



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Fatma KABOUCHE – Maroua SOUDANI

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Contribution à l'étude de la toxicité aïgue de différents extrait de *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa in vivo*

Jury :

M.	Ahmed ATHEMENA	M.C.B	Université de Biskra	Président
Mme.	Asma SAIDI	M.A.A	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Asma BOUCIF	M.C.B	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience pour pouvoir accomplir ce travail, Car l'homme propose mais Dieu dispose.

Nous exprimons d'abord mes remerciements et mes vives connaissances à Mdm. SAIDI Asma qui nous a donné tout d'abord la confiance d'aider, orienter et conseiller pendant la durée de notre travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Un grand merci particulier à vivement les membres de l'équipe laboratoire d'analyse des pathologies anatomiques, de l'hôpital Béchir ben Nasser (Biskra) de gynécologie obstétrique et de pédiatrie, en particulier Dr. Seghiri T. et Dr. Mimouni S., et l'équipe de laboratoire de l'hôpital Mohamed ziyouchi et de l'institution publique pour la santé de Al - Sayeb Mustafa (Tolga) et à toute personne qui nous a aidés notamment Torkia, Asma, Sara, Salsabil ... etc. et de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.

Maroua et Fatma

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du dieu que nous avons achevé ce modeste travail que nous dédions :

A nos très chers parents,

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de nos études,

A toutes nos chères familles

Pour leurs encouragements permanents et leur soutien tout au long de notre parcours universitaire

A nos chères amies

nous ne pouvons trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer nos affection et nos pensées, vous êtes pour nous des sœurs et des amies qui je peux compter

A la famille Moukhtari et la famille Ben said

Maroua et Fatma

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Partie 1. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Toxicité

1. Toxicité.....	3
1.1. Type de la toxicité	3
1.1.1. La toxicité aiguë	3
1.1.2. Toxicité subaiguë.....	3
1.1.3. Toxicité chronique.....	4
1.2. Voies d'administration appliquées expérimentalement.....	4
1.3. Manifestations de la toxicité et les organes cibles.....	4
1.4. Toxicité de certaines plantes médicinales	5

Chapitre 2. Plantes étudiées

2.1. Distribution géographique	6
2.2. Composition chimique.....	7
2.3. Usage traditionnel des plantes <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	8
2.1.3 Activités biologiques de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	8

Chapitre 3. Métabolites secondaires à bases des plantes

3. Métabolites secondaires.....	10
3.1. Terpénoïdes ou les huiles essentielles	10
3.2. Alcaloïdes	11
3.3. Polyphénols	12

Partie 2. Partie expérimentales

Chapitre 4. Matériel et méthodes

4.1. Matériel.....	14
4. 1. 1. Récolte et préparation des plantes <i>Ruta tuberculata</i> et <i>Pergularia tomentosa</i>	14
4.1. 2. Matériel biologique.....	14
4.1. 3. Réactifs chimiques.....	14
4.2. Méthodes	15
4.2.1. Préparation de différents extraits des <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	15
4.2.1.1. Extraction aqueuse.....	15
4.2. 1. 2. Extraction méthanolique	15
4.2. 1. 3 Extraction par l'acétone et l'acétate d'éthyle	15
4.3. Screening phytochimique des extraits de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	15
4. 3. 1. Caractérisation des saponosides	15
4. 3. 2. Caractérisation des polyphénols	16
4.3. 3. Caractérisation des flavonoïdes	16
4. 3. 4. Caractérisation des alcaloïdes.....	16
4. 3. 5. Caractérisation des coumarines	16
4. 3. 6. Caractérisation des tanins	16
4. 3.7. Caractérisation des stéroïdes	17
4. 3. 8. Caractérisation des terpenoïdes	17
4.3. 9. Caractérisation des quinones libres et des antraquinones.....	17
4. 4. Quantification des métabolites secondaires du <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	17
4. 4. 1. Dosage des polyphénols totaux	17
4. 4. 2. Dosage des flavonoïdes	18
4. 5. Etude de la toxicité aigue des extraits de <i>Ruta tuberculata</i> et <i>Pergularia tomentosa</i> . 18	
4. 5. 1. Préparation des lots.....	18
4. 5. 2. Préparation et administration des doses	19
4. 5. 3. Observation des manifestations de la toxicité	20
4. 5. 4. Prélèvements du sang et préparation des échantillons	20
4. 5. 5. Etude histo-pathologique	21+
4. 6. Analyses statistique	21

Chapitre 5. Résultats et discussion

5.1. Extraction et calcul du rendement	22
5.2. Screening phytochimique	24
5.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	26
5.4. Toxicité aiguë des EAQ et Met des plantes <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	27
5.4.1. Pourcentage de la mortalité	27
5.4.2. Variation du poids corporel	29
5.4.1. Symptômes cliniques liées aux effets d'extraits EAQ et Met des plantes étudiées .	30
5.4.3. Analyses des paramètres hématologiques	33
5.4.4. Analyse des paramètres biochimiques.....	36
5.4.5. Etude histo-pathologique	39
Conclusion.....	46
Bibliographie	48
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1. Description des plantes étudiées et leur classification botanique.	6
Tableau 2. Contenu chimique de plantes <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	7
Tableau 3. Usage traditionnel des Plantes <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	8
Tableau 4. Les alcaloïdes, leur structure de base et leurs activités biologique (Wilhelm, 1998; Mauro, 2006).....	12
Tableau 5. Classes de polyphénols, leurs structures de base et leurs activités biologiques.	12
Tableau 6. Groupes préparés pour l'étude toxicologique de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	19
Tableau 7. Observation des manifestations de la toxicité.	20
Tableau 8. Screening phytochimiques de différents extraits du <i>R. tuberculata</i>	24
Tableau 9. Screening phyto-chimiques de différents extraits de <i>P. tomentosa</i>	25
Tableau 10. Teneurs des extraits de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i> en polyphénols et en flavonoïdes.	27
Tableau 11. Nombre et pourcentage de la mortalité après le gavage.	28
Tableau 12. La variation du poids corporel des lots recevant les différents extraits de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	29
Tableau 13. Signes cliniques observés chez le animaux de différents groupes traités par l'EAQ et Met de <i>R. tuberculata</i>	31
Tableau 14. Signes cliniques observés chez le animaux de différents groupes traités par l'EAQ et Met de <i>P. tomentosa</i>	32
Tableau 15. Analyses hématologiques du sang collecté des groupes recevant des différentes doses de l'EAQ de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	34
Tableau 16. Analyses hématologiques du sang collecté des groupes recevant des différentes doses de l'EMet de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	35
Tableau 17. Analyse des paramètres séro-biochimiques de tous les lots de l'EAQ de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	36
Tableau 18. Analyse des paramètres séro-biochimiques de tous les lots recevant l'EMet de <i>R. tuberculata</i> et <i>P. tomentosa</i>	37
Tableau 19. Effet histopathologique d'EAQ et EMet du <i>R. tuberculata</i> sur le tissu hépatique.	40
Tableau 20. Effet histopathologiques d'EAQ et EMet du <i>R. tuberculata</i> sur le tissu rénal.	40
Tableau 21. Effet histopathologique d'EAQ et EMet du <i>P. tomentosa</i> sur le tissu hépatique.	43
Tableau 22. Effet histo-pathologiques d'EAQ et EMet du <i>P. tomentosa</i> sur le tissu rénal.....	44

Liste des figures

Figure 1. Photographe de <i>R.tuberculata forsk.</i> (A) et <i>P tomentosa L.</i> (B).....	7
Figure 2. Structure de l'isoprène (A) et de quelques monoterpènes cyclique (B) ou à chaîne ouverte (C) (Belbache, 2003; Ayad, 2008 ; Khenaka, 2011).	11
Figure 3. Rendement de différents extraits EAQ, EMet, EAc et EAcE du <i>R. tuberculata.</i>	22
Figure 4. Rendement de différents extraits EAQ, EMet, EAc et EAcE du <i>P. tomentosa.</i>	23
Figure 5. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique $m\pm SD$ (n=5).	26
Figure 6. Courbe d'étalonnage de quercetine $m\pm SD$ (n=5).....	27
Figure 7. Coupe histologique du foie et rein du groupe témoin (x40).	40
Figure 8. Coupe histologique du foie du groupe AQR ₂₀₀₀ (A) et (B) MetR ₂₀₀₀ (x40).....	41
Figure 9. Coupe histologique du foie du groupe AQR ₅₀₀₀ (A) et (B) MetR ₅₀₀₀ (x40).	41
Figure 10. Coupe histologique du foie du groupe AQR ₁₀₀₀ (A) et (B) MetR ₁₀₀₀ (x40).....	42
Figure 11. Coupe histologique du rein du groupe AQR ₂₀₀₀ (A) et MetR ₂₀₀₀ (B) (x40).....	42
Figure 12. Coupe histologique du rein du groupe EAQ ₅₀₀₀ (A) et EMet ₅₀₀₀ (B) (x40).	42
Figure 13. Coupe histologique du rein du groupe AQR ₁₀₀₀ (A) et (B) MetR ₁₀₀₀ (x40).....	43
Figure 14. Coupe histologique du foie du groupe AQP ₂₀₀₀ (A) et (B) MetP ₂₀₀₀ (x40).	43
Figure 15. Coupe histologique du foie du groupe (A) AQP ₅₀₀₀ et (B) MetP ₅₀₀₀ (x40).....	44
Figure 16. Coupe histologique du rein du groupe (A) AQP ₂₀₀₀ et (B) MetP ₂₀₀₀ (x40).	44
Figure 17. Coupe histologique du rein du groupe (A) AQP ₅₀₀₀ et (B) MetP ₅₀₀₀ (x40).....	45

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucleique

ALAT : alanine aminotransférase

ASAT : aspartate aminotransférase

CRSTRA : Centre de recherche scientifique et technique des régions arides

DL₅₀ : Dose létale 50

EAc: Extrait acétonique

EAcE: Extrait acétate d'éthyle

EAG : Equivalent en acide galique

EAQ: Extrait aqueux

EDTA : acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique

EMet: Extrait méthanolique

EQ : Equivalent en quercitine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCT : Hématocrit

HGB : Hemoglobine

Jr : Jour

OCDE : Organisation pour coopération et développement économique

PJ : Poids de dernier jour de la surveillance

Pj0 : Poids de premier jour de la surveillance

PLT : Platelets

RBC : Red Blood Cell

SPSS : Statistical Package for Social Science

TG : Triglycéride

TGO : transaminase glutamate oxaloacétate

TGP : transaminase glutamate pyruvate

V/V : Volume sur volume

VGM : Mean Corpuscular Volume

W/V : Deux Volume sur volume

WBC : White Blood Cell

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'Homme est adopté l'utilisation des plantes dans la plupart de ses besoins tels que la nourriture, l'abris, le tissage des vêtements et notamment leur besoin médicaux (Svoloda et al., 2000). Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte la toxicité probablement induite par certaines plantes.

En effet, les plantes médicinales présentent des vertus thérapeutiques importants, comme elles sont utilisées pour traiter nombreuses maladies (Svoloda et al., 2000). Elles constituent alors une source importante d'une grande variété des substances bioactives qui sont le plus souvent liées aux produits de métabolisme secondaire, tels les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes et les coumarines. Certains métabolites secondaires, qui se distribuent dans les plantes à faible ou à forte dose, restreignent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires (Mohr, 1982 ; Juan, 1984; Raghav *et al.*, 2006), antibactérienne (Dih et Belguendouz, 2017). En effet, les polyphénols jouent un rôle intéressant anti-cancer et comme des modulateurs des maladies cardiovasculaires en empêchant la peroxydation lipidique (Bruneton, 2009).

Le but principal des études pharmacologiques est alors la recherche des principes actifs naturels extraits des plantes (Macheix *et al.*, 2005), leurs propriétés sont mises à profit dans l'industrie alimentaire comme des ingrédients et des additifs, en cosmétologie (Bahorun *et al.*, 1996), dans la phytothérapie et également dans la médecine allélopathique moderne (Bourgoud *et al.*, 2001 ; Kar, 2007). Malgré les nombreux avantages thérapeutiques profonds de plantes médicinales, certains métabolites parmi leurs compositions chimiques se sont révélés potentiellement toxiques, mutagènes, cancérigènes et tératogènes. Cela soulève des inquiétudes sur les effets toxiques potentiels résultant de l'utilisation à court terme et à long terme de telles plantes médicinales. Par conséquent, l'évaluation de la toxicité de tout extrait de plantes destiné à être utilisé chez l'Homme et l'animal prend la plus grande importance des recherches phyto- pharmacologiques.

Les plantes *Ruta tuberculata forsk.* (Rutacée) et *Pergularia tomentosa L.* (Asclepiadacée) sont incorporées à l'antiquité dans la médecine traditionnelle maghrébine pour traiter nombreuses maladies, bien qu'elles soient probablement toxiques (Maiza, 1993 ; Ould El Hadj *et al.*, 2003; Hammiche et Azzouz, 2013; Kemassi *et al.*, 2014). En

effet, certaines espèces du genre *Ruta* présentent une certaine toxicité sur différents modèles d'expérimentation, cette toxicité due à la présence des métabolites secondaires (Shama *et al.*, 2014).

Dans notre étude, nous avons tenté d'étudier la toxicité aiguë du *R. tuberculata* et *P. tomentosa*, en utilisant des souris *Swiss albino*, et à suivre cet effet en atteignant les objectifs suivants :

L'extraction des métabolites secondaires des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa* par différents solvants.

La caractérisation des métabolites secondaires dans les différents extraits du *R.* et *P. tomentosa* par application des tests de screening phyto-chimique.

La quantification de la teneur des extraits du *R. Tuberculata* et *Pergularia tomentosa* en polyphénols totaux et en flavonoïde.

L'étude de la toxicité aiguë de différentes doses de deux extraits aqueux et hydroalcoolique du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* en suivant les manifestations de la toxicité, la mortalité, les analyses hématologiques et biochimiques et l'étude histopathologique.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Toxicité

1. Toxicité

Lorsqu'une substance devient capable de perturber le fonctionnement normal d'un organisme vivant, elle est considérée comme une substance toxique. Cette substance toxique peut induire plus que l'apparition de quelque symptôme, en confirmant l'exposition de cet organisme à une toxine, elle peut provoquer ainsi sa mortalité. En effet, elle peut être de source naturelle comme un pollen ou un métabolite secondaire à base végétale ou d'un microorganisme, ou synthétique tel que les solvants organiques comme l'acétone, l'hexane et le chloroforme (Gilles, 2004), en causant plusieurs formes de toxicité qui sont, en fonction de la durée et de la fréquence d'exposition, la toxicité aiguë, subaiguë, chronique et la sub-chronique (Bismuth *et al.*, 1987). Cependant, les manifestations et les symptômes associés à la toxicité, quelle qu'elle soit, se différencient d'un individu à un autre, ça dépend de sa dose, de la voie de sa pénétration, telle que la voie respiratoire, digestive, cutanée ou la voie oculaire, et de l'organe cible ou le système intracellulaire attaqué (Gilles, 2004; Amiard, 2011).

1.1. Type de la toxicité

1.1.1. La toxicité aiguë

La toxicité aiguë résulte d'une pénétration ou d'une administration d'une substance toxique, une seule fois, ce qui peut provoquer la mort de l'individu ou l'apparition de très graves troubles physiologiques après un court terme (Ramade, 1979). En effet, l'étude de la toxicité aiguë induite par différentes doses de cette substance, nous permet de déterminer la dose létale (DL_{50}) qui provoque une mortalité de 50% de la population d'animaux, dans des conditions expérimentales bien définies (Laigneau, 2000).

La détermination de la DL_{50} consiste à administrer différentes doses croissantes d'une substance à tester aux 5 animaux /Lot (OCDE, 2001 ; OCDE, 2008), contre un groupe témoin qui ne reçoit pas cette substance. La DL_{50} serait déterminé ensuite à partir de la courbe qui exprime le pourcentage de la mortalité en fonction du logarithme de la dose (OCDE, 2001; OCDE, 2008 ; Wallace Hayes, 2008).

1.1.2. Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë résulte d'une exposition au toxique par une manière répétée, mais à des doses plus faibles à court terme. En effet, les signes cliniques qui s'apparaissent sur des

organes cibles, semblent être toutefois significatifs de symptômes qui se manifestent sur la population qui peuvent survivre d'ailleurs à l'intoxication (Ramade, 1979).

1.1.3. Toxicité chronique

Cette toxicité à long terme se fait par une exposition répétée à très faibles concentrations d'une substance à long terme. Le produit est administré quotidiennement, une à deux fois par jour pendant 18 à 24 mois (Laroche, 2001).

1.2. Voies d'administration appliquées expérimentalement

La pénétration d'une substance toxique dans un organisme vivant peut se faire selon différentes modalités. à côté de la voie orale, dite le plus souvent digestive, par rapport le passage de la substance toxique au la barrière gastro-intestinale (Labaune, 1993), la substance à examiner, qu'elle s'agit de particules solides ou liquides, peut emprunter la voie respiratoire par inhalation (Viau et Tardif, 2003) ou la voie cutanée par absorption comme les huiles volatiles qui passent ensuite dans le sang vers les organes cibles sans transformation au niveau du foie ou les poumons (Poppenga, 1962; Richardson, 1999). Par ailleurs, nombreuses voies injectables telles que les injections intraveineuses, intradermiques, et intra-péritonéales sont très répondues dans les essais et les expériences cliniques en utilisant différents modèles animaux, particulièrement les rongeurs (Holmberg *et al.*, 2000).

1.3. Manifestations de la toxicité et les organes cibles

Pendant l'étude toxicologique, la substance à tester est capable d'affecter le comportement général de l'animal, ce qui s'associe à des symptômes cliniques et aux modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central (OCDE, 2001).

Cependant, la toxicité provoquée sur l'organisme par cette substance, à effet toxique, dépend essentiellement de sa nature chimique (métabolites naturels actifs, radicaux libres...etc.), sa quantité, et de son affinité vis-à-vis son site d'action, tels les récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, les enzymes, l'ADN...etc., autrement dit la cible qu'elle attaque (Lauwerys, 2003). En effet, la nocivité de cette substance administrée aussi de son affinité pour ce site et le type d'interaction avec lui (Lauwerys, 2003).

En outre, la dose administrée du toxique actif est influencée par quatre principaux facteurs biologiques qui sont l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion (Gilles, 2004). En effet, la substance toxique et ses dérivés biochimiques générés, lors de transformations métaboliques qui se déroulent au sein de l'organisme, font cibler les différents organes notamment ceux-ci qui sont situés dans la voie de leur absorption, distribution et leur stockage (Lauwerys, 2003), tels que le tractus gastrique, pulmonaire, et le système nerveux (Gilles, 2004), ou le foie qui constitue le siège principal de la transformation biochimique et la libération de ses dérivés, ou même les reins, l'organe de l'excrétion et l'élimination de la substance administrée et de ses dérivés (Viala and Botta, 2007).

Nombreuses maladies pourraient accompagner la toxicité provoquée par l'administration d'une substance toxique, fréquemment l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité, l'un de ses effets toxiques sur le foie et les reins, respectivement (Viala and Botta, 2007). Cependant, différents atteintes neurologiques, qui peuvent être engendrés par la pénétration d'une substance neurotoxique, sont essentiellement la dépression du système nerveux central, la neuropathie périphérique et la paralysie musculaire, la cancérogénicité et la mutagénicité (Gilles, 2004).

1.4. Toxicité de certaines plantes médicinales

Des études récentes menées sur des plantes médicinales ont montré que certaines d'entre elles présentent des effets nocifs qui s'apparaissent avec leur administration. En effet, l'étude toxicologique des plantes médicinales nous permet de mise en évidence les doses et les différentes activités des métabolites secondaires tels les alcaloïdes qui ont généralement des effets toxiques profonds sur le système nerveux des mammifères en raison de l'interaction avec le tissu neuronal (Donald et Billie, 1978). Ils peuvent causer de graves réactions toxiques allant d'une atteinte hépatique à une pression artérielle élevée et des problèmes cardiaques (George, 2011). Concernant les coumarines, l'injection des coumarines à des doses orales uniques de coumarine o provoquent une nécrose du foie et augmenter les activités plasmatiques des transaminases chez les souris de souche DBA / 2 (Lake, 1999). De plus, les saponines inhibent la respiration cellulaire (Wittstock et Gershenson, 2002). Ce sont des tensioactifs puissants qui peuvent perturber la croissance cellulaire riche en lipides membranes des érythrocytes et des micro-organismes humains qui expliquent la puissance propriétés antimicrobiennes de ce groupe de produits phytochimiques (Francis, 2002).

Chapitre 2

Plantes étudiées

2.1. Distribution géographique

Ruta tuberculata, *Haplophyllum tuberculatum* (Rutacée) est une plante herbacée de 20 à 50cm d'altitude, elle se distribue dans la région méditerranéenne, où elle croît dans les déserts de l'Arabie (Lamarck et Poiret, 1804). Cependant, le petit arbuste *Pergularia tomentosa* L. (Asclépiadacée) peut atteindre jusqu'à 1m. Elle est disponible dans des pays secs comme le Sud Algérien jusqu'en Afrique du Nord et bien se trouve aussi dans certains pays asiatiques comme Afghanistan et l'Est du Iran (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013). Le tableau 1 ci-dessous représente la description des plantes étudiées et leur classification botanique.

Tableau 1. Description des plantes étudiées et leur classification botanique.

<i>Ruta tuberculata</i>	<i>Pergularia tomentosa</i>
Description botanique	
<p>-Tiges très canoteuses et des petites feuilles cunéiformes porteuses de grosses glandes tuberculeuses saillantes sécrétant une substance malodorante (Quezel, 1963).</p> <p>-Fleurs jaunes forment de petits corymbes terminaux rameux, dichotomes, chaque fleur pédonculée, une solitaire et sessile dans chaque dichotomie (Lamarck et Poiret, 1804).</p> <p>-Floraison de février à juin (Cruz A., 2011)</p>	<p>- Tiges grimpantes ou volubiles, sécrétant un latex blanc et des feuilles ovales, orbiculaire en vert amande mesurant 5cm de diamètre (Quezel et Santa, 1963).</p> <p>- Fruits fusiformes, divergents et couverts de rugosités en follicules groupés par paire du 7cm de diamètre (Amani et Barmo, 2010).</p> <p>-Fleurs blanc-pourpre et odoriférantes avec une corolle tubulaire blanche ou pourpre qui mesure 8mm de long. (Schmelzer et Gurie-Fakim, 2013).</p> <p>-Floraison est en printemps (Neuwinger 1994).</p>
Classification botanique	
<p>Règne : Plante.</p> <p>Sous règne : Magnoliophyte.</p> <p>Classe : Magnoliopside.</p> <p>Ordre : Sapindales.</p> <p>Famille : Rutacée.</p> <p>Genre : <i>Haplophyllum</i>= <i>Ruta</i>.</p> <p>Espèce : <i>Haplophyllum Tuberculatum</i> ou <i>Ruta tuberculata forsk</i> (Townsend, 1986)</p>	<p>Règne : Plante.</p> <p>Embranchement : Spermaphytes.</p> <p>Classe : Dicotylédones.</p> <p>Sous Classe : Rosidae.</p> <p>Ordre : Gentianales.</p> <p>Famille : Asclépiadacée.</p> <p>Genre : <i>Pergularia</i>.</p> <p>Espèce: <i>Pergularia tomentosa</i> L. (Ozanda, 1991)</p>
Nom vernaculaire arabe : Faijel الفيجل	Nom vernaculaire arabe : El ghalega الغلقة

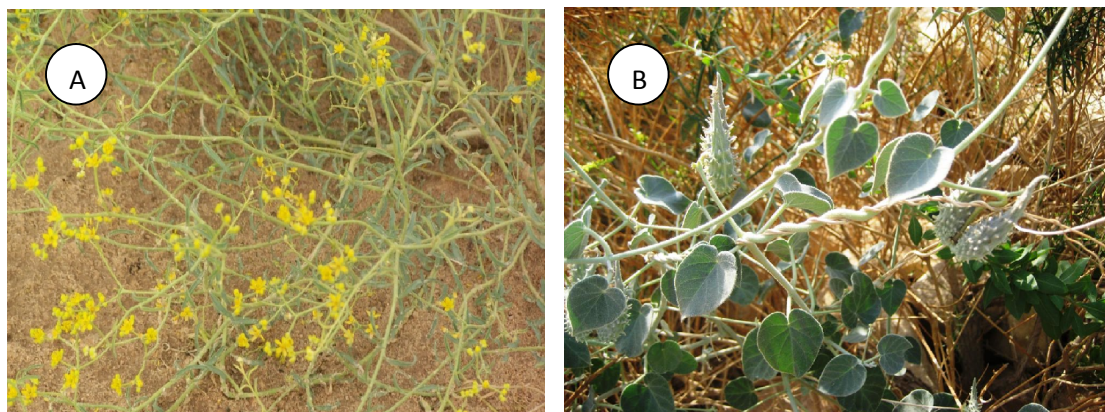


Figure 1. Photographe de *R. tuberculata* forsk. (A) et *P. tomentosa* L. (B)

2.2. Composition chimique

Les études phyto-chimiques qui sont menées sur les plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa* et qui ont indiqué la présence d'une diversité des métabolites secondaires, principalement les polyphénols et les flavonoïdes, dans les différents extraits de leur partie aérienne, sont illustrées dans le tableau 2.

Tableau 2. Contenu chimique de plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

<i>R. tuberculata</i>	Références	<i>P. tomentosa</i>	Références
-Polyphénols ; -Flavonoïdes (rutoside) -Tannins ; -Alcaloïdes (furoquinoléines et dérivés de l'acridone) -Stéroïdes et Huiles cétones aliphatiques -Coumarines (rutarine, furanocoumarines)	Al-Yahya <i>et al.</i> (1992) Vigneau (1985) Paulini <i>et al.</i> (1987)	-Polyphénols (acides phénoliques) -Flavonoïdes -Tanins	UNESCO (1960) Hassan <i>et al.</i> (2007) Hifnawy <i>et al.</i> (2014)
-Huiles volatiles (les α et β phellandrène, terpinène 4-ol, p-cymène-8-ol, pipertone et hexane-1-ène)	Mechehoud <i>et al.</i> (2014)	-Alcaloïdes, -Saponines, -Anthraquinones, -Glycosides cardiaques et cyanogènes	Hassan <i>et al.</i> (2007) Piacente (2009)
-Alcaloïdes (tuberine, tubacétine et quinolone)	Al-Brashdi <i>et al.</i> (2016)	-Composants minéraux phosphoriques, potassiques, sodique, calcique et de magnésium	Shadid <i>et al.</i> (2006) Hassan et Umar (2007)

2.3. Usage traditionnel des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

En Algérie dans la région méditerranéenne, *R. tuberculata* et *P. tomentosa* ont été traditionnellement utilisées dans le traitement de diverses complications (Tableau 3).

Tableau 3. Usage traditionnel des Plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

<i>R. tuberculata</i>	-L'infusion ou la tisane de la partie aérienne est recommandé contre les activités de sphère génital, les maux de cycle menstruel, les troubles gastriques et intestinales et la constipation et contre l'ozène, la fièvre et les vomissements du nourrisson. -Elle est utilisée comme un antiseptique contre les ulcères, un calmant, un emménagogue et antiparasitaire, et comme un collyre.	Vigneau (1985) Mossa (1987) (Maiza, 1993) Hadjadj <i>et al.</i> (2015)
	-L'huile peut soulager les patients atteints des maladies rhumatismales	(Kallel <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. tomentosa</i>	-La patte des feuilles est frottée sur la peau contre la dermatose et sensibilisation cutané. - Le jus des feuilles sont usées contre les maux de tête et comme un remède dans le traitement de la tuberculose et les hémorroïdes. -La tisane est administrée comme un agent hypoglycémiant.	(Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013) (Kemassi <i>et al.</i> , 2014)
	-Le latex des tiges est utilisé sur la mamelle de la vache pour augmenter la production laitière.	(Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013)

2.1.3 Activités biologiques de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

R. tuberculata s'avère nombreuses activités pharmacologiques, notamment l'activité antioxydante, où l'extrait éthanolique et les huiles essentielles semblent avoir, tous les deux, une activité antiradicalaire en inhibant la production des dérivés oxygénés toxiques, *in vitro* sur les cellules d'astrocytome humain U373-MG endommagées par H₂O₂ (Djamila, 2012; Eissa *et al.*, 2014). De plus, Ils présentent un pouvoir antimicrobien à la fois contre les Gram⁺ et du Gram⁻ tels *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Sabry *et al.*, 2016). Par ailleurs, Ibrahim *et ses collaborateurs* (2015) ont éprouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle de sa partie aérienne, qui possède une teneur importante en flavonoïdes et en tannins, ait exercé un effet inhibiteur sur l'acétylcholinestérase.

En outre, l'extrait méthanolique de *R. tuberculata* riche en polyphénols a montré un effet appliqué anti-inflammatoire topique puissante sans toxicité apparente contre l'œdème d'oreilles chez les souris suisses (Al-Brashdi *et al.*, 2016). Cependant, les huiles essentielles de fleurs du *R. tuberculata* ont démontré une remarquable activité anti-inflammatoire contre

l'œdème induit par la carragénine chez le rat, en comparaison à l'indométacine (Sabry *et al.*, 2016).

Pergularia tomentosa L. présente un large spectre des activités biologiques attribuées à son contenu en molécules bioactives où l'extrait aqueux de sa partie aérienne possède un effet antibactérien puissant contre nombreuses souches telles *E. coli* (Tlili, 2015). De plus, la richesse de *P. tomentosa* en métabolites secondaires peut expliquer son pouvoir antifongique vis à vis les champignons comme *T. rubrum*, *M. gypseum* et *A. niger* (Hassan et Umar, 2007).

Bouhamdi (2012) a publié que les magnésiums, contenu dans les différents organes *P. tomentosa*, sont des agents antioxydants traitant l'organisme contre les carences qui pourraient conduire à de graves troubles métaboliques.

La présence des métabolites secondaires tels tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, glycosides, saponines, glycosides cardiaques, les anthraquinones et les stéroïdes dans la composition de *P. tomentosa* peut être responsable de l'activité anti-dermatophytique (Bouhmama, 2013).

Chapitre 3

Métabolites secondaires à bases des plantes

3. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires synthétisés par les végétaux sont des molécules qui servent à la défense de la plante contre les agressions extérieures. Ils sont produits naturellement lors d'un métabolisme secondaire en très faible quantité, et présentent une grande variété structurale, où il s'agit plus de 200 000 structures définies (Hartman, 2007). En effet, les plantes médicinales sont les principales sources de ces métabolites qu'ont des propriétés pharmacologiques puissantes sur l'homme (Primrose, 2004), ce qui les rend des molécules bioactives possédant un large spectre des activités biologiques (Priva et Aparna, 2012).

Selon leur structure de base, les métabolites secondaires sont subdivisés en trois grands familles qui sont les polyphénols y compris les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les quinones et les coumarines, les composés azotés comme les alcaloïdes et enfin les terpènes (Haven *et al.*, 2000; Krief, 2003).

3.1. Terpénoïdes ou les huiles essentielles

Terpénoïde sont des monomères à 5 atomes carbones appelés l'isoprène ($C_5 H_8$) qui constitue la structure de base des terpénoïdes (Figure 3). En effet, ces métabolites sont des hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte (Khenaka, 2011). Cependant, il s'agit des nombreuses terpénoïdes de formule $C_5 H_x$ (Figure 3), synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaïssa, 2011), qui présentent le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques tels l'alcool, l'aldéhyde, le cétone, l'acide, le lactone, ...etc. (Malecky, 2005; Benaïssa, 2011). Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont entraînaibles par la vapeur d'eau, soluble dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau (Merghem M., 2015).

La classification des terpénoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène en donnant des hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tetraterpènes (C_{40}) et polyterpènes (Belbache, 2003; Ayad, 2008; Mebarki, 2010). Ils ont des propriétés antioxydantes, antifongiques et une activité antimicrobienne (Laïb, 2011).

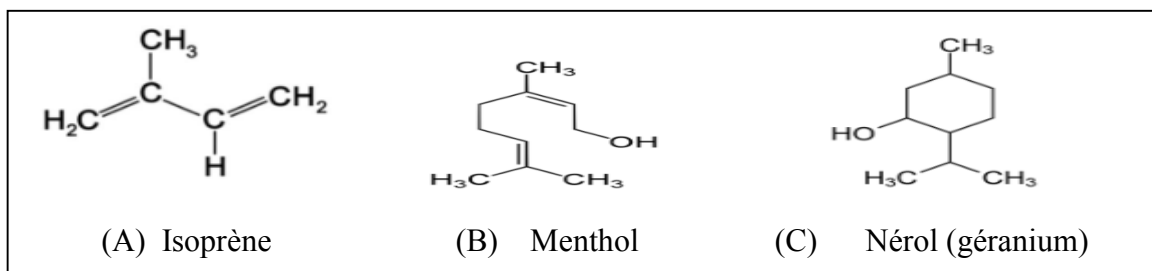


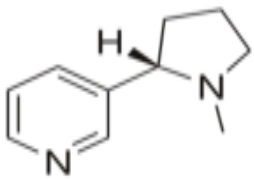
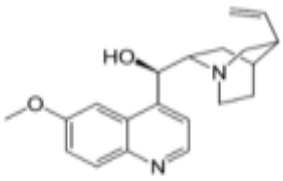
Figure 2. Structure de l'isoprène (A) et de quelques monoterpènes cyclique (B) ou à chaîne ouverte (C) (Belbache, 2003; Ayad, 2008 ; Khenaka, 2011).

3.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, qui présentent une structure complexe hétérocyclique, à caractère alcalin (Badiaga, 2011). En effet, ils sont des dérivés de l'antranilate ou d'acides aminés tels que le tryptophane, la lysine, l'aspartate, la phénylalanine et la tyrosine. Dans la voie de leur synthèse, Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplées à d'autres squelettes carbonés (Cyril, 2001). Par ailleurs, les alcaloïdes semblent avoir des puissants pouvoirs pharmacologiques tels l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinines), stimulant centrale (caféine) et dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphines) (Badiaga, 2011).

Actuellement, trois classes des alcaloïdes sont enregistrées (Tableau 4). Premièrement, les vrais alcaloïdes, des dérivés d'acides aminés contenant un atome d'azote dans leur système hétérocyclique. Dans les plantes, ils se trouvent sous forme libre, des sels ou comme N-Oxyde, qui sont hautement toxiques (Badiaga, 2011). Deuxièmement, les pseudo-alcaloïdes ou les alcaloïdes terpéniques, au contraire aux vrais alcaloïdes, sont des dérivés d'isoprénoïdes et du métabolisme de l'acétate (Rakotonanahary, 2012). Finalement, les proto-alcaloïdes qui sont le plus souvent appelés les amines biologiques ou les amines simples dont l'azote n'est pas incluse dans leur système hétérocyclique. Cette classe renferme les alcaloïdes basiques qui sont solubles dans l'eau (Badiaga, 2011).

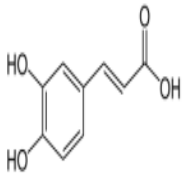
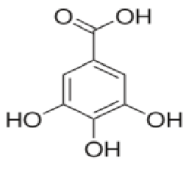
Tableau 4. Les alcaloïdes, leur structure de base et leurs activités biologique (Wilhelm, 1998; Mauro, 2006).

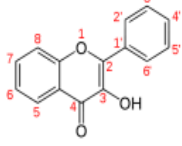
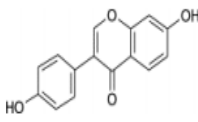
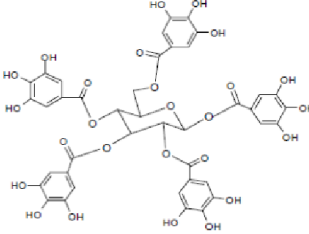
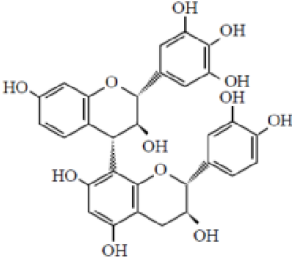
alcaloïdes	Exemple	Formule	Activité biologique
Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique	La nicotine		-Effet contre les attaques des herbivores et des insectes. -Stimulant respiratoire. -Agent aidant le processus de sevrage tabagique.
Alcaloïdes dérivés du tryptophane	La quinine		-Traitements de la crampe nocturne de la jambe. -Tue les mérozoïtes de l'agent vecteur de la malaria, -Empêche les accès de fièvre.

3.3. Polyphénols

Les polyphénols ou les composés phénoliques seuls regroupent nombreuses classes de composés chimiques qui présentent tous un point en commun, la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (Hennebelle *et al.*, 2004), tandis qu'ils diffèrent dans leur structure selon le nombre et la position des hydroxylations et méthylations du cycle aromatique (Bourgou *et al.*, 2008). Les composés phénoliques sont divisés principalement en acides phénoliques, flavonoïdes, tanins et coumarines qui sont envisagés dans le tableau 5 ci-dessous (King et Young, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002).

Tableau 5. Classes de polyphénols, leurs structures de base et leurs activités biologiques.

	Exemple	Structure de base	Activité biologique	Références
Acides phénoliques	Ac. hydroxycinamique (Ac. caféique) Nkhili, (2009)		-Antitumorales, antivirales, anti-inflammatoires. -Antiradicalaires ou un antioxydant naturel, inhibant la peroxydation lipidique	Cunha <i>et al.</i> (2004) Nkhili (2009)
	Ac. hydroxybenzoïques (Ac. gallique) Akroum (2011)		-Activité antioxydante - Prévenir les dommages oxydatifs d'ADN -Activité anticancéreuse	Smith et Kramer, (1999) Kawada <i>et al.</i> (2001) Lee <i>et al.</i> (2005) Akroum (2011)

				Rangkadilo <i>et al.</i> (2007)
Flavonoïdes	Flavonols Bellebcir, (2008)		<ul style="list-style-type: none"> - Antihistaminique -Antiinflammatoire -Antioxydante. -Activité anticancéreuse (contre les cancers du prostate , du poumon et du colon). - propriétés vasculoprotectrices - Contre le vieillissement cellulaire, en améliorant l'élasticité et la densité de la peau. - Antiseptiques urinaires 	Bellebcir, (2008) Vinson, (1995) (Nkhili, 2009) Hennebelle <i>et al.</i> , (2004)
	Anthocyanes (Bellebcir, 2008)			
Tanins	Tanins hydrosolubles (tanin gallique)		<ul style="list-style-type: none"> -le recyclage de l'urée par la diminution de la concentration d'ammoniac dans le rumen. -Activités antimicrobiennes 	Brunet, (2008) Bruneton., (1999) ; Peronny., (2005)
	Tanins condensés (prorobinetinidine)			

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 4

Matériel et méthodes

4.1. Matériel

4.1.1. Récolte et préparation des plantes *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*

Les plantes qu'elles sont étudiées dans le présent travail, *R. tuberculata* et *P. tomentosa* ont été récoltées au mois de mars 2018, du sud d'Algérie (de la superficie d'agricole Bordj Ennouse, Municipalité de Rase El-miaade et d'El-Hajeb, respectivement, wilaya de Biskra). Les deux espèces sont identifiées par "CRSTRA" (Centre de recherche scientifique et technique des régions arides, Biskra).

Après la récolte, la partie aérienne de chacune de deux plantes est nettoyée et séchée à l'ombre dans un endroit sec et à température ambiante. Après quelque jour de séchage, les plantes ont été ensuite emballées et stockées en des sacs en papier à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

4.1.2. Matériel biologique

Pour examiner l'effet toxicologique de différents extraits des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*, des souris mâles, *Swiss albino*, de poids varie entre 25 à 30g, sont utilisés comme un modèle expérimental, procurés au laboratoire des animaux de l'institut Pasteur (Algérie). Les souris sont regroupés dans des lots (cinq animaux /cage) et hébergés pour une période de dix jours d'adaptation aux conditions d'hébergement, où ils ont alimentés en nourriture classique de bétail de la marque ABSVL (Ain Defla) et en l'eau potable à satiété, à 20°C, ainsi que la photopériode est de 12h/12h.

4.1.3. Réactifs chimiques

Les solvants et les produits chimiques qui sont utilisés dans notre expérience sont de la marque (Sigma et biocham) : Méthanol, Acétone, Acétate d'éthyl, Ether de Pétrole, Chloroforme, Acide Gallique, Catéchine, Quercétine, Folin-Ciocalteu, Vanilline, Magnésium, Formaldéhyde, Acétate de Sodium, Anhydride acétique, Acide Chlorhydrique (HCl), Phosphate Sodique Monobasique(NaH_2PO_4), Phosphate Sodique dibasique (Na_2HPO_4), Carbonate de Sodium (Na_2CO_3), Acide Sulfurique (H_2SO_4), trichlorure de Fer (FeCl_3), Trichlorure d'aluminium (AlCl_3), iode(I_2), iodure de potassium (KI), Hydroxyde de potassium (KOH), Hydroxyde de sodium (NaOH), l'eau physiologie NaCl 0.09% , paraffine, Xylène, EUKITT, Eosine aqueuse 2%, Alcool éthylique 96.7° et le réactif de Stiansy.

4.2. Méthodes

4.2.1. Préparation de différents extraits des *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

4.2.1.1. Extraction aqueuse

Les extraits aqueux de *R. tuberculata* et de *P. tomentosa* ont été préparés par la décoction du 100g de la partie aérienne de chaque plante, pendant 15 min selon les méthodes décrites par Ratheesh et Helen (2007) et Thenmozhi (2011), respectivement. Après une filtration sous vide, le filtrat ensuite est séché à 40°C dans l'étuve. Les extraits aqueux (EAQ) obtenus, brun en poudre, sont conservés à -4°C.

4.2. 1. 2. Extraction méthanolique

Selon les méthodes de Bekheet *et al.* (2011), Khlifi *et al.* (2013) et Salem *et al.* (2013) l'extrait méthanolique brut (EMet) de chacune des plante, *R. tuberculata* et *P. tomentosa*, a été obtenu par une macération de 100g de la partie aérienne (10% ; w : v) dans du méthanol/eau (80%) pendant 48 h. Après filtration sous vide, le filtrat subit l'évaporation (rota vapeur, thermo spectronic, USA), puis séché dans l'étuve à 40°C et l'extrait récupéré brut cristallin verdâtre est également conservation à - 4°C.

4.2. 1. 3 Extraction par l'acétone et l'acétate d'éthyle

Selon la méthode de Kacem *et al.* (2014) avec petites modification, la macération de 100g de la partie aérienne de chaque plante a été effectuée dans du 300ml d'éther de pétrole pendant 2h avec une agitation douce. Après une filtration, les résidus obtenus ont été macéré pendant 48h dans de l'acétone ou l'acétate d'éthyle (10% w : v). Les solvants organiques sont ensuite éliminés par évaporation, jusqu'à obtenir des extraits concentrés. Après séchage à 40°C dans l'étuve, des extraits acétoniques (EAc) et d'acétate d'éthyle (EAcE) verdâtres en forme d'une gomme sont conservés à -4°C.

4.3. Screening phytochimique des extraits de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

4. 3. 1. Caractérisation des saponosides

La présence des saponosides dans les différents extraits (EAQ, EMet , EAc, EAcE) de la partie aérienne du *R. tuberculata* et de *P. tomentosa* a été caractérisé par l'apparition d'une mousse persistante à l'agitation vigoureuse, selon la méthode de N'Guessan *et al.* (2009). Dans ce test, 10 ml de chaque extrait a été agité dans le sens vertical pendant 15s, puis laissé au repos de 15min. Une hauteur de mousse supérieur à 1cm indique la présence des saponosides.

4.3.2. Caractérisation des polyphénols

Les polyphénols sont caractérisés, dans les différents extraits (EAQ, EMet, EAc, EAcE) des plantes étudiées, en utilisant le chlorure ferrique (FeCl_3). Brièvement, 2ml de FeCl_3 2% (w : v) ont été additionnés à 2ml de chaque filtrat d'extrait. L'apparition d'une coloration bleu-noire ou verte, plus ou moins foncée, indique la présence des polyphénols (N'Guessan *et al.*, 2009).

4.3.3. Caractérisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction de cyanidine (Ciulel, 1982). 1ml de chaque extrait a été mélangé avec 100 μl d' HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. Le dégagement de chaleur (Aliyu *et al.*, 2011) et l'apparition d'une couleur rouge ou orange est confirmé la présence des flavonoïdes (Karumi *et al.*, 2004).

4.3.4. Caractérisation des alcaloïdes

Par l'utilisation du réactif de Wagner (2g d'iodure de potassium KI+1,27g d'iode I_2 + 100ml d'eau distillée), les alcaloïdes ont été caractérisés (Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001). 2ml de ce réactif ont été additionnés à 2ml de chaque filtrat d'extrait et la formation d'un précipité blanc jaunâtre fait assurer la présence des alcaloïdes.

4.3.5. Caractérisation des coumarines

La détection des coumarines est indiquée par la disparition de la couleur jaune d'un mélange réactionnel en présence KOH, lorsqu'on ajoute l'acide HCl (Hindumathy, 2011). C'est pour cela, 2ml de chaque filtrat d'extraits étudiés ont été mélangé avec quelques gouttes de KOH 10% (w : v), et une couleur jaune s'apparaît immédiatement. Ensuite, dix gouttes d' HCl concentré ont été ajoutées au mélange précédant.

4.3.6. Caractérisation des tanins

Selon Dohou *et al.* (2003), deux à trois gouttes de FeCl_3 1% (w : v) ont été additionnées à 1ml de chaque filtrat d'extrait, la coloration verdâtre au bleu-noire indique la présence des tanins galliques et brune-verdâtre en présence de tanins catéchiqes.

La discrimination entre les deux types de tanins a été menée par l'usage de réactif du Stiansy (10ml de formaldéhyde +5ml d'HCl concentré). Pour cela, 15ml de réactif Stiansy ont été mélangés à chaque extrait, ce mélange est ensuite incubé au bain marie à 80°C durant 30min.

L'apparition d'un précipité en gros flocon indique la présence des tanins catéchiques, la caractérisation des tanins gallique se fait par la filtration de la solution précédente, le filtrat obtenu est saturé ensuite par l'acétate de sodium, l'addition de 3 gouttes de FeCl_3 1% (w:v) provoquerait l'apparition d'une coloration bleu- noire intense, signe de la présence de tanins galliques (N'Guessan *et al.*, 2009).

4. 3.7. Caractérisation des stéroïdes

La présence des stérols a été mise en évidence par l'ajout de 5ml d'anhydride acétique à 5ml de chaque extrait dans une capsule, puis le mélange est versé dans un tube à essai en présence du 0,5ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert reflète une réaction positive (Harborne, 1998).

4. 3. 8. Caractérisation des terpenoïdes

5ml de l'extrait a été ajouté à 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau maron-rouge à l'interphase confirme la présence des terpenoïdes (Khan *et al.*, 2011).

4.3. 9. Caractérisation des quinones libres et des antraquinones

Sur un volume de chaque extrait, quelques gouttes de NaOH 1% ont été ajoutées. Une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet qui s'apparait indiquant la présence des quinones libres (Oloyde, 2005). Par ailleurs, la détection des antraquinones est assurée le test de Dohou *et al.*, (2003) par un virage de couleur au rouge de la phase aqueuse obtenu . Préalablement, 10ml de chaque filtrat d'extrait brut ont été mélangé à 10ml de chloroforme. Après une agitation manuelle pendant une minute, le mélange est laissé en repos 24h. Ensuite, une petite quantité de KOH 10% (w : v) a été ajoutée à la phase aqueuse obtenue après la filtration de mélange réactionnel incubé.

4. 4. Quantification des métabolites secondaires du *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

4. 4. 1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu des extraits (EAQ, EMet, EAc et EAce) de la partie aérienne du *R. tuberculata* et de celle du *P. tomentosa* en polyphénols totaux a été déterminé par la méthode décrite par Slinkart et Singleton (1977), en utilisant le réactif de Follin-Ciocalteau 10% (v : v). L'acide gallique (20-160 $\mu\text{g/ml}$) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage, qu'à partir de laquelle la teneur des différents extraits en polyphénols totaux est estimée, en

basant sur l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Figure 3). Les résultats sont exprimés en μg EAG/mg d'extrait.

200 μl de chaque extrait 1mg/ml ou de l'acide gallique, à différentes concentration, ont été ajoutés à 1ml de réactif de Follin-Ciocalteau 10%. Après 4min, 800 μl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 7,5% (w : v) sont additionnés. Le mélange réactionnel est incubé pendant les 2h suivante à température ambiante. L'absorbance a été lue à 765nm (JENWAY 6300 spectrophotomètre).

4. 4. 2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits (EAQ, EMet, EAc et EAcE) de la partie aérienne du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* a été estimée selon la méthode du trichlorure d'aluminium AlCl_3 (Bahorun *et al.*, 1996), qui se repose sur la formation d'un complexe jaunâtre AlCl_3 -flavonoïde, à partir d'une réaction entre les atomes d'oxygène de groupements hydroxyle présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium (Lanika, 2005).

1ml de la solution AlCl_3 2% (w : v) a été ajouté à 1ml de chaque extrait de 1 mg/ml ou de la quercétine (4 à 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) qui est utilisé comme un standard, le mélange laissé réagit pendant 10 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430nm. La concentration du flavonoïde est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie du standard et est exprimée en μg EQ/mg d'extrait.

4. 5. Etude de la toxicité aigue des extraits de *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*

4. 5. 1. Préparation des lots

Cette étude toxicologique est menée dans le présent travail sur 75 souris mâles *Swiss albino* pour examiner la toxicité aiguë de extraits aqueux et méthanoliques de *R. tuberculata* et de *P. tomentosa* et à fin de déterminer, si possible, la dose létale DL_{50} qui cause la mort de 50% d'une population d'animaux testé, en appliquant la méthode graphique standardisée par Miller et Tainter (1944), si cette dernière est inférieure aux doses limites de test (2000 et 5000mg/kg) prévus par les lignes directrices de l'OCDE.

Les souris mâles *Swiss albino*, marqué pour l'identification individuelle, sont répartis selon l'homogénéité de leur poids en 15 lots (n=5 animaux) et laissés pour s'adapter au nouvel environnement pendant dix jours dans des cages en polyxène et dans des contions

favorables d'hébergement. Ils ont été suivis quotidiennement avec l'alimentation par une nourriture classique et reçoivent l'eau potable à satiété avant et après l'administration des doses à tester.

4. 5. 2. Préparation et administration des doses

Différentes doses de 50, 500, 1000, 2000 et 5000mg/kg de l'extrait aqueux EAQ et méthanolique EMet de *R. tuberculata* et uniquement les deux doses limites (2000 et 5000mg/kg) des extraits aqueux EAQ et méthanolique EMet de *P. tomentosa* ont été préparées, en premier ordre, dans de l'eau physiologique saline de NaCl 0.9% pour étudier leur toxicité aiguë sur un intervalle du temps de 14jours (tableau 6).

Dans le premier jour de l'étude toxicologique qui dure 14jours, les souris sont mises à jeun pendant 2h, avant d'avoir reçu les doses testées. En effet, ils sont pesés et ensuite gavés d'un volume de 0,5ml de chaque dose, administré une seule fois à un seul lot (n=5), par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique, selon la méthode de l'ajustement des doses, par des essais limite et principal, proposée par Bruce (1985) pour la détermination de la toxicité aiguë et la DL₅₀ des produits chimiques (OCDE, 2001 ; OCDE, 2008). En revanche, les animaux du groupe témoin ne reçoivent qu'un volume de 0,5ml de l'eau physiologique saline lors de gavage (OCDE, 2001 ; OCDE, 2008).

Tableau 6. Groupes préparés pour l'étude toxicologique de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

Groupe	Dose administrée	Groupe	Dose administrée
AQP ₂₀₀₀	2000mg/kg d'AQ de <i>P. tomentosa</i>	MetP ₂₀₀₀	2000mg/kg d'EMet de <i>P. tomentosa</i>
AQP ₅₀₀₀	5000mg/kg d'AQ de <i>P. tomentosa</i>	MetP ₅₀₀₀	5000mg/kg d'EMet de <i>P. tomentosa</i>
AQR ₅₀	50 mg/kg d'AQ de <i>R. tuberculata</i>	MetR ₅₀	50mg/kg d'EMet de <i>R. tuberculata</i>
AQR ₅₀₀	500mg/kg d'AQ de <i>R. tuberculata</i>	MetR ₅₀₀	500mg/kg d'EMet de <i>R. tuberculata</i>
AQR ₁₀₀₀	1000mg/kg d'AQ de <i>R. tuberculata</i>	MetR ₁₀₀₀	1000mg/kg d'EMet de <i>R. tuberculata</i>
AQR ₂₀₀₀	2000mg/kg d'AQ de <i>R. tuberculata</i>	MetR ₂₀₀₀	2000mg/kg d'EMet de <i>R. tuberculata</i>
AQR ₅₀₀₀	5000mg/kg d'AQ de <i>R. tuberculata</i>	MetR ₅₀₀₀	5000mg/kg d'EMet de <i>R. tuberculata</i>

4. 5. 3. Observation des manifestations de la toxicité

La toxicité aigue suit par des signes cliniques qui se manifestent très vite après l'ingestion de la dose testée. La variation du comportement permet de déterminer les symptômes associées à la toxicité, en plus ou en moins par rapport aux animaux de lot témoin, qui peut changer le bien-être de l'animal (OCDE, 2001 ; OCDE, 2008).

Dans la présente étude, Les signes de la toxicité doivent porter individuellement sur la mortalité et/ou les modifications de peau, des yeux, des muqueuses et des poils, ainsi que du système nerveux autonome et central, l'appareil respiratoire, de l'activité somato-motrice. le tableau suivant représente l'observation quotidienne, portée de chaque animal dans chaque lot (Tableau 7), surtout sur la mortalité et les diverses manifestations de tremblement, l'éthargie, la tachypenie et dyspnée, la variation de poids, salivation, convulsion, diarrhée, sommeil et coma, la consommation hydrique (déshydratation) et l'alimentation (anorexie).

Tableau 7. Observation des manifestations de la toxicité.

	1H	3H	1J	2J	3J	4J	5J	6J	7J	8J	9J	10J	11J	12J	13J	14J
Mortalité																
Poids																
Peau																
Pelage (alopécie)																
Yeux																
Salivation																
Tachy-/dyspnée																
Tremblement																
Convulsion																
Diarrhée																
Léthargie, sommeil et coma																
Anorexie et déshydratation																

4. 5. 4. Prélèvements du sang et préparation des échantillons

Au quatorzième jour d'étude, le jour de sacrifice, le sang a été récupéré à partir de la veine jugulaire externe par décapitation au moment de la jeune des souris. Le sang collecté de chaque animal est réparti dans deux eppendorfs étiquetés, l'un contenant l'EDTA pour les analyses hématologiques et l'autre est sec pour effectuer les analyses des paramètres

biochimiques. Le sang sur sec a été alors centrifugé pendant 15min (1000rpm/min, 4°C). Le plasma récupéré est conservé à - 4°C jusqu'à doser les analyses sériques, en utilisant kit de la glycémie (Kaplan *et al.*, 1984), le cholestérol, triglycéride (TG), la créatinine (Murray *et al.*, 1984), l'urée (Méthode de Berthelot 1960), le taux d'Aspartate aminotransférase (ASAT) et d'Alanine aminotransférases (ALAT).

4. 5. 5. Etude histo-pathologique

Après la dissection de l'animal, le foie et les reins sont prélevés rapidement sur la glace. Ils sont préalablement pesés et puis émergés dans le formolaldehyde 10% pour effectuer l'étude des pathologies anatomiques liées à la toxicité qui sont faites ensuite dans le laboratoire de l'hôpital de gynécologie obstétrique et de pédiatrie (Biskra). Les pièces anatomiques (fois et rein) des souris ont été déshydratées totalement avant l'inclusion dans la paraffine, les trois étapes de déshydratation, d'inclusion et de découpage ont été réalisée sur un automate de circulation, d'inclusion et du microtome respectivement (Leica, Allemande). Ensuite, les coupes ont été étalées à la surface d'un bain chaud (Leica, Allemande) puis déposées sur des lames en verre. Le collage et le séchage se font par chauffage de la lame à l'étuve 74°C. Finalement, les lames passent par une étape de coloration par l'Eosine 2% et montées de lamelles en verre.

La lecture des lames préparées a été réalisée par Dr. Seghiri T., un médecin spécialiste en anatomie pathologique -Biskra-. En premier temps aux faibles grossissements en utilisant impérativement des objectifs plans pour avoir une bonne vue d'ensemble des tissus, les grossissements finaux (x40) sont nettement plus importants. Des captures de quelques observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'un appareil photos (Sumsang Galaxy J4).

4. 6. Analyses statistique

Les résultats des tests de dosage sont exprimés en moyenne de trois répétitions \pm SD, alors que ceux des essais effectués *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SD selon le nombre des animaux survécus. Le calcul des valeurs DL₅₀, et les comparaisons faites par le test de student sont menées par le logiciel SPSS (Statistical Package for Social Science) où les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

Chapitre 5

Résultats et discussion

5.1. Extraction et calcul du rendement

D'une part, les extraits aqueux (EAQ) sont préparés à partir d'une décoction de la partie aérienne de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*, respectivement selon la méthode de Rateesh et Helen (2007). En effet, cette méthode nous permet d'extraire le maximum des composés bioactifs polaires. D'autre part, les extraits hydro-alcoolique, d'acétate d'éthyle et acétoniques (EMet, EAcE et EAc) de la partie aérienne de chacune des plantes étudiées ont été obtenus selon la méthode décrite par Bekheet *et al.* (2011), Khlifi *et al.* (2013), Salem *et al.* (2013) et KACEM *et al.* (2014), respectivement, par macération dans des différents solvants à polarité décroissante le méthanol 80%, l'acétate d'éthyle et l'acétone.

Le rendement correspond au rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids de la matière végétale utilisée (Falleh *et al.*, 2008). En fin, on a remarqué que le rendement obtenu de l'extrait aqueux de chaque plante est toujours supérieur à ceux d'EMet > d'EAc ≥ d'EAcE, respectivement, et leurs valeurs sont de l'ordre de 31%, 9,4%, 0,69% et 0,4% pour le *R. tuberculata* (Figure 3) et de 23%, 6,7%, 1,4%, 1,4% pour le *P. tomentosa* (Figure 4).

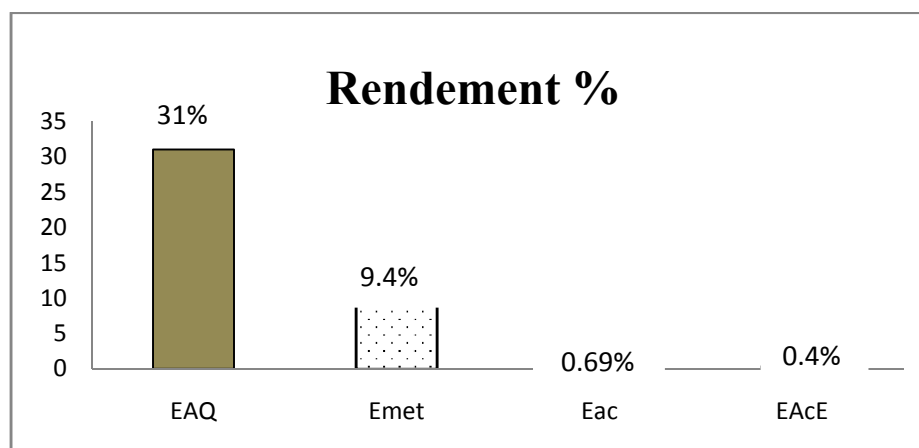


Figure 3. Rendement de différents extraits EAQ, EMet, EAc et EAcE du *R. tuberculata*.

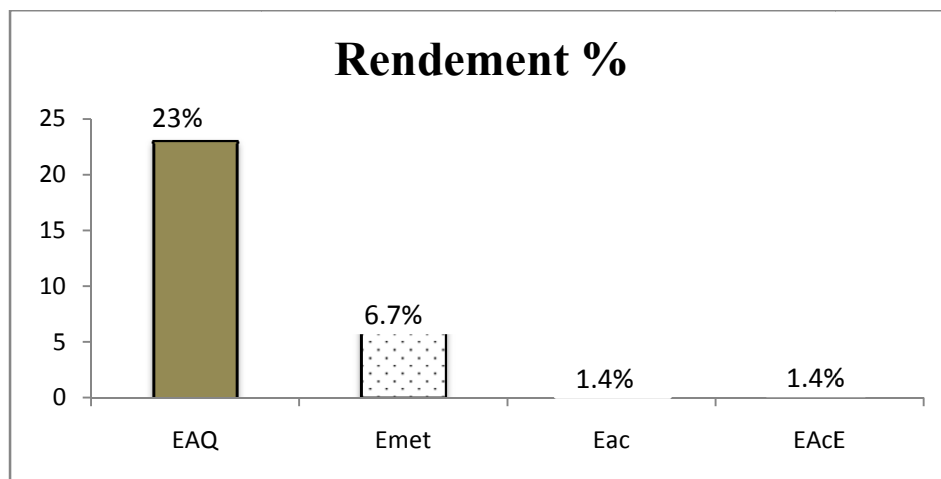


Figure 4. Rendement de différents extraits EAQ, EMet, EAc et EAcE du *P. tomentosa*.

Les études menées sur les différents systèmes solvants utilisés dans l'extraction des métabolites secondaires à base des plantes indiquent que l'eau, le méthanol et leur mélange sont les plus utilisés pour une récupération maximale des métabolites secondaires à grande polarité, principalement les acides phénoliques et certains flavonoïdes. En effet, les alcools et l'eau sont les préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants (Xia *et al.*, 2011 ; Bbouzid *et al.*, 2011). Cependant, les solvants organiques d'extraction, l'acétate d'éthyl et l'acétone, restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes de polarité moyenne et apolaires tels les flavonoïdes glycosides et les flavonoïdes aglycones (Jokić *et al.*, 2010).

En comparaison aux rendements d'extraction du *R. tuberculata* obtenus dans le présent travail, l'étude, qui a été effectuée sur l'espèce *R. chalepensis* L., a montré un rendement d'EMet et d'EAcE plus important avec des valeurs égales à 11% et 7,4% respectivement, avec un faible rendement d'EAQ de 10,4% (Kacem *et al.*, 2015). De plus, les travaux réalisés par Zeghouane (2014) sur l'EMet du *R. tuberculata* et *R. tripartitus*, ont montré que les rendements obtenus sont de 26,49% et 22,88% respectivement, toutefois, ils sont supérieurs que celui trouvé dans notre étude 9,39%.

Par ailleurs, le rendement d'EMet du *P. tomentosa* 6,70% que présente notre étude est supérieur que celui rapporté dans les études de Bekheet *et al.* (2011) sur la même espèce d'une valeur de 5,6%.

En effet, le rendement est relatif aux propriétés génétiques caractérisant les différentes espèces, à la méthode et aux conditions dans lesquelles l'extraction a été faite. De plus, cette différence peut être due à la matière végétale utilisée (Smith-Palmer *et al.*, 2001), Il se varie en fonction de la partie récoltée de la plante et de la saison de récolte. En outre, il est fortement lié aux facteurs géographiques ou la nature du sol et édaphoclimatiques. Le mode et les conditions de stockage peut également influencer sur le rendement Lee *et al.* (2003).

5.2. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique sont obtenus en fonction de l'observation d'un virage de couleur ou d'une précipitation durant la réaction de différents réactifs utilisés avec les métabolites secondaires contenu dans chaque extrait (EAQ, EMet, EAc et EAcE) des deux plantes *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*. Ces résultats sont présentés respectivement dans les tableaux ci-dessous (Tableau 8 et 9).

Les tests de screening phytochimiques des quatre extraits réalisés sur la partie aérienne du plante *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*.

Tableau 8. Screening phytochimiques de différents extraits du *R. tuberculata*.

	Saponosides	Antra-quinones	Quinone libre	Alcaloïdes	Coumarines	Stérols	polyphénols	Flavonoïdes	Tanins condensés	Tanins gallique	Terpénoïdes
EAQ	+	-	+	-	-	-	++	+	++	+	-
EMet	-	-	-	+	-	+	++	++	-	++	-
EAc	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
EAcE	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Tableau 9. Screening phyto-chimiques de différents extraits de *P. tomentosa*.

	Saponosides	Anthra-quinones	Quinone libre	Alcaloïdes	Coumarines	Stérols	polyphénols	Flavonoïdes	Tanins condensés	Tanins gallique	Terpénoïdes
EAQ	+	-	+	+	+	-	+	++	+	+	-
EMet	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	-
EAc	-	-	-	+	+	++	-	+	+	+	+
EAcE	-	-	-	-	+	++	-	-	+	+	+

(-) : absence ; (+) : faible présence ; (++) : présence moyenne ; (+++) : forte présence.

Nous remarquons la richesse de EAQ en saponosides, qui sont absents totalement dans les restes d'extraits (EMet, EAc, EAcE) pour les deux plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*. Concernant les quinones libres, nous observons leur présence dans tous les extraits de la plante *R. tuberculata* à l'exception de l'EMet. Par contre, tous les extraits de la plante *P. tomentosa* semblent dépourvus des quinones libres à l'exception de son EAQ, en absence totale des anthra-quinones dans tous les extraits soit de *R. tuberculata* où même de *P. tomentosa*.

En outre, les différents extraits des deux plantes étudiées présentent une richesse en stérols à part que leur EAQ. En revanche, le test phytochimique de caractérisation des terpénoïdes a montré que les extraits EAc et EAcE sont exclusivement les seuls qui possèdent ce métabolite chez les deux plantes.

Cependant, la présence des coumarines uniquement dans les EAc et EAcE des deux plantes a été notée, avec leur présence également dans l'EAQ de *R. tuberculata*. De plus, le test des alcaloïdes a été montré que les extraits *R. tuberculata* contiennent les alcaloïdes sauf l'EAQ, au contraire, ce métabolite secondaire se restreint uniquement dans les EAQ et EAcE de *P. tomentosa*.

Par ailleurs, les EAQ et EMet de deux plantes étudiées présentent un important contenu en polyphénols, flavonoïdes et en tanins, sachant que, la plante *P. tomentosa* semble plus riche en tanins condensés par tous ses extraits que la plante *R. tuberculata*.

5.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui contiennent dans leur structure un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Boizot et Charpentier, 2006). Ces phénols tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont connus récemment comme des molécules bioactives qui possèdent des capacités antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, antibactériennes, antivirales et vasodilatatrices (Li *et al.*, 2007 ; Gulcin *et al.*, 2010).

C'est ce qui nous a motivé à doser ces métabolites dans les quatre extraits de chacune des plantes *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*, en appliquant à la fois la méthode de Slinkaret Singleton (1965) qui nous permet d'estimer la teneur des extraits en polyphénols et la méthode au trichlorure d'aluminium pour le dosage des flavonoïdes (Baharun *et al.*, 1996). En effet, les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de chaque extrait ont été calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie par l'acide gallique et la quercétine, respectivement (figure 5 et figure 6). Les valeurs de teneurs sont exprimées en μg EAG/mg E et en μg EQ/mg E comme elles sont envisagées dans le tableau 10.

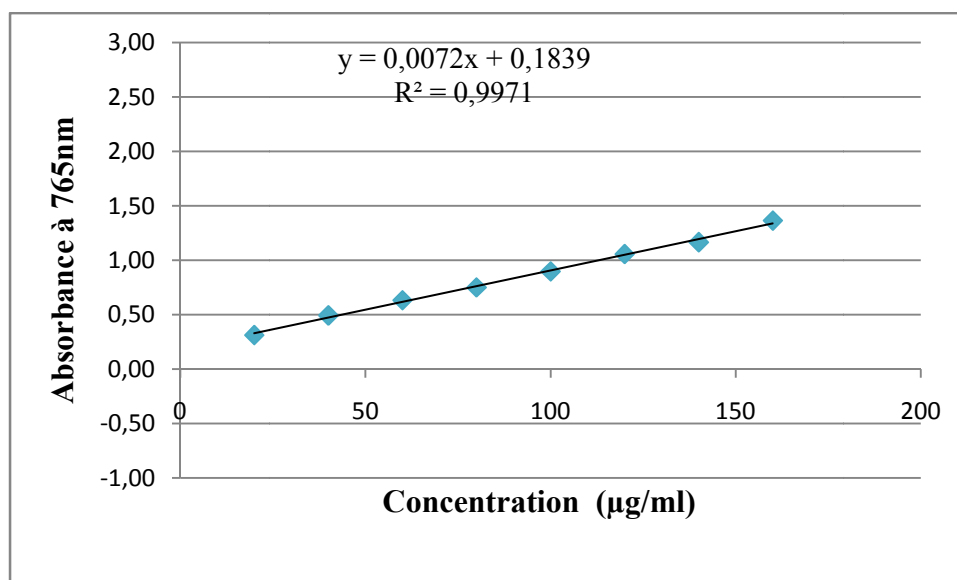


Figure 5. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique $m \pm SD$ ($n=5$).

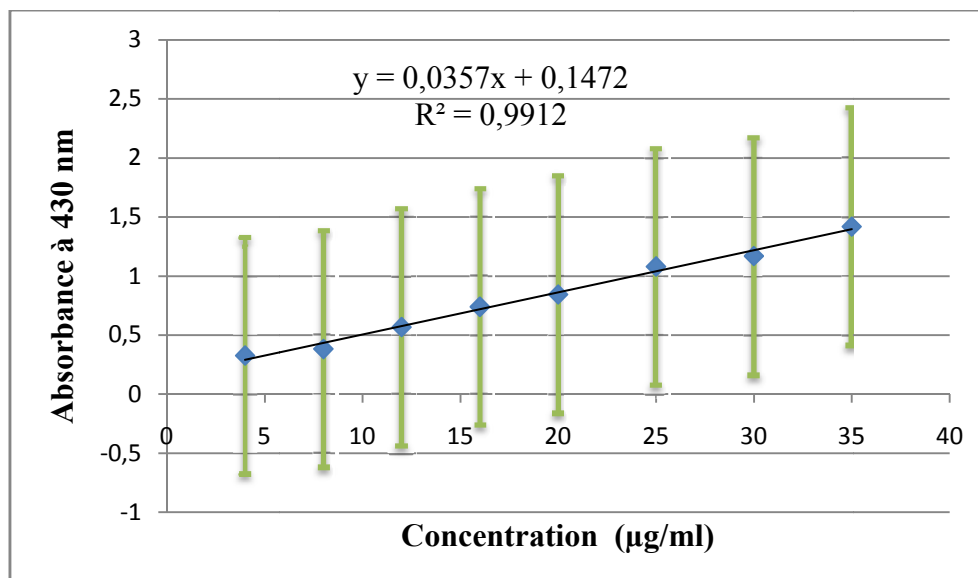


Figure 6. Courbe d'étalonnage de quercetine $m \pm SD$ ($n=5$).

Tableau 10. Teneurs des extraits de *R. tuberculata* et *P. tomentosa* en polyphénols et en flavonoïdes.

Plante	Extrait	$\mu\text{g EAG/mg E}$	EQ/mg E
<i>R. tuberculata</i>	EAQ	$6,61 \pm 2,02$	$3,29 \pm 0,16$
	EMet	$5,80 \pm 1,03$	$4,66 \pm 0,17$
	EAcE	$3,52 \pm 0,96$	$11,05 \pm 0,20$
	EAc	$6,36 \pm 1,19$	$8,18 \pm 0,08$
<i>P. tomentosa</i>	EAQ	$8,52 \pm 1,21$	$3,57 \pm 0,11$
	EMet	$5,56 \pm 1,44$	$1,79 \pm 0,17$
	EAcE	$7,78 \pm 2,48$	$11,13 \pm 0,06$
	EAc	$7,13 \pm 0,76$	$3,97 \pm 2,23$

5.4. Toxicité aiguë des EAQ et Met des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

5.4.1. Pourcentage de la mortalité

Dans la présente étude de la toxicité aiguë des extraits EAQ et EMet du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* a été effectuée sur des souris mâles *Swiss Albinos* regroupés en 15 lots de 5 animaux /lot. Elle est menée conformément à la directive de l'OCDE (2001) et (2008), en

examinant différentes doses (50, 500, 1000, 2000, 5000mg/kg) de chaque extrait (EAQ et EMet) de *R. tuberculata* et de deux doses limites (2000mg/kg et 5000mg/kg) pour chacun des extraits EAQ et EMet de *P. tomentosa*. Les doses sont administrées une seule fois par voie orale ou gavage qui se fait à l'aide d'une sonde gastrique.

L'observation de la mortalité chez les souris traités par les deux extraits EAQ et EMet du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* sont faite pendant les 14 jours d'étude. Cependant, nous avons enregistré une faible mortalité dans certains groupes gavés par les EAQ et EMet comme illustre le tableau 11. Selon les lignes directrices de l'OCDE (2008), la DL_{50} est inférieure à l'une des doses limites 2000 ou 5000mg/kg si on constate au moins 3 morts/ 5 animaux dans l'un des groupes recevant la dose 2000 ou 5000mg/kg. Ce qui nous a permis de prédire que la DL_{50} est se situe au-delà de la dose limite 5000mg/kg pour tous les deux extraits de plantes étudiées.

Tableau 11. Nombre et pourcentage de la mortalité après le gavage.

		EAQ		EMet	
		N ^o m / N ^o t	M%	N ^o m / N ^o t	M%
	Lot Témoin	0/5	0%	0/5	0%
<i>R. tuberculata</i>	50 mg/kg	0/5	0%	0/5	0%
	500 mg/kg	0/5	0%	0/5	0%
	1000 mg/kg	1/5	20%	1/5	20%
	2000 mg/kg	0/5	0%	0/5	0%
	5000 mg/kg	0/5	0%	1/5	20%
<i>P. tomentosa</i>	2000 mg/kg	1/5	20%	0/5	0%
	5000 mg/kg	0/5	0%	0/5	0%

(N^om) : nombre de mortalité ; (N^ot) : nombre totale des animaux ;

(M%) : pourcentage de la mortalité.

Selon Frank (1992), la substance ou l'extrait testé est légèrement toxique si la valeur de DL_{50} se situe entre 500 et 5000mg/kg. D'après les résultats de la mortalité engendrée par les extraits de *R. tuberculata* et de *P. tomentosa*, leur DL_{50} est supérieur de cet intervalle et alors les plantes pourraient être considérée légèrement toxiques. Ce qui permet de classer les deux extraits dans la catégorie des substances faiblement toxique, selon la classification de Hodge et Sterner (Frank, 1992)

5.4.2. Variation du poids corporel

Durant l'étude de la toxicité aiguë d'EAQ et EMet des deux plantes *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa*, la prise du poids corporel des souris, a été faite du 1^{er} jour avant l'administration des doses jusqu'au 14^{ème}, et la variation pondérale a été calculée et représentée dans le tableau 12.

$$\text{Variation du poids corporel(\%)} = (P_j - P_{j_0}) * 100 / P_{j_0}$$

D'après les résultats obtenus en comparaison au groupe témoin, la variation de poids corporel des animaux pendant la surveillance semble une croissance différentielle dans la masse moyenne pour tous les lots à différentes doses administrées de EAQ et EMet (5000mg/kg, 2000 mg/kg, 1000mg/kg, 500mg/kg, 50mg/kg) de la plante *R. tuberculata* et les doses limites (5000 mg/kg, 2000 mg/kg) concernant la plante *P. tomentosa*.

Tableau 12. La variation du poids corporel des lots recevant les différents extraits de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*

	Temps	EAQ			EMet		
		T ₀ (g)	T ₁ (g)	V (%)	T ₀ (g)	T ₁ (g)	V (%)
	Témoin	25.8±0.8	26±1.6	0.78	/	/	/
<i>R. tuberculata</i>	50mg/kg	28.6±2.1	38.2±3.1	33.6	28.8±2.2	33.4±5.3	15.8
	500 mg/kg	31.2±4.8	33.8±4.3	8.3	30.6±3.8	34±3.9	11.1
	1000 mg/kg	29±3.6	32.5±3.4	12.1	23.7±0.6	31.7±2.5	33.8
	2000 mg/kg	27.8±3.8	36.6±2.8	31.6	26.6±3.3	34.4±2.5	29.3
	5000 mg/kg	27.2±4.4	33.8±2.6	24.3	26±2.9	33.7±0.5	29.8
<i>P. tomentosa</i>	2000 mg/kg	26±2.05	31±5.2	19.2	26.2±4.8	32.4±3.6	23.6
	5000 mg/kg	23±2.24	31.6±3	37.4	28.4±2.2	31.4±3.3	10.6

T₀ : avant l'administration de la dose testée T₁ : le 14^{ème} jour V (%): Pourcentage de variation

Selon les lignes directrices d'OCDE (2001) et (2008), l'anorexie ou la perte de poids corporel résulte d'une réduction de consommation alimentaire et elle est portée comme un indicateur de l'altération du bien-être de l'animal qui se lie à la toxicité par des substances administrées. Dans notre étude, les doses gavées aux souris de tous les groupes soit de *R. tuberculata* et *P. tomentosa* n'influencent pas négativement sur le poids corporel par contre on a enregistré une augmentation dans la masse moyenne de chaque groupe qui se varie de

8% à 33% pour les groupes AQR et entre 16% à 33% pour les groupes MetR. La svariation enregistrée pour les groupes AQP et MetP se varie de 10,6%, 19,2%, 23,6% et 37,4% en fonction de l'extrait et la dose administrée (Tableau 12)

5.4.1. Symptômes cliniques liées aux effets d'extraits EAQ et Met des plantes étudiées

Après l'administration, une seule fois et par gavage, de différentes doses d'extraits EAQ et EMet de *R. tuberculata* et de *P. tomentosa* aux souris males *Swiss albino*, les symptômes de la toxicité aiguë sont ensuite suivis pendant les 14jours, en aval, en surveillant la mortalité et le changement en comportement général des animaux qui se traduit à un tremblement, une léthargie, une tachypenie ou dyspnie, une variation de poids, une salivation, une convulsion, une un diarrhée, sommeil ou coma, une déshydratation et une anorexie. En effet, la prise des manifestations liées à l'altération du bien-être de l'animal est faite par rapport à un lot témoin.

Dans la présente étude toxicologique, on n'a constaté aucun signe d'intoxication sur le groupe témoin reçu l'eau physiologique Na Cl 0,9% et les animaux de ce groupe témoin possèdent un comportement normal avec une consommation alimentaire et hydrique normale.

Par contre, la surveillance des groupes traités par les différentes doses d'extraits EAQ et EMet du *R. tuberculata* et de *P. tomentosa*, nous permet d'avoir noté l'apparition des signes cliniques principalement le sommeil, le tremblement, la tachypnée, l'anoxie et la déshydratation légères pendant les 14 jours, ce qui indique la présence d'une certaine intoxication chez les souris en fonction de l'extrait et la dose administrée. En effet, le tableau 13, qui illustrent les signes observés sur les groupes recevant des différentes doses des EAQ et EMet de *R. tuberculata*, montre que les animaux de tous les lots traités par cette plante présentent des différents signes de la toxicité, qui s'apparaissent pendant les premiers huit jours. En effet, ces manifestations semblent relativement plus importantes quand la dose administrée sera augmentée. En outre, on a observé une disparition de la plupart de ces signes à partir de 8^{ème} jour jusqu'au 14^{ème} jour, la fin d'expérience.

Encore, on a constaté que les animaux de groupe AQR₂₀₀₀ ont apparus la plus de souffrance telle que la longue durée du sommeil, l'léthargie, la rougeur de la peau, l'alopécie (voir Annexe3.), l'anoxie et la déshydratation et encore la respiration laborieuse de 6^{ème} jour au 9^{ème} jour, ainsi que la tachypnée qui persiste jusqu'au dernier jour. Par contre, l'intoxication quelle présentent les groupes AQR₅₀₀₀ et MetR₅₀₀₀, semble moins importante et se manifeste

par la tachypnée, le tremblement et la somnolence pendant les premiers 24h d'administration avec l'apparition d'une rougeur de la peau. Alors que l'alopecie ne se manifeste qu'après le 7^{ème} jour et uniquement dans le groupe AQR₅₀₀₀ avec un larmolement léger.

Cependant, le tremblement et tachypnée ont été observés chez les souris de l'EAQ₁₀₀₀ et EMet₁₀₀₀, en ensemble, pendant les deux premiers jours seulement de l'étude toxicologique, où que certains souris tombent en sommeil et perdent leurs appétit pendant la 1^{ère} h de gavage.

Par ailleurs, les quatre groupes (AQR₅₀ et EMet₅₀, AQR₅₀₀ et MetR₅₀₀) n'ont monté qu'un faible nombre de signes cliniques tels la somnolence, la convulsion, la tachypnée et le tremblement qui sont disparus après le 2^{ème} jour.

Tableau 13. Signes cliniques observés chez le animaux de différents groupes traités par l'EAQ et Met de *R. tuberculata*.

	Dose	Surveillance	EAQ	EMet	
<i>Ruta tuberculata</i>	50 mg/kg	1 ^{ère} h au 2 ^{ème} jr	-Perte légère d'appétit (anorexie) et déshydratation -Tachypnée, Sommeil suivi par Tremblement		
		2 ^{ème} jr au 8 ^{ème} jr	- Somnolence -Anorexie et déshydratation légères		
		8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	- Disparition de tous les signes		
	500 mg /kg	1 ^{ère} h au 2 ^{ème} jr	-Sommeil et Tachypnée - Tremblement et convulsion -Anorexie et déshydratation moyennes		
		2 ^{ème} jr au 8 ^{ème} jr	- Somnolence -Anorexie et déshydratation moyennes		
		8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	-Anorexie et déshydratation légères et Disparition des autres signes		
	1000 mg/kg	1 ^{ère} h au 2 ^{ème} jr	-Sommeil suivi par Tremblement -Larmolement		-Tremblement
			-Anorexie et déshydratation moyennes -Tachypnée		
		2 ^{ème} jr au 8 ^{ème} jr	-Changement de couleur de la peau		-Tachypnée
			-Somnolence -Anorexie et déshydratation moyennes		
	8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	Anorexie et déshydratation légères et Disparition des autres signes			
	2000 mg/kg	1 ^{ère} h au 2 ^{ème} jr	- Sommeil et Tachypnée		-Tachypnée et Tremblement -Somnolence et convulsion
-Anorexie et déshydratation légères					
2 ^{ème} jr au 8 ^{ème} jr		- Somnolence - Tachypnée		-Tachypnée et Tremblement -Somnolence et convulsion	
		8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr		-Perte Pelage (alopecie) -Rougeur de la peau	

5000 mg/kg		-Tachypnée -Anorexie et déshydratation moyennes
	1 ^{ère} h au 2 ^{ème} jr	-Larmoiement -Anorexie et déshydratation légères. - Somnolence, Tachypnée et Tremblement
	2 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	-Rougeur de la peau -Perte du pelage - Anorexie et déshydratation moyennes
		- Somnolence.

En comparaison au groupe témoin et aux groupes traités par les extraits de *R. tuberculata*, les quatre groupes (AQP₂₀₀₀ et AQP₅₀₀₀, MetP₂₀₀₀ et MetP₅₀₀₀) qui reçoivent l'une des doses limites (2000 ou 5000mg/kg) de l'un des extraits EAQ ou EMet de la plante *P. tomentosa*, présentent des symptômes moins importants tels que la Tachypnée, le tremblement, la convulsion, une légère anoxie et déshydratation, qui s'apparaissent uniquement sur les animaux de 1^{ère} heure jusqu'au 8^{ème} jour, en absence du sommeil à longue durée. Par contre, ces signes sont disparus chez tous ces groupes pendant le reste de la période d'étude de 8^{ème} jour jusqu'à la fin de l'expérience (Tableau 14).

Tableau 14. Signes cliniques observés chez le animaux de différents groupes traités par l'EAQ et Met de *P. tomentosa*.

	Dose	Surveillance	EAQ	EMet
<i>Pergularia tomentosa</i>	2000 mg/kg	1 ^{ère} h au 8 ^{ème} jr	- Tachypenie, tremblement et convulsion -Anorexie et déshydratation légères	
		8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	-Rougeur de la peau -Disparition des autres signes	-Disparition des autres signes
	5000 mg/kg	1 ^{ère} h au 8 ^{ème} jr	- Tachypenie, tremblement et convulsion -Anorexie et déshydratation légères	
		8 ^{ème} jr au 14 ^{ème} jr	-Anorexie et déshydratation légères	

D'après les résultats obtenus dans la surveillance et la prise des signes de la toxicité, nous suggérons que les extraits aqueux de la plante *R. tuberculata* exercent un effet toxique plus important que les extraits de la plante *P. tomentosa* et que l'EAQ de *R. tuberculata* est plus toxique que son extrait EMet. Cela peut être dû à leur contenu en alcaloïdes.

En effet, les alcaloïdes, en particulier les alcaloïdes quinol-izidiniques quels contiennent les plantes médicinales, sont connus par leurs effets toxiques neurologiques, en provoquant le sommeil à longue durée, la convulsion et le tremblement (OCDE, 2001). De plus, la

respiration laborieuse et l'accélération du rythme cardiaque sont dues probablement à l'atteinte du système nerveux centrale quelle provoque les alcaloïdes. En outre, ces métabolites secondaires peuvent présenter un effet hypoglycémiant, en provoquant ainsi l'hypotension et la dépression respiratoire (Kinghore et Balandrin, 1984; Wink, 1993). ils sont considérés de façon générale comme des agonistes des récepteurs nicotinique et muscariniques de l'acétylcholine et des inhibiteurs des canaux Na^+/K^+ (Schmeller *et al.*, 1994 ; Carbonnelle *et al.*, 2003), ce qui se traduit par un changement dans le comportement général de l'animal qui reçoit un apport de ces métabolites. Cela peut expliquer l'apparition de différents signes de la toxicité intensivement chez les groupes traités par les extraits de la plante *R. tuberculata*, notamment son extrait EAQ riche en alcaloïdes, que les groupes recevant une dose de l'un des extraits EAQ et EMet de *P. tomentosa*. Par ailleurs, l'empoisonnement par les saponines peut conduire à la perte d'appétit et en conséquence la réduction de poids (Alain, 2002).

5.4.3. Analyses des paramètres hématologiques

Le sang sert à transporter de nombreux molécules, parmi lesquelles le médicaments et xénobiotiques, comme des composés étrangers qui sont distribués par la circulation sanguine (Timbrel, 2009). L'hématotoxicité est une atteinte toxique des cellules sanguines et des tissus hématopoïétiques. La moelle osseuse produit des cellules souches qui sont des précurseurs des globules rouges, des globules blancs, et des plaquettes (Baker, 2012; Deshpande, 2005). Les globules blancs jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, la coagulation et le système immunitaire, cependant, les globules rouges fournissent principalement de l'oxygène à toutes les cellules du corps et éliminent le carbone dioxyde de ces cellules (Baker, 2012; Deshpande, 2005).

L'hémogramme correspond à l'analyse quantitative (compteurs électroniques) permettant de chiffrer le nombre de globules blancs (WBC) en $10^9/\text{l}$, de globules rouges (RBC) en $10^{12}/\text{l}$ et de plaquettes (PLT) (sont utiles à l'hémostase primaire (clou plaquettaire)) en $10^9/\text{l}$. L'hémoglobine (HGB) sanguine correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans 1 dl de sang. L'hématocrite c'est la répartition des globules rouges par rapport au plasma (exprimée en %). Volume Globulaire Moyen (VGM) est exprimé en μ^3 . Il s'agit d'une valeur moyenne, la taille des globules rouges pouvant varier (anisocytose).

Les résultats des analyses hématologiques obtenus pour les différents lots traités ou non par les extraits EAQ et EMet de l'une des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa* sont

représentés, respectivement, dans les tableaux 15 et 16 ci-dessous. Les résultats obtenus pour les analyses hématologiques de sang collecté, à partir des groupes AQR et AQP et de groupe témoin, ont montré qu'il n'y a pas d'une différence significative ($p \geq 0.05$) entre eux concernant tous les paramètres hématologiques WBC, RBC, HGB, HCT et VGM à l'exception des groupes AQR₁₀₀₀ et AQP₅₀₀₀ qui semblent une réduction significative ($p \leq 0.05$) dans les paramètres RBC, HGB, HCT avec une réduction hautement significative ($p \leq 0.0001$) chez le groupe AQR₁₀₀₀. Les valeurs du PLT chez les groupes AQR et AQP et le groupe témoin ont montré aucune différence significative ($p \geq 0.05$), par ailleurs, les groupes AQR₂₀₀₀ et AQP₅₀₀₀ ont montré une augmentation peu significative ($p \leq 0.05$).

Tableau 15. Analyses hématologiques du sang collecté des groupes recevant des différentes doses de l'EAQ de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

Lots	WBC (10 ⁹ /l)	RBC (10 ¹² /l)	HGB (g/dl)	HCT (%)	VGM (μ ³)	PLT (10 ⁹ /l)
Témoin	3.0±1.3	8.42±1.0	14.3±1.7	42.96±5.1	5.1±0.06	335.60± 64.9
AQR ₅₀	4.7±2.6 ^{ns}	8.3±3.4 ^{ns}	13.9±5.6 ^{ns}	48,90±5,63 ^{ns}	5.03±0.2 ^{ns}	430,67±94,94 ^{ns}
AQR ₅₀₀	6.3±2.2 [*]	8.6±0.90 ^{ns}	14.40±1.4 ^{ns}	43.20±4.3 ^{ns}	5.02±0.2 ^{ns}	375.80±57.4 ^{ns}
AQR ₁₀₀₀	2.5±4.5 ^{ns}	2.60±4.1 [*]	4.6±7.0 [*]	3,35±0,85 ^{****}	5.97±0.9 ^{ns}	378,00±107,48 ^{ns}
AQR ₂₀₀₀	5.1±2.0 ^{ns}	6.7±2.7 ^{ns}	12.00±4.8 ^{ns}	42,15±5,19 ^{ns}	5.4±0.1 ^{**}	529,00±111,26 [*]
AQR ₅₀₀₀	4.1±2.5 ^{ns}	6.8±3.7 ^{ns}	11.68±6.2 ^{ns}	43,05±5,60 ^{ns}	5.2±0.2 ^{ns}	426,50± 35,27 [*]
AQP ₂₀₀₀	7.3±0.9 ^{***}	8.4±0.9 ^{ns}	14.3±1.7 ^{ns}	43.05±5.1 ^{ns}	5.1±0.1 ^{ns}	380,00±62,48 ^{ns}
AQP ₅₀₀₀	3.6±1.03 ^{ns}	6.18±1.49 [*]	10.55±2.6 [*]	31.65±7.7 [*]	5.1±0.1 ^{ns}	260,00±42,43 ^{ns}

ns ($p \geq 0.05$) : non significative ; * ($p \leq 0.05$) : significative; ** ($p < 0.01$) : très significative; *** ($p \leq 0.001$) : hautement significative.

Tableau 16. Analyses hématologiques du sang collecté des groupes recevant des différentes doses de l'EMet de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

Lots	WBC (10 ⁹ /l)	RBC (10 ¹² /l)	HGB (g/dl)	HCT (%)	VGM (μ ³)	PLT (10 ⁹ /l)
MetR ₅₀	6.0±0.2 ^{ns}	6.2±3.0 ^{ns}	12,55±3.46 ^{ns}	30.8±13.9 ^{ns}	5.02±0.2 ^{ns}	1628,50±144,96*
MetR ₅₀₀	5.1±2.4 ^{ns}	9,12±1,97 ^{ns}	15.25±2.16 ^{ns}	48,00± 5,72 ^{ns}	4,92±0.2 ^{ns}	805,00±103,24** *
MetR ₁₀₀₀	6.9±0.6 ^{**}	8.0±1.3 ^{ns}	13.7±2.0 ^{ns}	41.1 ±5.98 ^{ns}	5.1±0.1 ^{ns}	213,67± 24,85*
MetR ₂₀₀₀	3.9±1.6 ^{ns}	7.6±2.6 ^{ns}	14,33±2,16 ^{ns}	42,98±6,48 ^{ns}	4.96±0.08*	324,00± 43,35 ^{ns}
MetR ₅₀₀₀	4.8±1.9 ^{ns}	8.2±1.1 ^{ns}	14.1±1.8 ^{ns}	48,00±5,72 ^{ns}	5.2±0.1 ^{ns}	387,33±72,82*
MetP ₂₀₀₀	5.4±1.9*	7.8±1.1 ^{ns}	13.2±1.7 ^{ns}	42,80± 2,13 ^{ns}	5.1±0.2 ^{ns}	385,00 ±58,95 ^{ns}
MetP ₅₀₀₀	2,6±0,35 ^{ns}	5,03±1,72 ^{**}	6.6±3.9 ^{**}	27,20±8,68 ^{**}	5.4±0.08 ^{**}	416,67±97,55 ^{ns}

ns ($p \geq 0.05$) : non significative ; * ($p \leq 0.05$) : significative; ** ($p < 0.01$) : très significative; *** ($p \leq 0.001$) : hautement significative.

Toutefois, les groupes qui reçoivent l'EMet, à différentes doses de *R. tuberculata* et de *P. tomentos*, possèdent des paramètres hématologiques de valeurs qui sont statistiquement non significatives, en comparaison au groupe témoin, à l'exception de groupe MetP₅₀₀₀ où on a constaté une réduction significative ($p < 0.01$) notamment pour les valeurs de RBC, HGB, HCT et VGM. De plus, une autre exception a été notée chez les groupes MetR₁₀₀₀ et MetP₂₀₀₀ qui présentent une augmentation significative dans la valeur de WBC. Par contre, on a remarqué que la valeur de PLT engendrée par toutes les doses a semblé une augmentation en comparaison à celle enregistrée chez le groupe témoin, à l'exception de groupe MetR₅₀₀ qui présente une augmentation hautement significative et on remarque une réduction significative pour le groupe MetR₁₀₀₀.

La diminution significative des taux de globules rouges et de l'hématocrite pourrait être liée à la présence de l'hémolysine, une substance saponoside à effet hémolytique (Yuldasheva *et al.*, 2005), dans ces extraits notamment dans l'extrait EAQ.

La présence de tanins suggéré la capacité à jouer un rôle majeur comme un agent anti-diarrhéique et antihémorragique (Awoyinka *et al.*, 2007).

5.4.4. Analyse des paramètres biochimiques

A l'échelle traditionnelle, l'utilisation des substances extraites des plantes médicinales est vaste et toutefois certaines d'entre elle sont utilisées irrégulièrement et non soigneusement. Ce qui peut induire la toxicité qui s'associe parfois à la perturbation des paramètres biochimiques (OCDE 2001 et Kacem *et al.*, 2014). En effet, nombreux composés à bases de plantes s'accumulent après leur absorption dans certains organes, notamment le foie et les reins, les responsables de la biotransformation et l'excrétion (Clarke et Clarke, 1977), en provoquant leurs dysfonctionnements par une augmentation ou diminution de certains paramètres tels que les activités des transaminases (ALAT et ASAT), des taux de créatinines, d'urées, du glycémie, triglycérides et de cholestérol dans le sérum sanguin (Talkian, 1979 ; Kacem *et al.*, 2014).

Dans notre étude toxicologique, nous avons examiné l'effet probable des extraits EAQ et Emet de la partie aérienne du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* à différentes doses sur les paramètres biochimiques des souris mâles *Swiss albino* en comparaison aux valeurs enregistrées par le groupe témoin, tandis que les analyses biochimiques sont effectuées sur le sérum sanguin récupéré des souris, après centrifugation à froid. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 17 et 18, respectivement.

Tableau 17. Analyse des paramètres séro-biochimiques de tous les lots de l'EAQ de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

	Glycémie (g/l)	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)	Tri- glycérides (g/l)	Cholestérol (g/l)	ALT (UI/l)	AST (UI/l)
Témoin	1.7± 0.1	0.8±0.1	0.6±0.4	2.4±0.7	1.2±0.1	79.00±9.64	380±69.40
EAQ50 R	1.14±0.33**	0.36±0.11***	0.99±1.68 ^{ns}	0.61±0.05**	0.97±0.38 ^{ns}	71.25± 2.7 ^{ns}	269.00± 16.29*
EAQ500R	1.33±0.27*	0.40±0.05**	2.27±1.53 ^{ns}	1.01±0.31**	1.42±0.38 ^{ns}	64.00±8.1 ^{ns}	496.00± 66.56 ^{ns}
EAQ1000 R	1.41±0.14*	0.59±0.06*	1.48±0.67 ^{ns}	0.72±0.08*	2.69±0.86**	45.00±4.7 ^{ns}	231.25±67. 51*
EAQ2000 R	2.42±0.42**	0.81±0.19 ^{ns}	1.65±0.33**	1.10±0.16**	3.03±0.72** *	65.20±7.9 ^{ns}	320±69.69 ^{ns}
EAQ5000 R	1.77±0.37 ^{ns}	2±0.56**	2.17±0.62**	3.34±0.87 ^{ns}	1.56±0.69 ^{ns}	74.75±9.7 ^{ns}	304.75± 80.25 ^{ns}

EAQ2000P	1.24±0.35*	1.50±0.67*	1.21±0.36 ^{ns}	3.57±0.30 ^{ns}	0.56±0.12**	66.25±10.0 1 ^{ns}	375.50±73. 48 ^{ns}
EAQ5000P	1.91±0.42 ^{ns}	0.94±0.30 ^{ns}	0.82±0.28 ^{ns}	1.98±0.56 ^{ns}	1.61±0.63 ^{ns}	82.60±10.9 5 ^{ns}	311.40± 73.69 ^{ns}

ns (p ≥ 0.05) : non significative ; * (p ≤ 0.05) : significative; ** (p<0.01) : très significative; *** (p ≤ 0.001) : hautement significative.

Tableau 18. Analyse des paramètres séro-biochimiques de tous les lots recevant l’EMet de *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.

	Glycémie (g/l)	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)	Triglycéride s (g/l)	Cholestéro l (g/l)	ALT (UI/l)	AST (UI/l)
EMet50R	1.20±0.5 ^{ns}	0.22± 0.09****	4.24±1.71**	0.88±0.37**	1.25±0.60 ^{ns}	90.00±6 0.89 ^{ns}	407.25± 261.65 ^{ns}
EMet 500R	1.37±0.3 ^{ns}	0.77±0.2 ^{ns}	10.60± 2.47****	1.39± 0.52*	1.76±0.55 ^{ns}	130±36. 33 ^{ns}	504,67 ±65,16 ^{ns}
EMet1000 R	1.60±0.1 ^{ns}	0.71±0.3 ^{ns}	2.70± 0.34**	0.88±0.12**	2.80±0.51 ^{ns}	81.00± 7.07 ^{ns}	247± 94.57 ^{ns}
EMet 2000 R	2.05±0.2 ^{ns}	0.81±0.1 ^{ns}	2.16±0.48**	1.25±0.23*	3.48± 0.32****	57.20±1 1.71 ^{ns}	345.20± 121.86 ^{ns}
EMet 5000 R	1.55±0.2 ^{ns}	1.98± 0.46**	1.49±0.20*	3.02±0.80 ^{ns}	1.15±0.19 ^{ns}	60± 10.07 ^{ns}	360± 61.77 ^{ns}
EMet 2000 P	1.62±0.5 ^{ns}	1.48±0.80 ns	2.05±0.63*	3.96±1.27*	0.77±0.22**	62.80±1 2.48 ^{ns}	290.40± 57.50 ^{ns}
EMet 5000 P	2.08±0.4 ^{ns}	1.03±0.4 ^{ns}	0.86±0.27 ^{ns}	2.32±0.73 ^{ns}	1.33±0.30 ^{ns}	93.60±8 .68 ^{ns}	450.60± 72 ^{ns}

ns (p ≥ 0.05) : non significative ; * (p ≤ 0.05) : significative; ** (p<0.01) : très significative; *** (p ≤ 0.001) : hautement significative.

En comparaison avec des valeurs indiquées par le groupe témoin, Les résultats obtenus ont montré le taux de glycémie subit significativement (p ≤ 0.05) une diminution modérée chez les souris gavés par les doses 50, 500 et 1000 mg/kg d’EAQ du *R. tuberculata* et AQP₂₀₀₀. Par contre, ce paramètre présente une augmentation importante (p <0.01) chez les groupes traités par le dose limite 2000mg/kg de EAQ de la même plante (Tableau 17). Cependant, tous les groupes traités par les différentes doses de l’EMet de chacune des deux

plantes semblent un taux de glycémie similaire statistiquement à celui engendré par le groupe témoin.

En effet, la concentration sanguine de glucose dépend des proportions relatives de glucose entrant dans la circulation du glucose utilisé (Marshall et Banger, 2005) et la stabilité de la glycémie est un indicateur de l'hémostasie (Serge, 1985). Cependant, les métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoides, les tanins et les huiles essentielles, possèdent une activité hypoglycémiant (Martes et farnsworth, 1996 ; Sanjay, 2002). L'étude effectuée par Marghem (2015) a confirmé que la plante *R. montana* et ses extraits présentent une activité antidiabétique. En effet, les alcaloïdes peut exercer un effet toxique associé à l'altération de métabolisme hépatique, en empêchant le stockage du glucose sous forme du glycogène, ce qui se traduit à une hyperglycémie observés chez le groupe AQR₂₀₀₀.

Les résultats ont indiqué une diminution notable et significative de taux du triglycéride TG chez les souris de groupes AQR₅₀, 500, 1000, 2000 et MetR₅₀, 1000. Par contre, ce taux semble être statistiquement normal chez les animaux de groupes AQP₂₀₀₀, AQP₅₀₀₀ et MetP₅₀₀₀ ce qui indique que les extraits testés de *P. tomentosa* n'influencent pas sur ce paramètre. Par ailleurs, le taux de cholestérol subit une légère diminution chez les groupes AQP₂₀₀₀ et MetP₂₀₀₀ et une augmentation progressive chez les souris de groupes AQR₁₀₀₀, AQR₂₀₀₀ et MetR₂₀₀₀.

En effet, la diminution significative des taux sériques de cholestérol et de triglycérides montre que les extraits testés pourraient contenir des molécule bioactives ont un effet hypolipidémiant (Makni *et al.*, 2008), notamment l'Met de *R. tuberculata*. Selon les travaux de Rasekh *et al.*, (2001), la lipidémie quelles induit un extrait végétal est peut attribuer à sa teneur en quelque polyphénols et des flavonoides, qui empêchent la formation des micelles et des acides biliaires dans le tube digestif ce qui interfère avec l'absorption du cholestérol et dans ce cas le cholestérol est excrété (Sujin *et al.*, 2009).

Les reins sont des principales cibles de la toxicité induite par des substances toxiques et leurs dérivés à cause de ses fonctions de filtration, d'évacuation des urines et de l'élimination des dérivés chimiques qui résultent de différentes voies métaboliques. L'exposition des reins à ces substances peut provoquer une altération dans la structure glomulaire et tubulaire (Gueegen *et al.*, 2012). Cette toxicité est déterminée par l'analyse des facteurs biochimiques rénaux tels l'urée et la créatinine.

Dans la présente étude, aucune différence significative de la créatininémie n'est observée chez les groupes traités par AQR_{50, 500, 1000}, et les groupes recevant les doses limites 2000 et 5000mg/kg de l'EAQ et l'EMet₅₀₀₀ de *P. tomentosa*, au contraire aux groupes traités par l'EMet et EAQ_{2000, 5000} du *R. tuberculata* qui présentent une augmentation significative dans ce paramètre. Cependant, l'urémie est influencée négativement par des doses 50,500, 1000 et 2000mg/kg de l'EAQ de la plantes *R. tuberculata* et on a remarqué une augmentation massive dans ce paramètre chez tous les groupes traités par les différentes doses de l'EAQ et l'EMet de *P. tomentosa* et la dose limite 5000mg/kg de l'EAQ et l'EMet de *R. tuberculata*. Ainsi que il y a une diminution chez les groupes d'EAQ_{50, 500, 1000} de *R. tuberculata*.

D'après ces résultats, nous concluons que, sur les marqueurs rénaux, l'EAQ de *R. tuberculata* est moins toxique que son extrait EMet seulement pour les faibles doses allant au 2000mg/kg. Tandis que, la plante *P. tomentosa* peut influencer sur les marqueurs rénaux, notamment l'urémie, qui sont en relation au dysfonctionnement rénal.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont montré qu'il s'agit d'une diminution significative dans le taux de l'ASAT uniquement chez les groupes AQR₅₀ et AQR₁₀₀₀ alors que l'EAQ et l'EMet soit de *R. tuberculata* ou de *P. tomentosa* n'affectent pas l'activité cette transaminase. En outre, ces extraits, à différentes doses, n'engendrent aucun effet toxique sur l'activité de l'ALAT.

L'ALAT et l'ASAT sont des enzymes indicateurs à la fonction hépatique (Rahma *et al.*, 2001), la présence de ces transaminases dans le sérum sanguin en faible quantité et de taux bien déterminé, dès qu'un organe ou un tissus est lésé, où elles sont libérées dans la circulation générale après l'endommagement tissulaire. En effet, l'activité de ces enzymes est l'un des indices de la lésion hépatocytaire aiguë (Gaw *et al.*, 2004). Une augmentation provoquée par les substances toxiques telle que les tannins dans les activités des amino-transférases peut induire la cytolyse (Marchal et Bengert, 2005).

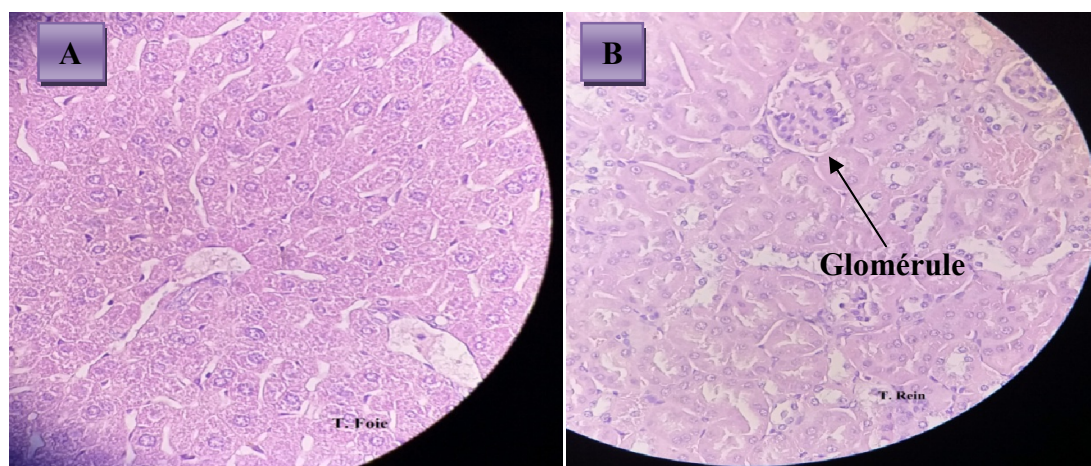
5.4.5. Etude histo-pathologique

Dans notre étude, les observations microscopiques des coupes histologiques hépatiques et rénaux et la lecture des lames préparées ont été faites sous la supervision de Dr. Seghiri T., Médecin spécialiste en anatomie pathologique (l'hôpital de gynécologie obstétrique et de pédiatrie -Biskra). Les résultats obtenus (Tableau 19) ont montré alors l'histopathologie d'EAQ et EMet du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* sur ces tissus.

Tableau 19. Effet histopathologique d'EAQ et EMet du *R. tuberculata* sur le tissu hépatique.

extrait Doses (mg/kg)	EAQ	EMet
Témoin	un parenchyme Normal	un parenchyme Normal
1000	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale (**).	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale discrète (*)
2000	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale (**).	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale. (inflammation subaigüe modéré*).
5000	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire portale. (inflammation subaigüe modéré).	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire portale. (inflammation subaigüe légère).

(**) : Présente dans plusieurs endroits ; (*) : présente dans des endroits limites.

**Figure 7.** Coupe histologique du foie et rein du groupe témoin (x40).**Tableau 20.** Effet histopathologiques d'EAQ et EMet du *R. tuberculata* sur le tissu rénal.

extrait Doses (mg/kg)	EAQ	EMet
Témoin	un parenchyme Normal	un parenchyme Normal
1000	inflammation subaigüe légère	inflammation subaigüe légère
2000	inflammation subaigüe légère	inflammation chronique légère
5000	inflammation chronique légère**	inflammation chronique légère*

(**) : Présente dans plusieurs endroits ; (*) : présente dans des endroits limites.

Le foie des souris témoins qui a reçu que l'eau physiologie (NaCl 0.9%) présente un aspect normal avec un parenchyme d'architecture lobée discrètement mal, Chaque lobe est constitué d'hépatocytes disposé autour d'une veine centrale appelée veine centrolobulaire qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique, entre les lobes on trouve les espaces portes qui sont constitués d'une veine, d'un artère et canal biliaire (A)

Les reins des souris témoins présentent une architecture normale avec parenchyme rénal plein normal, nous observons les glomérules, qui sont entourés d'une capsule et assurent la filtration glomérulaire du sang, passage de l'eau et des composés de faible poids moléculaire dans le tube urinaire (B).

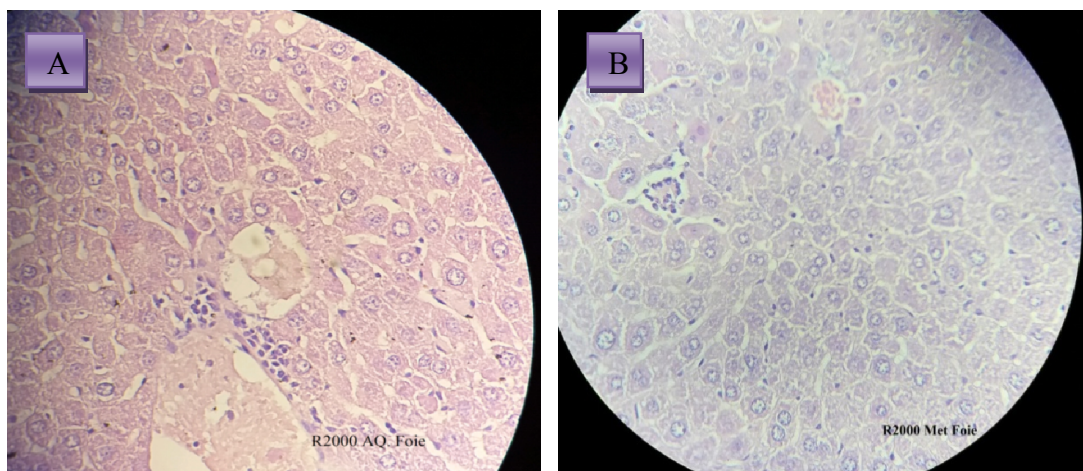


Figure 8. Coupe histologique du foie du groupe AQR₂₀₀₀ (A) et (B) MetR₂₀₀₀ (x40).

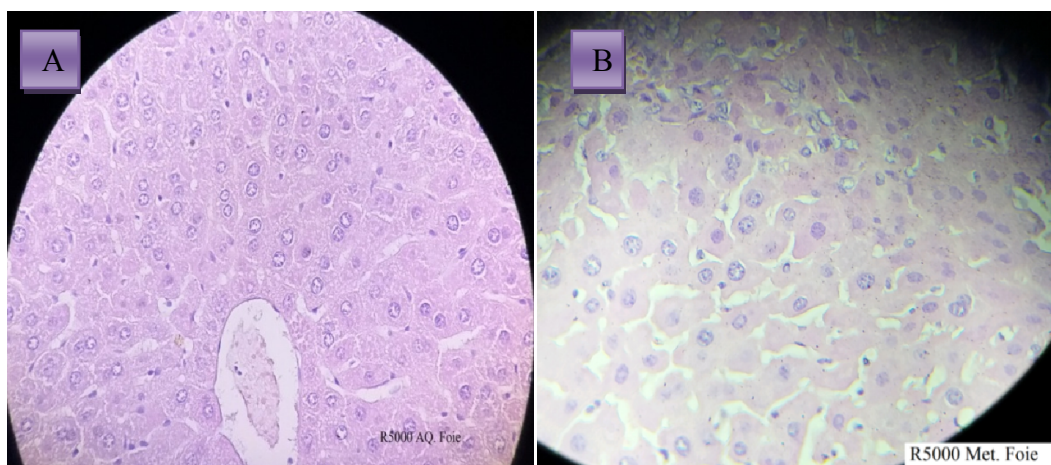


Figure 9. Coupe histologique du foie du groupe AQR₅₀₀₀ (A) et (B) MetR₅₀₀₀ (x40).

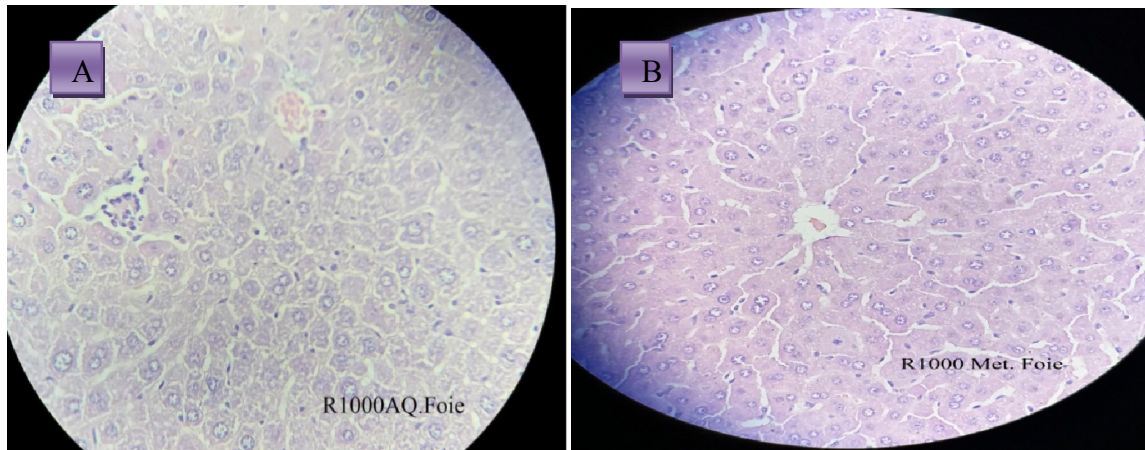


Figure 10. Coupe histologique du foie du groupe AQR₁₀₀₀ (A) et (B) MetR₁₀₀₀ (x40).

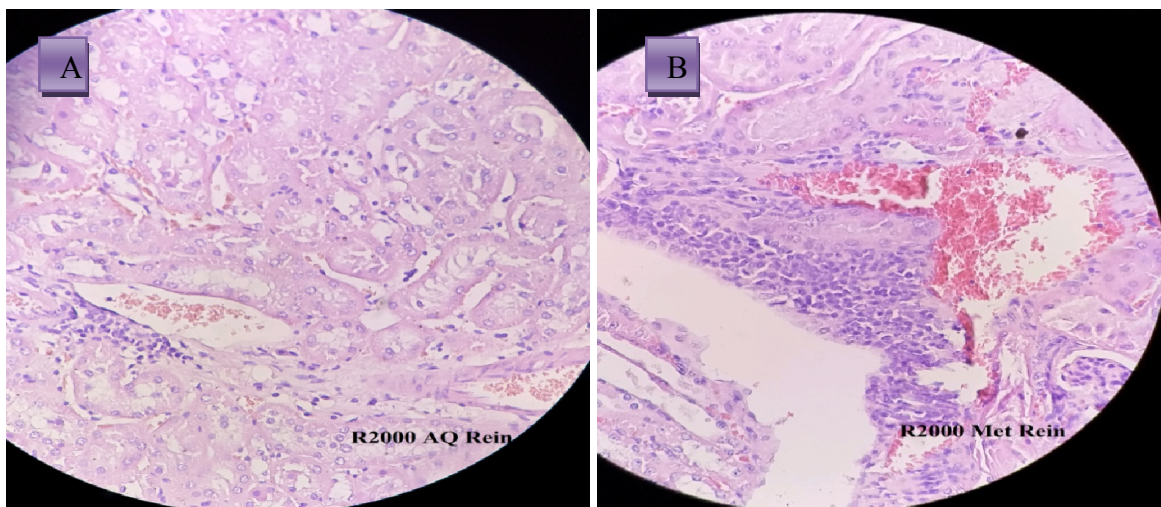


Figure 11. Coupe histologique du rein du groupe AQR₂₀₀₀ (A) et MetR₂₀₀₀ (B) (x40).

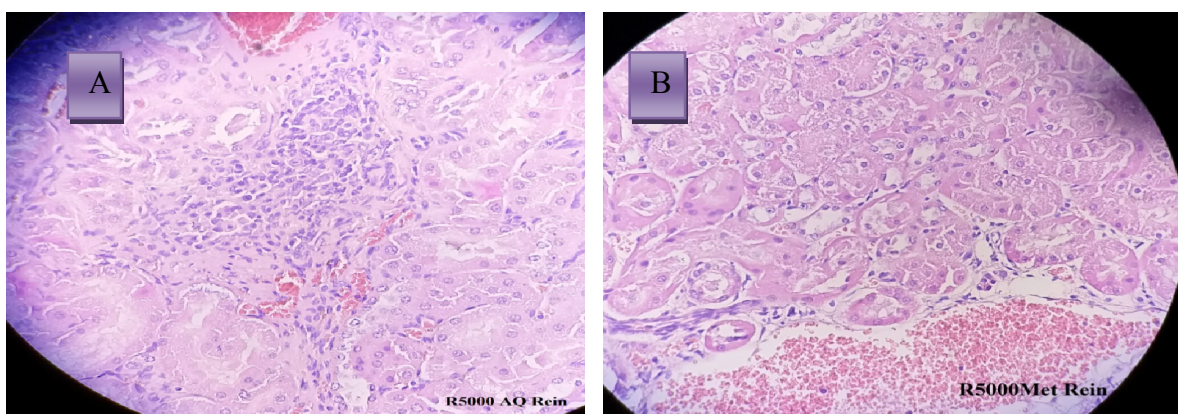


Figure 12. Coupe histologique du rein du groupe EAQ₅₀₀₀ (A) et EMet₅₀₀₀ (B) (x40).

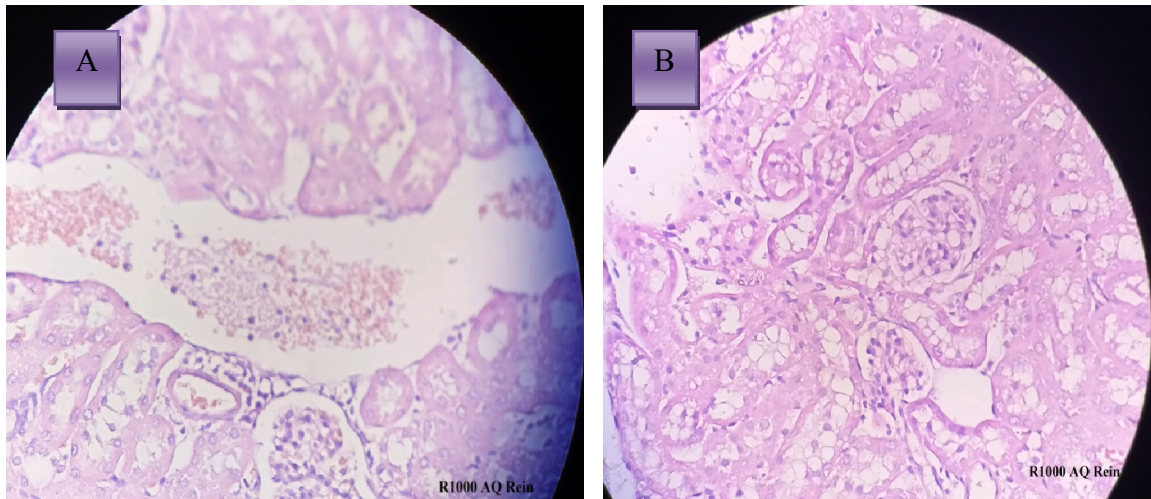


Figure 13. Coupe histologique du rein du groupe AQR₁₀₀₀ (A) et (B) MetR₁₀₀₀ (x40).

Tableau 21. Effet histopathologique d'EAQ et EMet du *P. tomentosa* sur le tissu hépatique.

extrait Doses (mg/kg)	EAQ	EMet
Témoin	parenchyme Normal	parenchyme Normal
2000	inflammation chronique discrète	inflammation chronique légère
5000	inflammation chronique légère	inflammation chronique légère

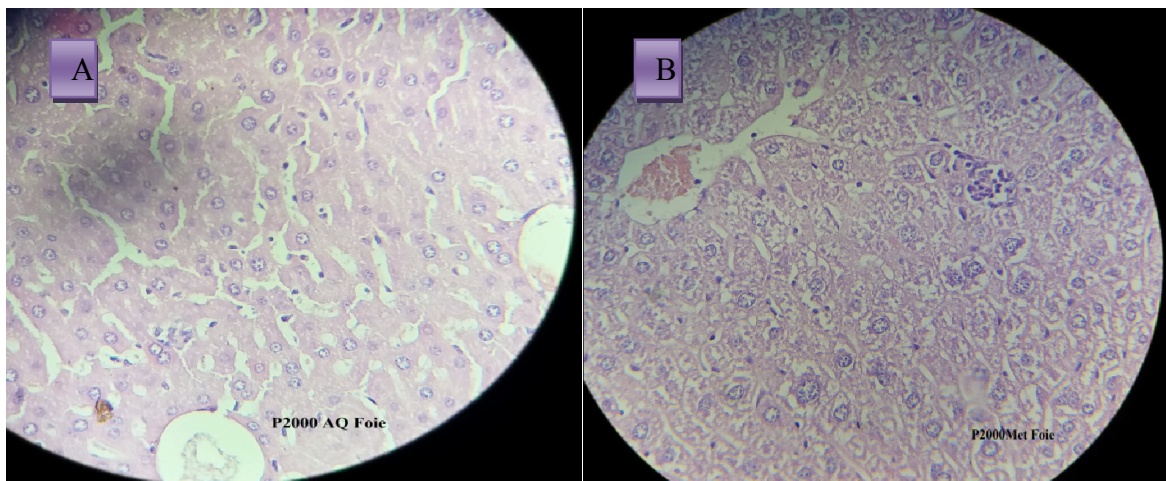


Figure 14. Coupe histologique du foie du groupe AQP₂₀₀₀ (A) et (B) MetP₂₀₀₀ (x40).

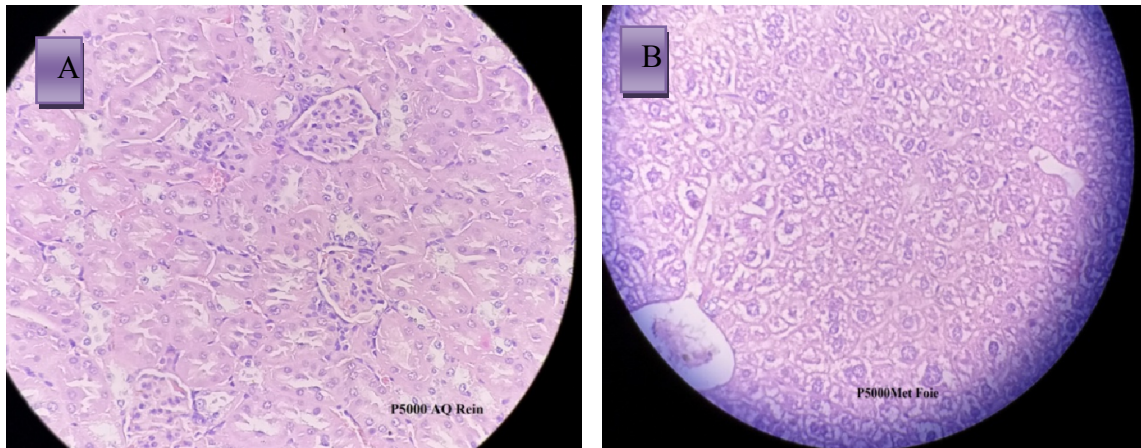


Figure 15. Coupe histologique du foie du groupe (A) AQP₅₀₀₀ et (B) MetP₅₀₀₀ (x40).

Tableau 22. Effet histo-pathologiques d’EAQ et EMet du *P. tomentosa* sur le tissu rénal.

extrait Doses (mg/kg)	EAQ	EMet
Témoin	Normale	Normale
2000	Inflammation chronique légère	Inflammation chronique légère
5000	Inflammation chronique légère	Inflammation chronique discrète

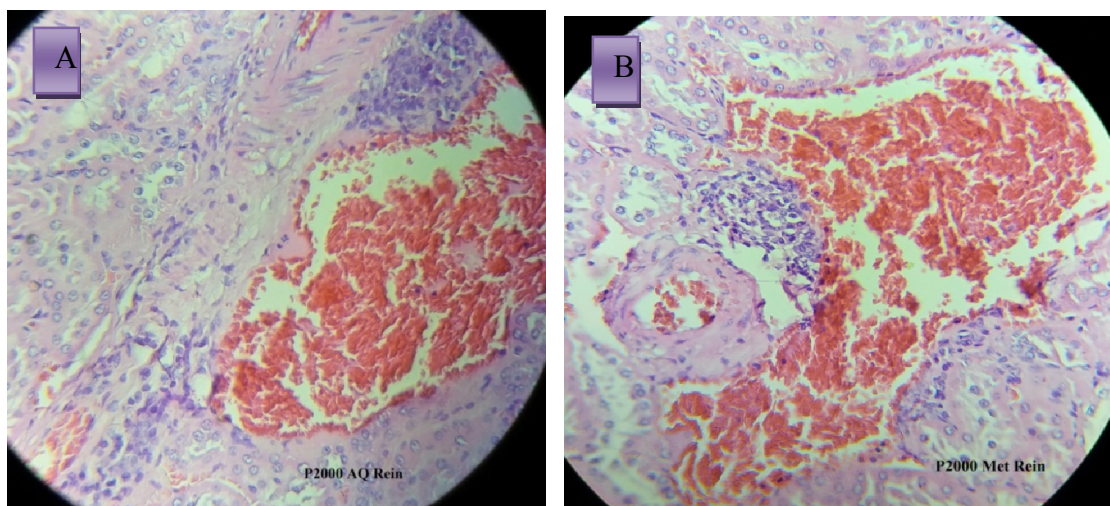


Figure 16. Coupe histologique du rein du groupe (A) AQP₂₀₀₀ et (B) MetP₂₀₀₀ (x40).

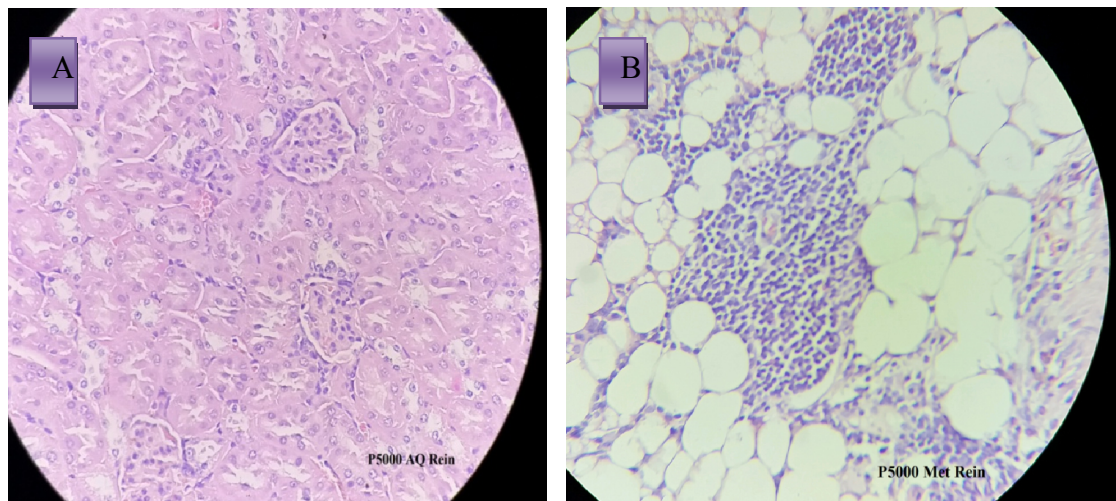


Figure 17. Coupe histologique du rein du groupe (A) AQP₅₀₀₀ et (B) MetP₅₀₀₀ (x40).

D'après la lecture, sous le microscope au grossissement X40, des coupes hépatiques, on peut constater que les coupes hépatiques des souris administrées par l'EAQ du *R. tuberculata* présentent des lésions lobulaires et portales sous forme d'inflammation progressivement intense avec la présence des cellules nécrosées, ces lésions apparus par la présence des polynucléaires éosinophiles et des lymphocytes plasmocytaires ainsi que des cellules binucléés et balonisé qui indique la souffrance des cellules avant leurs nécroses.

L'aspect histologique de tissus rénaux des groupes gavés par l'EAQ et l'EMet de cette plante présente des lésions inflammatoires légères autour les vaisseaux sanguins. Les lésions sont apparus au niveau de des coupes hépatiques et rénales qui sont gavés par l'EMet sont moins légères que celle-ci de l'EAQ.

Par ailleurs, les groupes gavés par l'EAQ du *P. tomentosa* montre que les lésions hépatiques sont présentes sous forme inflammation légère croissante dépend de la dose, l'aspect hépatique chez les souris de groupe EAQP₅₀₀₀ est arboré de déclencher une mitose typique significatif conduisant le renouvellement cellulaire pour la substitution des cellules nécrosées. Cependant, les groupes MetP₂₀₀₀ et MetP₅₀₀₀ présentent similairement des lésions inflammatoires légères associées de la présence d'amas des lymphocytes au niveau des endroits limites avec des cellules nécrosés. Par contre, les coupes histologiques de tissu rénal de souris gavées par l'EAQ et EMet des deux plantes étudiées sont discrètement et légèrement enflammées.

Conclusion

Conclusion

Depuis des siècles, l'Homme avait l'habitude d'utiliser des plantes médicinales comme un remède dans le traitement des maladies, car elles s'avèrent bénéfiques et efficaces. Actuellement, nombreuses recherches phytopharmaceutiques ont montré qu'elles contiennent des substances bioactives possédant des propriétés et des vertus thérapeutiques.

Ruta tuberculata et *Pergularia tomentosa* sont des plantes médicinales fréquemment employées dans la médecine traditionnelle algérienne, elles sont riche en polyphénols et flavonoïdes qui fonctionnent dans le traitement contre les maladies liées aux stress oxydant, à l'inflammation, au diabète et au cancer, ...etc.

En 1^{er} ordre, ce travail avait pour objectif d'extraire des métabolites secondaires présentent dans les plantes de *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa* par l'eau, le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'acétone pour caractériser leur contenu en métabolites à effets biologiques et pour déterminer sa teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

La détermination du rendement d'extraction nous permet de conclure que les meilleurs extracteurs sont l'eau et le système hydroalcoolique avec les rendements les plus élevés sont ceux enregistrés de l'EAQ et l'EMet respectivement, chez les deux plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa* avec des valeurs de l'ordre de 31%, 23% (EAQ) et 9.4%, 6.70% (EMet) respectivement. Ce qui révèle la richesse de ces plantes en métabolites hydrosolubles polaires et de polarité moyenne.

L'étude screening phyto-chimique des différents extrait de deux plantes a montré que l'EAQ et l'EMet riches en polyphénols, flavonoïdes et en tanins, sachant que tous les extraits de la plante *P. tomentosa* apparaitront que les tanins condensés présents en abondance que celle-ci de *R. tuberculata*. Cependant, les alcaloïdes présentent uniquement dans l'EAQ de *P. tomentosa* et l'EMet de *R. tuberculata*. Par contre, les saponosides s'apparaissent exclusivement dans l'EAQ des deux plantes. Cependnat, les EAc et EAcE des deux extraits semblent contenir les stérols, les terpènes et les coumarines. En effet, ce dernier métabolite a été détecté même dans l'EAQ de *P. tomentosa*.

Par ailleurs, la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes a montré que les extraits EAQ et EMet de plantes sont les plus riches en polyphénols qu'en flavonoïdes.

Tandis que, l'extrait EAQE pour les deux plantes *P. tomentosa* et *R. tuberculata* semble avoir la teneur la très importante, en flavonoïdes, que les autres extraits avec des valeurs de 11.1 ± 0.06 et 11.05 ± 0.20 , respectivement.

En 2^{ème} ordre, l'étude de la toxicité aiguë de différentes doses des extraits EAQ et EME des plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa* a été effectuée sur des souris *Swiss albinos* regroupés en 14 lots (n=5) contre un groupe 15^{ème} le témoin, par l'administration orale des différentes doses ou NaCl 0.9% une seule fois selon les lignes directrice de l'OCDE. Les résultats obtenus après 14 jours de suivi ont montré que l'EAQ du *R. tuberculata* a provoqué des signes de la toxicité plus importants que son extrait EME surtout en induisant le sommeil et le convulsion et que les extraits de *P. tomentosa* qui n'induisent qu'un effet moindre et presque négligeable sur le comportement des souris utilisés comme un modèle animal. Cependant, le taux de la mortalité n'atteint qu'à 20% chez les groupes AQR₁₀₀₀, ME_{R1000}, ME_{R5000}, et AQP₂₀₀₀, en absence de la mortalité dans le reste des groupes.

D'après ces résultats et ceux des analyses biochimiques et hématologiques qui sont influencés un peu chez certains groupes, nous sommes arrivés à conclure que les extraits *R. tuberculata* sont légèrement toxique avec une valeur de DL₅₀ peut être située entre 500 et 5000 et que les extraits de la plante *P. tomentosa* sont non toxiques avec une valeur de DL₅₀ peut être supérieure à la dose limite 5000mg/kg.

Enfin, il est suggéré d'autres recherches qui doivent être effectuées pour:

- Identifier les molécules actives pouvant être responsables des effets toxiques causés par les plantes *R. tuberculata* et *P. tomentosa*.
- D'évaluer *in vivo* l'activité antioxydante, antidiabétique et anti-inflammatoire des deux plantes.
- D'étudier *in vivo* l'effet des différents extraits du *R. tuberculata* et *P. tomentosa* sur le système nerveux central.
- D'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des deux plantes.

Bibliographie

Bibliographie

- Akroum, S. 2011. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. p 125.
- Al-Burtamani SK, Fatope MO, Marwah RG, Onifade AK and Al-Saidi SH. 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. J Ethnopharmacol; 96(1-2): 107-112.
- Álvarez Cruz, N.S., 2011. *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A.Juss. [Internet] Fiche de PROTA4U. Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. . Visité le 6 août 2017.
- Al-Yahya MA, Al-Rehaily AJ, Mohammed SA, Mansour S and Farouk S.1992. New alkaloid from *Haplophyllum tuberculatum*. J Nat Prod; 55:899-903.
- Amani et Barmo.2010.contribution a l'état des connaissances de quelques plantes envahissantes au Niger. REPUBLIQUE DU NIGER, CABINET DU PREMIER MINISTRE.
- Awoyinka O.A., Balogun i.O. Ogunnowo A.A. 2007. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). J. Med. Plant. Res. Vol. 1(3) : 063-065.
- Badiaga, M. 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako. p 10.
- Bekheet S.H.M., Abdel-Motaal F.F., Mahalel U.A.2011. Antifungal effects of *Ficus sycamurus* and *pergularia tomentosa* aqueous extracts On some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. Tissue and Cell 43 :398-404.
- Belguet, A. 2010. Etude de l'effet toxique du Cyperméthérin étulisé dans l'agriculture dans la région de Sétif sur les souris. Mémoire de magister. Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Bellebcir, L. 2008. Etude des composés phénoliques en tant Que marqueurs de biodiversité chez les céréales. En vue de l'obtention du Diplôme de Magister. p 119.

- Benaissa, O. 2011. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. p 63.
- Bismuth C., Baud F., Conse F., Frejaville P.P. Et Garnier R. 1987. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Science, Paris. p. 956.
- Boizot N., Charpentier J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier .Le cahier des techniques de l'Inra : 79-82.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesti, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Chaouch A., 2001. Etude des alcaloïdes dans le coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées). Mémoire de magister. Université d'Ouargla. P 44.
- Clarke, E.G.C., Clarke, M.L., 1977. *Veterinary Toxicology*. Ed Cassel and Collier Macmillan, London. p 268–277.
- Cyril, T. 2001. étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus Roseusen*, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. p 28.
- Dih, A., & Belguendouz, A. 2017. Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des alcaloïdes extraits d'*Osyris alba L*, récoltée au niveau de la région de Beni-Snousse. Tlemcen. Mémoire de Master en biologie. Université Abou-Bekr Belkaïd. Tlemcen. p 39.
- Djamila D. 2012. Alcaloïdes et polyphénols d' *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk): effet antimicrobien (Alkaloids and polyphenols of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk): antimicrobial effect). MSc thesis, Boumerdes Univ. [http:// dlibrary. univ-boumerdes.dz:8080/handle/123456789/108](http://dlibrary.univ-boumerdes.dz:8080/handle/123456789/108)
- Dohou K., Yamni S., Tahrouch L. M., Idrissi Hassani A., Badoc N. & Gmira. 2003. Screening phytochimique d'une endemiqu ibero-marocaine thymelaea lythroides. *Bull soc pharm bordeaux*. 142: 61 -78.

- Donald, A. L and Billie, M. Y. 1978. The Toxicity of Plant Alkaloids: an Ecogeographic Perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*.6, 81- 76.
- Eissa TF, González-Burgos E, Carretero ME and Gómez-Serranillos MP.2014. Biological activity of HPLCcharacterized ethanol extract from the aerial parts of *Haplophyllum tuberculatum*. *Pharm Biol*; 52(2):151-156.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587-605.
- George, P. 2011. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 06, 40-44.
- GillesG. 2004. *Notion de Toxicologie*. Québec : Commission de Santé et de Sécurité du Travail du Québec.p 67.
- Gueguen Y, Rouas C, Leblond F.A .2012. Les biomarqueurs d'atteinte rénale, *Néphrologie & Thérapeutique*, 8 :146–155.
- Gülçin İ., Huyutb Z., Elmastasc M.Y. & Aboul-Enein H. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J Chem*. 3(1): 43-53.
- H. Falleh, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba and C. Abdelly.2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol. Vol. 331*. 372-379.
- Hadjadj S, Bayoussef Z, El Hadj-Khelil AO, Beggat H, Bouhafis Z, Boukaka Y, Khaldi IA, Mimouni S, Sayah F and Meriem T. Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in the Northeastern Sahara of Algeria (area of Ouargla). *J Med Plants Res* 2015; 8(41) :1049-1059.
- Hammiche V Et Azzouz M. 2013. Les rues: ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité. *Phytothérapie*. 11:22–300.
- Harborne JB., 1998. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of Plants analysis*. 3^{eme} édition. P 203-214.
- Hassan S., Umar R., Ladan M.J., Myemike P., Wasagu R.S.U., Lawal M., Et Ebbo A.A. 2007. Nutritive Value, Phytochemical and Antifungal Properties of *Pergularia tomentosa* L. (*Asclepiadaceae*).*International Journal of Pharmacology*.3 : 334–340.

- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér*, 1 :p3-6.
- Hifnawy M.S., El-Shanawany M.A., Khalifa M.M., Youssef A.K., Desoukey S.Y. 2014. Cardiotoxic activity of *Pergularia tomentosa* different extracts, fractions and isolated compounds, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Volume 9, Issue 1 : 54-60.
- Ibrahim NS, El. Said AG, Mohamed YA and Ali HA. 2015. *In vitro* inhibition of acetyl cholinestrase by *Haplophyllum tuberculatum* extracts. The Sixth Annual Post-graduate Studies & Scientific Research Conference:152, <http://khartoumspace.uofk.edu/handle/123456789/19525>
- Juan, B., Del Castillo, F.R., Migel, S. 1984. *Phytochemistry*, 23: 2095.
- Kallel, S., Ouadday, M.Z.B. &Ghrabi, Z. 2009. Evaluation of the nematicidalactivity of *Haplophyllumtuberculatum* on *Meloidogynejavanica*. *NematologiaMediterranea* 37(1): 45–52.
- KAR, A. 2007. *Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie*; Ed 2: New Age International Publishers.p 1-30.
- Kemassi A., Darem S., Cherif R., Boual Z., Sadine S. E., Aggoune M. S., OULD EL Hadj-Khelil A. et Ould Elhadj M. D. 2014.Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien), *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 1(1) : 1-5.
- Kew, M.C. 2000. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage.*Lancet*. 355, 591-592.
- Khan AM, Qureshi RA, Ullah F, Gilani SA, Nosheen A, Sahreen S, et al.2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J Med Plants Res.* ; 5 (25) : 6017 – 6023.
- Khenaka, K. 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur laméthanogénèse ruminale chez l'ovin, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. p19, 24.
- Khenaka, K. 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur laméthanogénèse ruminale chez l'ovin, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. p19, 24.

- Khelifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., & Bouajila, J. 2013. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis* L. and *Peganumharmala* L. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 202–208.
- King A., and Young G. 1999. characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*. 99:213-218.
- Krief, S. 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.
- Laib, I. 2011. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, université Mentouri Constantine. p23, 25- 27.
- Lake, B. 1999. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Tox*, 37,423-453.
- Lamarck, J.B.M., Poiret, J.L.M. 1804. Encyclopédie méthodique: Botanique. Vol 6. L'institut national de France, Paris, p : 337.
- Laroche L.H. 2001. Toxicologie générale. P: 25.
- Lauwerys R.R. 2003. Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles, Ed Masson, Paris, p.12
- Lee K. W., Kim Y., Lee H. J et Lee C. Y., 2003. Cocoa Has More Phenolic phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7292-7295.
- Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. 2005. Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* p53, 1990-1995.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. and Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. 2006. Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier. p 1-28

- Maiza K., Brac DE LA Periere R.A., Hammiche V., 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Actes du 2^e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 169-171.
- Malecky, M. (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech.p9, 13-19, 20, 27.
- Marchall.W et Bangert.S.K .2005. Biochimie médicale, physiopathologie et diagnostic. Edition Elsevier, p : 59-99.
- Mauro, N. M. 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- Mebarki, N. 2010. extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application a la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, magister en génie des procédés chimique et pharmaceutiques, université M'Hamed Bougara Boumerdes. p 11.
- Mechehoud Y, Chalard P, Figuéredo G, Marchioni E, Benayache F and Benayache S. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) L. A. Juss. from Algeria. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences; 5: 1416-1419.
- Merghem M.2015. Evaluation Of Toxicity In Mice And Rats And Antioxydant Activities Of *Ruta Montana* L. Extracts : Animal Physiology. Thesis Doctorate Of Sciences Biology, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 44 P.
- Mohr, N., Budzi, K.H., Tawil, B.A.H. 1982. Phytochemistry,7(9).
- Mossa JS, Al-Yahya MA, Al-Meshal IA.1987. Medical plants of Saudi Arabia. 1st edition. Riyadh: King Saud University Libraries.
- Neuwinger H. D. 1994. African ethnobotany poison and drugs :chemistry, pharmacologie, 1^{er} édition, CHAPMAN & HALL, Germany, p. 242.
- Oloyede OI. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. Pak J Nutr. 2005 . 4 : 379 – 381.
- OULD EL HADJ, M.D. et al. 2003. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional est). Courrier du Savoir. 3 : 47-51.

- Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, augmentée. Edition: CNRS, Paris, p. 662.
- Pavic M., Gérôme P. 2013. Hématologie. Collège National des Enseignants de Médecine Interne, p.9-10.
- Poppenga R H.,1962- Risks associated with herbal remedies. Toxicologic Disorders. 222-225.150p.
- Primose, S. 2004. Principes de génie génétique.6^{ème} édition. De boeck.Bruxelles.p :223.
- Priya Alphonso and Aparna Saraf. 2012. Chemical profile studies on the secondary metabolites of medicinally important plant *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb) DC using HPTLC ; 1293.
- Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, p.1170.
- Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique méridionales.Tome 2.CNRS, Paris, p592.
- Raghav, S.K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R. 2006. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 234-239.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K., and Jamil, K. 2001. Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. *Human and Experimental Toxicology*, 20, 243–249.
- Rakotonanahary, M. 2012. thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.
- Ramade F. 1979. Ecotoxicologie. Ed Masson. Paris. P: 5
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M.,Satayavivad, J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol.* p45, 328-336.
- Rasekh, H.R, Khoshnood-Mansourkhani, M.J., Kamalinejad, M. 2001. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia* 72, 937-939.
- XIA E.Q., DENG G.F., GUO Y. J. et LI H.B. 2011-Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(2) : 622-646.

- Ratheesh M., Helen A. 2007. Anti-inflammatory activity of *Rutagraveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. African Journal of Biotechnology. 6(10): 1209-1211.
- Ribéreau-Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
- S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and S. Tomas. 2010. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. J. Food Sci. vol. 28. p. 206- 212.
- Sabry OM, El Sayed AM and Sleem A. 2016. Potential anti-microbial, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Haplophyllum tuberculatum* growing in Libya. J Pharmacogn Nat Prod, 2:1, [http://dx.doi.org/ 10.4172/2472-0992. 1000116](http://dx.doi.org/10.4172/2472-0992.1000116)
- Sabry OMM, El Sayed AM and Alshalmani SK. 2016. GC/MS analysis and potential cytotoxic activity of *Haplophyllum tuberculatum* essential oils against lung and liver cancer cells. Pharmacognosy Journal; 8(1): 66-69.
- Schmelzer G. H et Gurib- fakim A. 2013. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11 (2) Plante Médicinales. 2^{ème} édition, Fondation PROTA, Wageningen, pays- Bas, p. 224-226.
- Serge B. 1985. Biochimie clinique, instrument et technique de laboratoire , diagnostics médico-chirurgicaux .2ème Edition Maloine, p175.
- Shadid M. G., Pulfordb I. D. et Hamed A. I. 2006. Presence of major and Trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert, Egypt. Journal of Arid Environments. 66 : 210–217.
- Singleton V.L. Et Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. 16 : 144-153.
- Slinkard K. And Singleton V.L. 1977. Total phenol analyse : automation and comparison with manual methods. Am. J. Eno. Vitic. 28(1): 49-55.
- Smith, D. S.; & Kramer, J. R. 1999. Environment International. p25, 295-306.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Feyel L., 2001. The potential application of plants essential oils as natural food preservative in soft cheese. Food Microbiology .18 :463- 470.

- Svoboda, K., Svoboda, T. 2000. Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Microscopix Publications. p 7-12.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. 2002. Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* 56: 200-207.
- Thenmozhi C. D., Premalakshmi V. 2011. preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *pergularia daemia forsk.* *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(1) :975-6299.
- Tilkian, S.M., 1979. *Clinical Implications of Laboratory Tests.* The C.V. Mosby Company, Missouri. 11–17.
- Tlili M.L.2015. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Thèse magister, université Kasdi Merbah-Ourgla, page 86.
- Vigneau C. 1985. *Plantes médicinales : Thérapeutique Toxicité n° 129,* Masson France
- Paulini H, Eilert U, Schimmer O. 1987. Mutagenic compounds in an extract *forma rutae herba* caused by furoquinoline alkaloids. *Mutagenesis.* 2 (4):271–3.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J., Agric, J. (1995). *Food Chem.* 43(11) : 2800-2802.
- Wilhelm, N. 1998. *Botanique générale.* 10^{eme} Ed. De boeck. Paris, bruxcelles. p 319.
- Wittstock, U., and Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol,* 5, 300–307.
- Yuldasheva LN, Carvalho EB, Catanhoand MTJA, Krasilnikov OV. 2005. Cholesterol dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. *Braz. J. Med. Biol. Res.,* 38: 1061-1070.
- Zeghouane H.2014. Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est-Algérien. Thèse de magistère, deprtement des sciences biologique, p 53.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Préparation de tampon phosphate PBS

(50mM), préparé en mélangeant la solution acide de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM) avec la solution basique de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 7.4. Le mélange obtenu est ensuite supplémenté par du NaCl (150mM).

❖ Phosphate sodique monobasique $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: PM =119.98g/mol

119.98g \longrightarrow 1mol

X \longrightarrow 50×10^{-3} mol. Donc $X \frac{119.98 \times 0.05}{1} = 6\text{g}$.

6g \longrightarrow 1000ml donc 3g dissoute dans 500ml eau distillée (préparation sous agitation)

❖ Phosphate sodique bibasique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: PM =141.96g/mol

141.96g \longrightarrow 1mol

X \longrightarrow 50×10^{-3} mol. Donc $X \frac{141.96 \times 0.051}{1} = 7,1\text{g}$.

7,1g \longrightarrow 1000ml donc 3,55g dissoute dans 500ml eau distillée (préparation sous agitation)

On fait mélanger les deux solutions après la préparation de chaque à part d'une façon à obtenir une solution à pH très proche à 7,4. Puis on fait ajuster le pH à 7,4 par l'ajoutement de NaOH ou HCl.

Ensuite la solution qui son pH est plus proche de 7,4 est supplémentée de NaCl 150mM.

PM de NaCl est égal 58,44g/mol. Donc 9,7g dissoute dans 1L de tampon

Si le tampon que vous avez préparé préalablement est de volume 1L on ajoute directement sue lequel le poids pesé de NaCl et on fait agité le tous.

Annexe 2. Préparation de l'anticoagulant EDTA

- Sel dipotassique d'EDTA 20g
 - Eau distillée fraîchement bouillie 200ml
1. On a besoin 20ml donc on pèse 2g

2. Transvaser à la pipette 100µl de cette solution dans de petits récipients (ou tubes) destinés à recueillir 5ml de sang. C-à-dire 20ul d'EDTA dans chaque eppendorf (on a besoin de 80 eppendorf pour les paramètres hématologiques)
3. On peut même aspirer une petite quantité de cette solution dans des pipettes Pasteur puis la rejeter et laisser sécher les parois internes. Laisser sécher l'anticoagulant en plaçant ces récipients pendant une dans une étuve.
4. Bien secs puis bouchés hermétiquement, les tubes ou les pipettes se conservent plusieurs années.

Annexe 3. Quelques signes cliniques de la toxicité induits par les extrait du *R.tuberculata* à différents doses.



Rougeur de la peau



Perte des poiles

ملخص

أولاً، يعتمد عملنا على المعايرة الكيميائية النباتية للمستخلصات المختلفة EAQ و EMet و EAc و EAcE (الاستخلاص بواسطة الغلي و النقع) للجزء العموي لكل من *P. tomentosa* و *R.tuberculata* للكشف عن وجود المستقبلات الثانوية، وكذلك اختبارات الفحص لتقدير تركيز البوليفينول الكلي ، الفلافونويد الموجود في هذه المستخلصات.

في المرحلة الثانية ، تم تقييم دراسة السمية الحادة للمستخلصين EAQ و EMet من *R.tuberculata* و *P.tomentosa* عن طريق الوفيات ومراقبة المظاهر السريرية في الفئران المعالجة بجرعات مختلفة. من خلال استخدام أنبوب معدي (طريق الفم) ، تابعنا السمية الحادة من فحص المعايير البيوكيميائية والدم والمراقبة المجهرية للمقاطع النسيجية لأنسجة الكبد والكلى.

الكلمات المفتاحية: *R.tuberculata* ، *P.tomentosa* ، السمية الحادة.

Résumé

Dans le premier temps, notre travail est basé sur le calibrage phytochimique des différents extraits l'EAQ, l'EMet, l'EAc, l'EAcE (extraction par la décoction et macération) de la partie aérienne du *R.tuberculata* et *P.tomentosa* pour détecter la présence des métabolites secondaires ainsi que, des tests de dosage pour estimer la concentration de polyphénols totaux, de flavonoïde présents dans ces extraits.

Au deuxième temps, l'étude de la toxicité aigüe de l'EAQ et l'EMet du *R.tuberculata* et *P.tomentosa* a été évaluée par la mortalité et l'observation des manifestations cliniques chez les souris traités par ces extraits à différents doses gavés à l'aide d'une sonde gastrique (voie orale), nous avons suivi la toxicité aigüe à partir le dosage des paramètres biochimique et hématologiques et l'observation microscopique des coupes histologiques des tissus hépatiques et rénales .

Mots clés : *R.tuberculata* , *P.tomentosa*, toxicité aigüe.

Absrtract

First, our work is based on the phytochemical calibration of the different extracts EAQ, EMet, EAc, EAcE (extraction by decoction and maceration) of the aerial part of *R.tuberculata* and *P. tomentosa* to detect the presence of secondary metabolites as well as, assay tests to estimate the concentration of total polyphenols, flavonoid present in these extracts.

In the second phase, the acute toxicity study of the EAQ and the EMet of *R.tuberculata* and *P.tomentosa* was evaluated by mortality and observation of the clinical manifestations in the mice treated with these extracts at different doses. gaved using a gastric tube (oral route), we followed the acute toxicity from the assay of biochemical and haematological parameters and the microscopic observation of histological sections of the liver and kidney tissues.

Key words: *R.tuberculata*, *P.tomentosa*, acute toxicity.