشف تمت عن طريق التقنيات الفيزيائية للأشعة فوق البنفسجية و طيف الرنين المغناطيسي .
- المركبان المعزولان من هذا النوع هما:

4', 5,7-Trihydroxy flavone.

4', 5,7-trihydroxy 6-methoxyflavone

- بعد عملية فصل وتحديد المركبين، قمنا بإختبار خصائصها الفرمكولوجيكية السمية على الكائنات الحية (الفئران) ثم قمنا بدراسة الخاصية المضادة للبكتيريا لمستخلصين آخرين لنفس الجنس وهما:

Centaurea pullata

Centaurea niceansis

الكلمات المفتاحية

الفلافونيدات

Centaurea dimorpha

Centaurea pullata

Centaurea niceansis

الخصائص الفرمكولوجيكية و السمية.