



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

Référence / 2018.....

MÉMOIRE DE MASTER

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

Présenté et soutenu par :
BOUSSAM RIAD

Le : mercredi 27 juin 2018

*Contribution à l'étude de l'effet antioxydant et la
toxicité aigüe de différents extraits de Pergularia
tomentosa L*

Jury :

Mme. SAIDI Asma	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Rapporteur
Mme. MEDDOUR Asma	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Président
Dr. RODOUAN SALAH Sara	MCA	Université Mohamed Khider de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 – 2018

Remerciements

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah
le tout puissant, merci de m'avoir
accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de mon
rêve et le bonheur
d'achever ce travail.*

La présentation de ce modeste travail m'offre l'occasion

D'exprimer nous profonde gratitude et nos vifs

Remerciements à notre encadreur Mdm . SAIDI ASMA

*Avoir bien voulu diriger ce travail , pour ces précieux
conseils.*

*Je vous remercié Mr. Deghima et aux vos collègues youcef,
hanane, samiha et hayat*

Mes grands remerciements vont également au chef de

Département Dr. ABDELHALIM MOUSSI pour tout

L'appui qu'il a donné

Je tiens à remercier beaucoup les jury de cette mémoire.

*Je remercier tout les personnel et les étudiants du
département de la science nature de la vie*

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs

Mohamed, Abdelnneser, Fouad, chaouki, Samra, Samiha, Fayza et Hana

A mon fiancé Sabiha et sa famille

A mes chères ami(e)s

Rabeh, Farhat, Youcef et rabie

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

Table des matières

Remarciment	
Dédicace	
Table des Matières	
Liste des tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviation	
Introduction générale.....	1
Etude Bibliographie	
Chapitre 1 Toxicité et stress oxydative	
Toxicité.....	3
1.Types de toxicité.....	3
1.1.Toxicité aiguë.....	3
1.2.Toxicité subaiguë	3
1.3.Toxicité chronique ou à long terme	3
2.Voies de pénétration et Manifestations de la toxicité.....	4
3.évaluation la Toxicité des plantes médicinales.....	5
Stress oxydant	6
1.Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur production	6
2.Conséquence des ERO sur les macromolécules cellulaires.....	7
3.Antioxydants.....	7
Chapitre 2 Plante <i>Pergularia tomentosa</i>	
Plante <i>Pergularia tomentosa</i> L.	9
1.Description et classification botanique.....	9
2. Composition chimique.....	10
3. Usage traditionnel et activités biologiques	10
Partie expérimentale	
Matériel et Méthode	

Matériel	12
1. Matériel végétal	12
2. Matériel biologique.....	12
3. Réactifs chimiques.....	12
Méthode.....	13
1. Préparation de différents extraits de la plante <i>P. tomentosa</i>	13
1.1. Extraction aqueuse	13
1.2. Extraction méthanolique	13
2. Screening phytochimiques des extraits de <i>P. tomentosa</i>	13
2.1. Caractérisation des alcaloïdes	13
2.2. Caractérisation des coumarines.....	14
2.3. Caractérisation des quinones libres.....	14
2.4. Caractérisation des anthraquinones.....	14
2.5. Caractérisation des saponosides (Frothing test).....	14
2.6. Caractérisation des stérols et polyterpènes (Lieberman-Burchard's test).....	14
2.7. Mucilages	14
2.8. Caractérisation des polyphénols	15
2.9. Caractérisation des Flavonoïdes (Test de Shibata ou Shinoda test)	15
2.10. Caractérisation des Tanins (test au FeCl ₃).....	15
3. Analyse quantitative des extraits de <i>P. tomentosa</i>	15
3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	15
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	16
3.3. Dosage des Tanins	16
4. Evaluation de l'activité antioxydante de <i>P. tomentosa</i>	17
4.1. Test de piégeage vis-à-vis le radical DPPH.....	17
4.2. Test du pouvoir réducteur	17
5. Etude de la toxicité aiguë des extraits de <i>P. tomentosa</i>	18
5.1. Préparation des lots	18
5.2. Préparation des doses	18
5.3. Mode du traitement	18
5.4. Observation des signes de la toxicité	19
5.5. Prélèvement et préparation des échantillons.....	20
6. Analyses statistiques.....	21

Résulta et Discussion

1.Extraction.....	22
2. Analyses phyto-chimiques des extraits de la plante <i>P.tomantosa</i>	22
2.1. Screening qualitatif des métabolites secondaires	22
3.Quantification des polyphénols totaux, des Flavonoïdes et des tanins.....	23
4. Evaluation de l'activité antioxydante	25
4.1. Activité anti-radicalaire (test du DPPH)	25
4.2.Pouvoir réducteur.....	28
5. Etude de la toxicité aiguë des extraits EAQ et EMet de <i>P. tomentosa</i>	31
5.1. Observation des manifestations de la toxicité aiguë	31
5.2. Suivi de la mortalité	32
5.3.Variation pondérale.....	32
5.4. Analyse des paramètres biochimiques	33
5.5. Etude d'histopathologie	35
Conclusion.....	39
Référence Bibliographie.....	40
Annexes.....	48

Liste des Tableaux

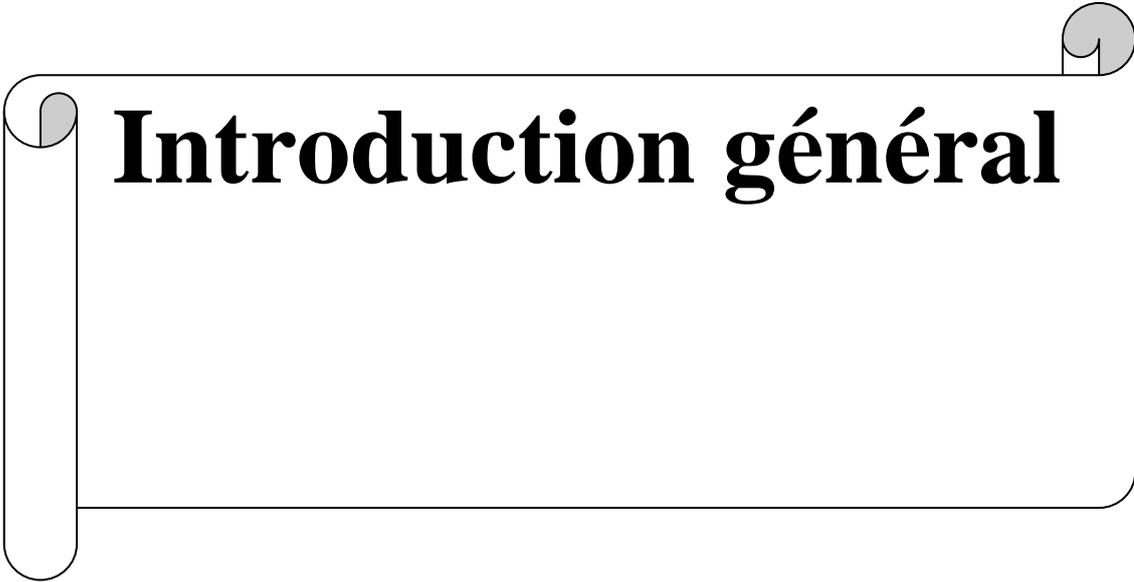
Tableau 1:Principaux systèmes endogènes producteurs de ERO.....	6
Tableau 2.Récapitulation des systèmes antioxydant enzymatique.....	8
Tableau 3.Récapitulation des systèmes antioxydants endogènes non enzymatique.....	8
Tableau 4.Usage traditionnels du <i>Pergularia tomentosa</i>	11
Tableau 5.Observation les signée pour chaque animal de chaque groupe	19
Tableau 6.Résulta de screening phytochimie des extrait EAQet EMet du P.tomentosa..	22
Tableau 7.Teneurs des extraits EAQ et EMet du Principe métabolite secondair.les valeur représentent la moyen de 3 \pm SD	23
Tableau 8.IC50 d'activit" Anti-radicalair vis-à-vis le DPPH des extraits EAQ et EMet Les valeurs représentent m \pm SD (n=3).	27
Tableau 9.Pouvoir réducteur des extraits EAQ et EMet du P.tomentosa équivalent d'acide gallique et quercitine..Les valeurs représentent m \pm SD (n=3).....	30
Tableau 10.Pourcentage de mortalité dans le différents lots.	32
Tableau 11.Variation de masse corporelle des extraits duP . <i>tomantosa</i> .les valeur représenté m \pm SD	33
Tableau 12. Paramètres séro-biochimique obtenus de differents lot expérimentaux .les valeur representent m \pm SD. ns: différence non significative.....	33

Liste des Figures

Figure 1. Photographie de la plante <i>Pergularia tomentosa</i>	9
Figure 2. Forme libre et réduit du DPPH (Molyeux, 2004)	17
Figure 3. Droite d'étalonnage de l'acide gallique ($m \pm SD$) en triplicate.....	24
Figure 4. Droite d'étalonnage de quercétine ($m \pm SD$) en triplicate.....	24
Figure 5. Droite d'étalonnage de catéchine ($m \pm SD$) en triplicate.....	25
Figure 6. Activité anti-radicalaire d'extraits EAQ et EMet du <i>P. tomentosa</i> vis-à-vis le DPPH. Les valeurs représentent $m \pm SD$ ($n=3$).....	26
Figure 7. Activité anti-radicalaire d'acide gallique et quercétine vis-à-vis le DPPH. Les valeurs représentent $m \pm SD$ ($n=3$).....	26
Figure 8. Pouvoir réducteur engendré par l'acide gallique. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions $\pm SD$ ($n=3$).....	28
Figure 9. Pouvoir réducteur engendré par la quercétine. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions $\pm SD$ ($n=3$).....	29
Figure 10. Pouvoir réducteur de l'extrait EMet. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions $\pm SD$ ($n=3$).....	29
Figure 11. Pouvoir réducteur de l'extrait EAQ. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions $\pm SD$ ($n=3$).....	30
Figure 12. Coupes histologiques à partir du groupe témoin (x40) du Foie (A) et du rein (B). Les coupes représentent une structure cellulaire normale et parenchyme normal.	35
Figure 13. Coupes histologiques hépatiques (x40) des groupes EAQ ₂₀₀₀ EMet ₂₀₀₀ . (A) du groupe EAQ ₂₀₀₀ et (B) du groupe EMet ₂₀₀₀ . Présence d'une lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale.	36
Figure 14. Coupes histologiques rénaux (x40). (A) des groupes EAQ ₂₀₀₀ EMet ₂₀₀₀ . (A) du groupe EAQ ₂₀₀₀ et (B) du groupe EMet ₂₀₀₀	36
Figure 15. Coupes histologiques hépatiques (x40) des groupes EAQ ₁₀₀₀ et EMet ₁₀₀₀ . (A) du groupe EAQ ₁₀₀₀ . (B) du groupe EMet ₁₀₀₀	37
Figure 16. Coupes histologiques rénaux (x40) des groupes EAQ ₁₀₀₀ et EMet ₁₀₀₀ . (A) du groupe EAQ ₁₀₀₀ . (B) du groupe EMet ₁₀₀₀	37

Liste des abréviations

AG	Acide Gallique
AST	Aspartate-Amino Transférase
CT	Catéchine
DL₅₀	Dose Létale 50%
EAQ	Extrait Aqueux
EMet	Extrait Méthanolique
ERO	Espèces Réactive de l'Oxygène
IC₅₀	Concentration d'Inhibition 50%
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
Q	Quercetine
w:v	Masse : volume



Introduction général

Introduction générale

Les plantes médicinales ont des contributions importantes dans le système de santé. L'utilisation de plantes médicinales représente une longue histoire d'interactions humaines avec l'environnement. En effet, elles sont incorporées dans la médecine traditionnelle où elles contiennent un large éventail de métabolites secondaires bioactifs qui présentent des propriétés thérapeutiques lors du traitement de nombreuses maladies et affectations chroniques ainsi que les maladies infectieuses. Un certain nombre de médicaments modernes actuellement utilisés ont été développés à partir des principes actifs à base des plantes médicinales traditionnellement utilisées depuis des siècles.

Malgré les avantages thérapeutiques profonds de certaines plantes médicinales, certains constituants des plantes médicinales 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 est de la plus grande importance.

Dans les systèmes vivants, l'oxydation est une partie fondamentale du processus métabolique normal, dans lequel des espèces réactives de l'oxygène tels les peroxydes d'hydrogène et l'acide hypochloreux et de nombreux radicaux libres notamment le radical hydroxyle et l'anion superoxyde sont générés. La production rapide de radicaux libres peut altérer la structure et la fonction des constituants cellulaires et des membranes et peut entraîner également des troubles neurologiques et d'autres affectations telles que le cancer, le diabète, les maladies inflammatoires, l'asthme, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et le vieillissement prématuré.

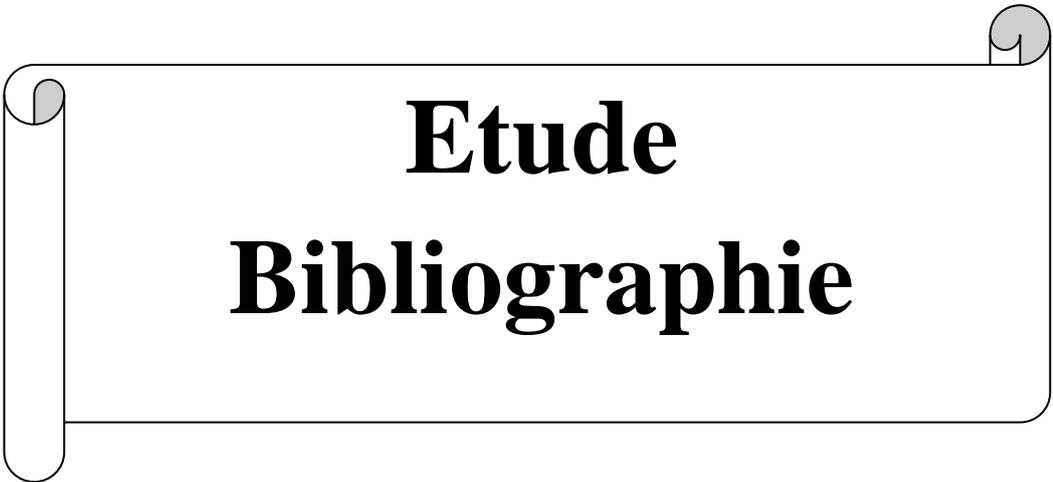
Les composés phénoliques des plantes médicinales présentent une forte activité antioxydant et peuvent aider à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres. Ils sont bien connus comme des piègeurs de radicaux, chélateurs de métaux, agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactiveurs d'oxygène singulet.

La plante *Pergularia tomentosa* L. appartient à la famille des Asclepiadacées. Bien qu'elle soit toxique ou non, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle contre les dermatoses et les angines, les spasmes et les diarrhées ainsi que le diabète.

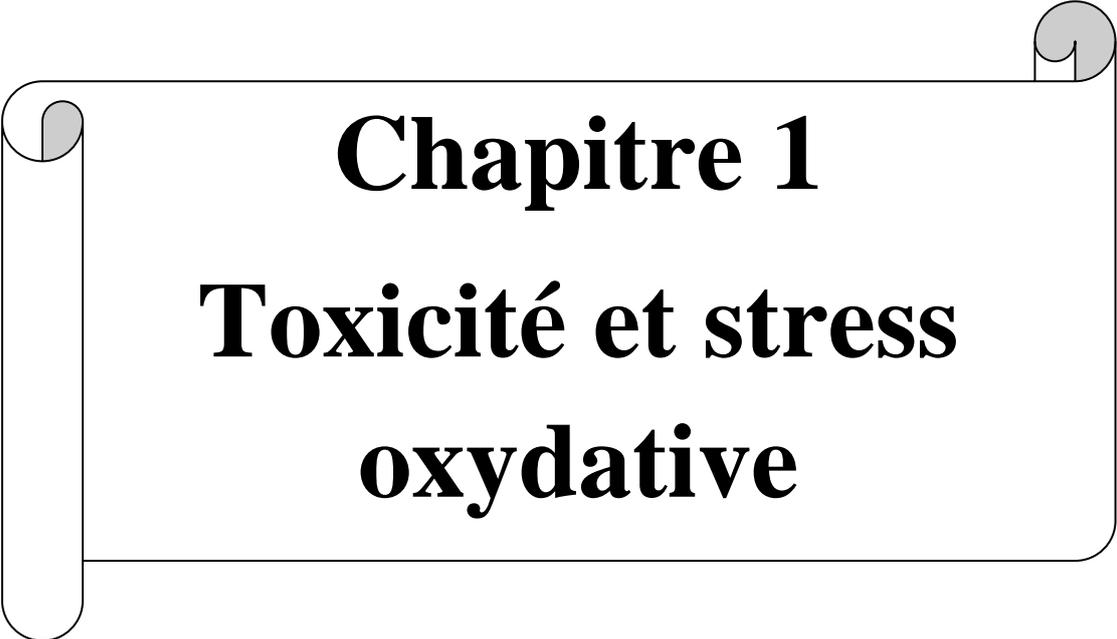
Le présent travail s'articule autour de l'étude de cette plante, dont nos objectifs sont d'effectuer une analyse phytochimique ainsi que d'évaluer activités antioxydants et la toxicité aiguë de différents extraits préparés à partir de sa partie aérienne. Cette étude a été divisée alors en deux parties ; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier concerne la toxicité aiguë. Le deuxième chapitre est consacré au stress oxydant et l'activité antioxydant. Nous donnerons dans le troisième chapitre la plante à étudier. Cependant, la deuxième partie décrit le matériel utilisée les méthodes appliquées dans ce travail qui porte sur :

- Préparation de différents extraits de la plante *P. tomentosa*
- Screening phytochimique des extraits de *P. tomentosa*
- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins,
- Evaluation de l'activité antioxydante de *P. tomentosa*
- Etude de la toxicité aiguë des extraits de *P. tomentosa*

Dans le dernier chapitre, nous représenterons les résultats obtenus et nous avons les discuter.



Etude
Bibliographie



Chapitre 1

Toxicité et stress oxydative

Toxicité

La toxicité a été définie comme un aspect de la pharmacologie qui traite des effets néfastes des substances bioactives sur les organismes vivants (Anisuzzaman *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2006). En effet, l'étude de la toxicité d'une substance naturelle ou synthétique, à utiliser en pharmacothérapie, est très importante pour établir la sécurité et l'efficacité de tout nouveau médicament (Anisuzzaman *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2006). Cependant, les substances toxiques possèdent différentes natures selon leur source, elles peuvent être chimiques comme les métaux de mercure et du plomb (Dwivedi et Dey, 2002), naturelles résultant d'un métabolisme secondaire de l'organisme telles les alcaloïdes, les coumarines, les saponines et les huiles ou d'un aspect physique comme les rayonnements UV (Dwivedi et Dey, 2002).

Donc quels sont les types de la toxicité, les voies de pénétration d'une substance toxique, les manifestations cliniques et les affectations tissulaires liées à la toxicité ?

1. Types de toxicité

Selon les paramètres de la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe trois types de toxicités, qui peuvent toucher l'Homme, sont la toxicité aiguë, la subaiguë et la chronique (Bismuth *et al.*, 1987 ; Alain, 2002).

1.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë peut être engendrée immédiatement après plusieurs doses administrées, dans les 24 h, ou après l'administration d'une dose unique assez importante de la substance testée. Elle provoque la mort chez le modèle expérimental ou attribue aux effets indésirables liés à des troubles physiologiques très graves (Ramade, 1979). En effet, la dose de la substance qui aboutit à la mort 100% de la population des animaux d'essais, s'appelle la **dose létale DL₁₀₀**. Cependant, la **dose létale DL₅₀** est celle qui provoque la mort de 50% de cette population donnée, dans des conditions expérimentales définies (Laigneau, 2000).

On peut déterminer la DL₅₀ par deux méthodes de calcul, la Méthode de Dragstedt et Lang, (1957) et la méthode de Karber et Behrens, (1935). Ainsi qu'on peut la déterminer graphiquement par les deux méthodes graphiques proposées de Miller et Tainter, (1944) et celle de Litchfield et Wilcoxon, (1949).

1.2. Toxicité subaiguë

Dans les études de toxicité subaiguë, les doses répétées de médicament sont données en quantité sub-létale pendant une période de 14 à 21 jours. Les études de toxicité subaiguë sont

utilisées pour déterminer l'effet du médicament sur les paramètres biochimiques et hématologiques du sang ainsi que pour déterminer les changements histopathologiques (Baki et al, 2007; Dahamna, 1987; Dahamna et al., 2004; Belguet, 2010).

1.3. Toxicité chronique ou à long terme

La toxicité chronique résulte de l'exposition répétée à un produit naturel ou synthétique qui est administré à différentes doses pendant une période de 90 jours, en plus, pour déterminer son potentiel cancérigène et mutagène (Baki *et al*, 2007).

2. Voies de pénétration et Manifestations de la toxicité

Durant l'étude toxicologique, l'administration d'une substance à tester, par voie orale, constitue pratiquement la forme d'administration la plus fréquente, impliquant lors de son absorption, le tractus gastro-intestinal qui peut être considéré comme un tube traversant le long du corps (Loomis et Hayes, 1996). Cependant, l'injection intra-péritonéale C'est l'une des méthodes de pénétration, qui peut parfois fournir des informations sur la toxicité locale et systémique. Pour donner des médicaments par injection intra-péritonéale, l'animal est étendu sur le dos et l'abdomen est rasé. Cette zone est soigneusement nettoyée et, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille appropriées, la paroi abdominale est perforée. (Poole et Leslie, 1989; Waynforth, 1980).

De plus, l'organisme de l'Homme ou du modèle expérimental peut s'exposer à une molécule, à effet toxique, qui suit d'autres voies d'administration telles les voies cutanée et pulmonaire ou inhalation (OCDE, 2001).

La substance toxique capable influence sur le comportement d'animal tel que : 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).

En effet, l'effet toxique d'un poison ou de ses dérivés sur l'organisme dépend de sa quantité ou celle des substances réactionnelles, formées à partir de lui au cours de sa distribution (Lauwerys, 2003). Certaines substances peuvent se stocker dans certains tissus principalement le tissu hépatique ou ciblent différents organes notamment le foie, les reins, le tractus gastrique, pulmonaire et le système nerveux où se fixent aux divers sites d'action tels que les enzymes, les récepteurs membranaires et cytoplasmiques ou l'ADN (Lauwerys, 2003).

Toute fois la toxicité agit sur la croissance normale des rats mâles et femelles et perturbe quelques paramètres hématologiques et biochimiques liés à la fonction hépatique, rénale et musculaire. L'observation histologique s'est caractérisée par des altérations

structurales notamment au niveau des organes de stockage, de biotransformation et d'excrétion tel le foie et les reins (BOUSSAHEL,2011).

3.évaluation la Toxicité des plantes médicinales

Depuis des siècles, les plantes médicinales présentaient un large spectre de vertus thérapeutiques où elles ont été utilisées dans tout le monde pour traiter les différentes maladies et contre nombreuses affectations que présentent les patients. Bien qu'il s'agit des effets secondaires, elles ne sont pas considérées totalement toxiques (O'Hara *et al.*,1998). Par contre, certaines d'entre-elles sont connues par leur toxicité où elles causent des troubles graves ou provoquent la mort (O'Hara *et al.*, 1998).

La plante contient des différents métabolites secondaires toxiques dans ses différentes parties: les feuilles, les tiges, les grains, les fruits et la racine. Par exemple, les alcaloïdes comme des métabolites secondaires à base de plantes, agissent sur le système nerveux central, les glucosides peuvent agir sur les fonctions rénales, les saponines peuvent influencer sur les poumons en inhibant la respiration, les coumarines et tanins sont des agents anti-vitamines. (Chandra sekhor *et al.*, 2012 ;Batho *et Penrith*, 2008).

Stress oxydant

Le stress oxydatif a été défini comme une perturbation dans l'équilibre antioxydants / oxydants, en faveur des oxydants qui sont des espèces réactives de l'oxygène ERO (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007 ; Kirschvink *et al.*, 2008; AbdalDayemet *et al.*, 2010; Mühlet *et al.*, 2011). Ce déséquilibre se produit en augmentation de la production d'oxydants radicalaires et non radicalaires ou en diminution du niveau d'antioxydants, ou les deux à la fois (Kirschvink *et al.*, 2008; Mühlet *et al.*, 2011). Un manque d'antioxydants, qui peut éteindre les radicaux libres réactifs, facilite le développement de maladies dégénératives (Shahidi *et al.*, 1992), y compris les maladies cardiovasculaires, les cancers (Gerber *et al.*, 2002), les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinsons (Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Pizarro *et al.*, 2009; Durackova, 2010), les maladies inflammatoires et la polyarthrite rhumatoïde, le diabète et les dommages hépatique, les cataractes, les ulcères, la pneumonie et le vieillissement humain (Makker *et al.*, 2009).

1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur production

Les dérivés oxygénés (ERO) sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables, aussi bien, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants.

Les ERO se génèrent par nos organismes (Tableau 1) en différentes formes telles que les radicaux d'anion super-oxydes ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}), les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), le radical oxyde nitrique (NO^{\bullet}), les alcoylés lipidiques (LOO^{\bullet}) et les peroxydes lipidique LOOH (Kalam *et al.*, 2012)

Tableau 1: Principaux systèmes endogènes producteurs de ERO.

système producteur	Réaction	Références
NADPH oxydase	$NADPH + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + H^+ + O_2^{\bullet-}$	Bartoz, 2003
oxydation de l'oxyde nitrique	$2NO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow 2NO_2^{\bullet}$	Bartoz, 2003
Super-oxyde dismutase (SOD)	$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{+SOD} H_2O_2$	Ahsan <i>et al.</i> , 2003).
Réaction fenton	$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{+3}$	(Schneider et Oliveira, 2004).
Réaction haber-weiss	$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{Fe/Cu} OH^{\bullet} + OH^- + O_2$	(Schneider et Oliveira, 2004).
myeloperoxydase (MPO)	$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} HOCl + OH^-$	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)

2. Conséquence des ERO sur les macromolécules cellulaires

L'accumulation des ERO peut causer des dommages tissulaires et des altérations cellulaires dont les macromolécules, comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, constituent leurs cibles (Rice-Evans *et al.*, 1996).

La peroxydation lipidique, par exemple, est le résultat d'une chaîne réactionnelle qui dans laquelle l' $O_2^{\bullet-}$ se réagit avec des acides gras, en produisant en premier ordre un radical lipidique (Radak *et al.*, 2011). Ce dernier génère, en présence de l'oxygène, le radical peroxyde lipidique, qui peut encore réagir avec des acides gras pour produire de l'hydroper-oxyde de lipides (Radak *et al.*, 2011). Elle aboutit alors à des altérations structurales de la bicouche lipidique membranaire, ce qui entraîne la fluidité, en conséquence, la perméabilité membranaire peut s'augmenter (Radak *et al.*, 2011).

. En outre, les ERO pourraient induire nombreuses modifications y compris la perte de groupes sulfhydrile (SH), la formation de carbonyles et la glyco-oxydation, sur les protéines, en particulier les enzymes, les systèmes du transport et de transduction du signal, ce qui peut dénaturer leurs sites actifs (Stadtman, 1990).

Certaines mutations du génome peuvent être due à l'oxydation de l'ADN par les radicaux libres qui s'interagissent avec lui, en causant diverses sortes d'endommages tels que la modification des bases d'ADN, les ruptures d'ADN à simple ou double brin, la perte de purines, les dommages au sucre de désoxyribose et les dommages au système de réparation de l'ADN (Kunwar et Priyadarsini, 2011).

3. Antioxydants

Un antioxydant est défini comme une molécule capable de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres molécules, ou comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydé, retarde ou empêche l'oxydation du ceci (Aheret *et al.*, 2011). Au sein de l'organisme, les systèmes antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques (Tableau 2) qui constituent la première ligne de défense du corps contre l'excès d'ERO, en catalysant leur conversion en espèces moins réactives ou stables (Kunwar et Priyadarsini, 2011).

Parfois, ces systèmes de défense n'arrivent pas à assurer une protection complète contre la superproduction des ERO, ce qui oblige l'organisme de disposer dans ce cas des systèmes antioxydants exogènes (Tableau 3) de réparation, apportés par l'alimentation, afin d'éliminer

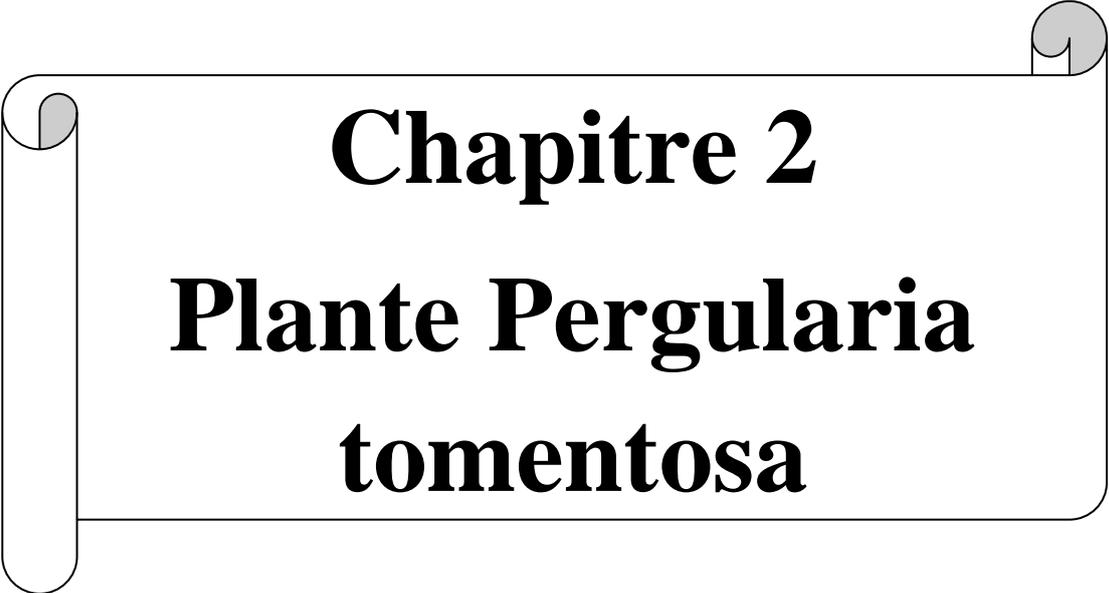
les endommagées résultant du stress oxydant et de se tenir face à ces dernières pour assurer un équilibre qui maintient l'organisme en bonne état le plus long possible.

Tableau 2.Récapitulation des systèmes antioxydant enzymatique.

Système antioxydant	Enzymes	Réactions	Références
Enzymatique	Super-oxyde dismutase (SOD)	Catalyse la dismutation du radical anion super-oxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \Rightarrow O_2 + OH^- + HO^{\bullet}$	(KunwaretPriya darsini, 2011). (Pham-Huy, 2008).
	catalase (CAT)	catalyse la transformation d' H_2O_2 en H_2O et O_2 . $2 H_2O_2 \Rightarrow 2 H_2O + O_2$	(Bonfont-Rousselot et Collin, 2010)
	glutathion peroxydase (GPx)	synergie avec la SOD, d'accélérer la dismutation d' H_2O_2 en H_2O et O_2 . $ROOH + 2 GSH \Rightarrow ROH + GSSG + H_2O$	(Jacquot, 2013)

Tableau 3.Récapitulation des systèmes antioxydants endogènes non enzymatique

Métabolites exogènes	Effet antioxydant	Références	
Vitamines (E et C)	La vitamine C agit en synergie avec la vitamine E pour éteindre les radicaux libres et régénérer la forme réduite de la vitamine E	(Pham-Huy, 2008).	
Caroténoïdes	capacité de ces liaisons à délocaliser les électrons non appariés	(Rahman, 2007).	
Polyphénols	acide phénoliques	neutraliser les radicaux libres en faisant don d'un atome d'électron ou d'hydrogène.	Tsao, 2010).
	Flavonoïde		
	Tanin		



Chapitre 2
Plante Pergularia
tomentosa

Plante *Pergularia tomentosa* L.

1. Description et classification botanique

La plante aromatique *Pergularia tomentosa*, appartenant de la famille Asclepiadaceé, est un arbuste pérenne pousse principalement dans les régions Sahariennes (Shinkafi, 2014). Elle se caractérise par sa tige couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile, sécrétant un latex blanc, corrosif qui peut endommager la peau. Cependant, les feuilles sont opposées, vert amande, ovales ou arrondies, en cœur à la base, caractérisée par l'absence des stipules. Les fleurs sont bisexuées, régulières et parfumées qui se caractérise d'inflorescence en grappes abondantes au bout de long pédoncules (SCHMELZER et GURIB-FAKIM, 2013).



Figure 1. Photographie de la plante *Pergularia tomentosa*

Botaniquement, cette plante appartient de :

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Ordre : Gentianales

Famille : Asclepiadaceae

Genre : *Pergularia*

Espèce : *Pergularia tomentosa* L. (OZENDA, 1991).

2. Composition chimique

L'analyse phytochimique effectuée sur la plante *P.tomentosa* dans nombreux travaux a indiqué que les extraits méthanoliques de la tige et des feuilles contiennent des saponines, des alcaloïdes, des tanins et des glycosides (Dangoggoet al., 2002 ; Shinkafi, 2013). En outre, l'étude phytochimique effectuée par Hassan *et al* ; (2007) sur le *P. tomentosaa* affirment sa richesse en métabolites secondaires, essentiellement, les polyphénols en particulier les flavonoïdes, les tanins, les glycosides cardiaques et les glycosides cyanogènes et aussi des saponines. De plus, les extraits de tiges du *P.daemia*, d'autre espèce appartenant au genre *Pergularia*, semblent avoir les mêmes flavanols glycosides dans leur composition, y compris les 3-O-galactoside et 3-O-glucosides de quercétine et kaempférol, et malonylhexosides de quercétine, kaempférol et Isorhamnetin (Heneidak *et al.*, 2006). Cependant, l'extraction méthanolique menée sur la partie aérienne de *P. tomentosa*, a permis d'extraire des coroglaucigénines, de 16 α -acétoxyalotrope et de calactine (BEKHEET *et al.*, 2011).

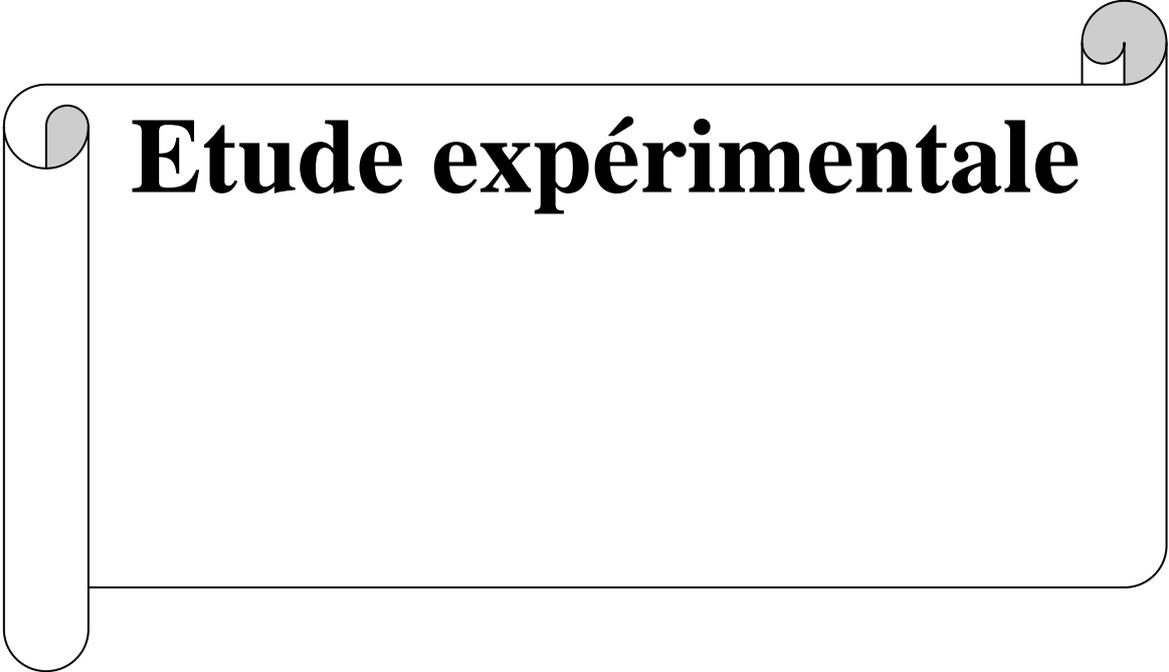
3. Usage traditionnel et activités biologiques

L'incorporation de différentes parties de la plante aromatique *P.tomentosa* dans la médecine est figurée dans le tableau 4.

La présence des molécules bioactives essentiellement les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les glycosides, les saponin, glycosides, et les anthraquinones dans la composition de *P.tomentosa* peut être responsable de l'activité antidermatophytique présentées par cette plante contre la plupart des dermatophytes testés dans l'étude effectuée par Shinkafi (2013). En outre, les extraits aqueux et entraînés par plusieurs solvants organiques des feuilles, des tiges et des racines de cette plante ont montré une activité antifongique contre une série de champignons pathogènes, et des effets bactéricides et moluscicides (BEKHEET *et al.*, 2011). Kemassi et ses collaborateurs (2014) ont reporté dans leur étude, effectuée sur l'extrait aqueux de la plante *Pergulariatomantosa*, que cette plante révèle un effet Hypo-glycémiant. D'après Talwar, 1989, les magnésiums sont des micronutriments antioxydants et leur présence pourrait donc stimuler le système immunitaire, et aider à éliminer les carences en magnésium qui pourraient conduire à de graves troubles métaboliques et de compromettre la santé de l'organisme. Activité anti oxydante

Tableau 4. Usage traditionnels du *Pergularia tomentosa*

Régions	Partie utilisée	mode d'utilisation	Usages	Références
Sahara alalgérienne	Feuilles et fleurs	Décoction	Angine, Teigne et Dermatose	OULD EL HADJ <i>et al.</i> (2003)
	Partie aérienne	Décoction	Hypoglycémiant	KEMASSI <i>et al.</i> (2014).



Etude expérimentale



**Matériel et
Méthode**

Matériel

1. Matériel végétal

La récolte de la plante *Pergularia tomentosa* a été fait au mois de décembre 2017, du sud d'Algé (superficie d'agricole Bordj En noue, Municipalité d'El-Hajeb, wilaya de Biskra), l'espèce étudiée a été identifier par Mme :SAIDI.A (Département de sciences de la nature et de la vie, Université Mohamed khider –Biskra).

La partie aérienne de *P. tomentosa*, compris les feuilles, les fleurs et les petites tiges, a été nettoyée des impuretés, séchée à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, puis broyée à l'aide d'un mortier pour avoir une poudre, qu'à partir de laquelle, les extractions ont été effectuées.

2. Matériel biologique

Les animaux utilisés, dans le présent travail, dans l'étude la toxicité aiguë des extraits de *P. tomentosa*, sont des souris mâles *Blanc Swess Albion*, de 19-35g du poids, issues du laboratoire des animaux de l'institut Pasteur d'Algérie (kouba-Alger). L'élevage des animaux est fait au niveau de l'animalerie (Département de sciences de la nature et de la vie, Université Mohamed khider –Biskra). Dans les conditions favorables d'élevage, les animaux sont maintenus en période d'adaptation de plus d'une semaine. Les souris sont partagées en petits groupes de 5 et de 6 animaux/cage alimentées en eau potable et en concentré d'aliment de Alimentation de bétail (Biskra). La température est maintenue constante entre 20 et 25°C, taux d'humidité entre 60 et 70% ainsi que la photopériode est de 12h/12h.

3. Réactifs chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés dans le présent travail Les réactifs et les solvants utilisés dans le présent travail sont de grade analytique et proviennent des marques Sigma, Fluka, Aldrich, Applichempanreac et BioChem, ils sont : Méthanol, éthanol, Acide gallique, Quercetine, catéchine trichlorure acide (TCA), Ferricyanure de potassium ($K_3(CN)_6$), trichlorure du fer ($FeCl_3$), 1,2-déphenile 2picrylhydrazyle (DPPH), diméthylsulfoxyde DMSO, réactif Folin-ciocalteu, trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), quercetine, acide gallique, catéchine, phosphate dibasique (Na_2HPO_4), phosphate monobasique (NaH_2PO_4), chlorure d'hydrogène (HCl), hydroxyde de potassium (KOH), hydroxyde de sodium (NaOH), réactif de Mayer, chloroforme, anhydride acétique, acide sulfurique, Formaldéhyde, l'eau physiologique NaCl 0.09%, paraffine, Xylène, EUKITT, Eosine aqueuse 2%, Alcool éthylique 96,7°, Formaldéhyde, et le réactif de Stiansy.

Méthodes

1. Préparation de différents extraits de la plante *P. tomentosa*

1.1. Extraction aqueuse

L'extrait aqueux de la plante a été obtenu à partir de 200g de plante en poudre par décoction dans d'un litre d'eau à ébullition pendant 15min (Thenmozhi, 2011), puis la solution a été filtrée et séchée dans l'étuve à 40°C. Un extrait aqueux jaune cristallin(AQ) est obtenu et ensuite conservé à -4°C jusqu'à son utilisation.

1.2. Extraction méthanolique

Selon la méthode décrite par Bekhe *et al.* (2011), l'extrait méthanolique de *Pergularia tomentosa* a été préparé. Brièvement, 100g de plante a été mise en macération 10 % (w:v) dans du méthanol (80%), à la température ambiante et à l'ombre pendant 48h. Après filtration sous vide, le filtrat a subi l'évaporation (thermo spectronic, USA) puis séchés afin de récupérer un extrait brut (EMet) cristallin verdâtre. L'extrait est conservé à -4°C.

Le rendement d'extraction reflète un rapport entre le poids de poudre obtenu et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement qu'est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante:

$$R = WE/WP \times 100.$$

Où

R= Rendement de l'extrait en pourcentage;

WE= Poids de l'extrait en gramme;

WP= Poids de la plante en gramme.

2. Screening phytochimiques des extraits de *P. tomentosa*

2.1. Caractérisation des alcaloïdes

Avec une petite modification, l'identification des alcaloïdes dans les deux extraits du *P. tomentosa* a été effectuée par l'ajout d'un volume de 10ml de méthanol à 0.2g de chacun des extraits. Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24h, les extraits sont filtrés. Un volume de 2ml d'une solution aqueuse d'HCl à 10% a été ajouté 2ml du filtrat. L'ensemble est chauffé puis filtré, avant d'ajouter quelques gouttes du réactif de Mayer. L'observation d'une turbidité ou la formation d'un précipité jaune témoignent la présence d'alcaloïdes (Aliyuet *al.*, 2011)

2.2. Caractérisation des coumarines

Une quantité de 0.2g de chaque extrait a été ajoutée à 10ml de méthanol et 10 gouttes de KOH (10%). L'apparition de couleur jaune qui disparaît avec l'ajout de 10 gouttes d'HCl concentré montre la présence de coumarines (Hindumathy,2011).

2.3.Caractérisation des quinones libers

Une quantité de 0.5g de chaque extrait a été additionnée à 10ml d'éther du pétrole, après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24h, les extraits sont ensuite filtrés. la présence de quinones libers est confirmée par l'ajout de 10gouttes du NaOH (10%),lorsque la phase aqueuse vire au jaune ,rouge ou violet(Dohouet *al.*,2003).

2.4. Caractérisation des anthraquinones

Une quantité de 0.5g de chacun d'extraits a été dissoute dans du 10ml de chloroforme. Ensuite, les extraits sont filtrés après une agitation manuelle d'une minute suivie par un repos de 24h. Une quantité de KOH (10%)a été ensuite ajouté à chaque extrait.Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Dohouet *al.*,2003).

2.5.Caractérisation des saponosides (Frothing test)

La présence des saponosides, parmi les métabolites secondaires de la plante *P. tomentosa*,a été déterminée qualitativement par l'apparition, après agitation, de mousse persistante pour plus de 15 à 30min. Une quantité de 1g de chaque extrait a été solubilisée dans 10ml l'eau distillée et la solution a été agitée vigoureusement dans le sens vertical pendant 15 à 30sec (Dohouet *al.*,2003 ;Aliyuet *al.*,2011).Après 15 min, la hauteur de mousse est mesurée. lorsqu'elle est supérieure d'un 1cm cela indique la présence de saponosides(N'Guessanet *al.*,2009).

2.6. Caractérisation des stérols et polyterpènes (Lieberman-Burchard's test)

Sur 1ml d'anhydride acétique et de 0.5ml de chloroforme, une quantité de 0.5g de chaque extrait sont additionnes, après dissolution, les solutions sont transférés dans des tubes à essai auxquels sont ajout les 0.5ml d'acide sulfurique concentré. l'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert indique une réaction positive (N'Guessanet *al.*, 2009).

2.7.Mucilages

1g de chaque extrait est solubilisé dans du 5ml d'éthanol absolu. Après 10min,l'obtention d'un précipité floconneux par agitation indique la présence de mucilages(Amadou,2006).

2.8. Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols . une goutte de solution méthanolique de FeCl_3 2%a été ajoutée 2ml de chaque extrait .L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (N'Guessanet al.,2009).

2.9. Caractérisation des Flavonoïdes (Test de Shibata ou Shinoda test)

La présence es Flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine (Ciulel,1982) .En effet ,les flavonoïdes sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de l'organé au rouge pourpre .en présence l'acide chlorhydrique concentré et de magnésium (Hadj-Salem , 2009).

Une quantité de 0.5g de chaque extrait a été dissoute dans 1.5ml du méthanol (50%) et chauffée dans un bain d'eau bouillante .un volume de 5l d'HCl et quelque fragments de de magnésium ont été ensuite ajoutée .Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, une coloration rouge est obtenue (Aliyaet al., 2011).

2.10. Caractérisation des Tanins (test au FeCl_3)

Une quantité de 2 à3 gouttes de FeCl_3 (1%)a été ajoutée à 1 ml de chaque extrait. La couleur vire au bleu noir en présence de tanin gallique et au brin verdâtre en présence de tanins catéchique (Dohouet al. ,2003).

Le réactif de stiansy a été utilisé afin de différencie convenablement entre les tanins gallique et catéchique. pour cela un volume de 15 ml du réactif de stiasny (10ml de formaldéhyde +5ml d'HCl concentré) a été ajouté à 5ml de chaque extrait. le mélange est incubé ai bain-marie à 80C^0 pendent 30 min. l'observation d'un précipité en gros flocons reflète la présence des tanins catéchique .pour les tanins gallique, la solution précédente a été filtré. Le filtra est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl_3 provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense. signe de la présence de tanins gallique (N'Gueassanet al., 2009).

3. Analyse quantitative des extraits de *P. tomentosa*

3.1.Dosage des polyphénols totaux

Le contenu de l'extrait aqueux et méthanol de *P.tomantosa* polyphénols est estimé selon la méthode décrite par Slinkard et Singleton (1977), en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu(Ce dosage repose sur le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce

réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

200 µl de solution d'extrait ou de l'acide phénolique référence, à différentes concentrations, sont ajoutées à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4min, 800µl du carbonates de sodium (75g/l) sont additionnés. Le mélange est laissé incubé pendant 2h à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 765nm (Spectrophotomètre Thermo Spectronic, USA). L'acide gallique (20-140µg/ml) est acide phénolique standard utilisé qu'à partir de l'équation de régression, établie de sa courbe d'étalonnage, la teneur en composés phénoliques est calculée. Le résultat est exprimé en microgramme d'équivalents d'acide gallique / milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Bahorunet *al*, 1996) a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *P. tomentosa*. Cette méthode est basée sur une réaction entre le trichlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes, entraînant la formation d'une coloration jaunâtre (Lagnika, 2005).

Un volume de 1ml des extraits aqueux, méthanolique et quercétine (préparée dans du méthanol), à différentes concentrations, a été additionné à 1ml d' $AlCl_3$ (2%). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans différents extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage préparée à partir de huit concentrations de quercétine allant de 35 µg/ml. Elle est exprimée en milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

3.3. Dosage des Tanins

Le dosage des tanins condensés dans les extraits de *P. tomentosa* est effectué selon la méthode de Sun (1998). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe la lumière à 500 nm.

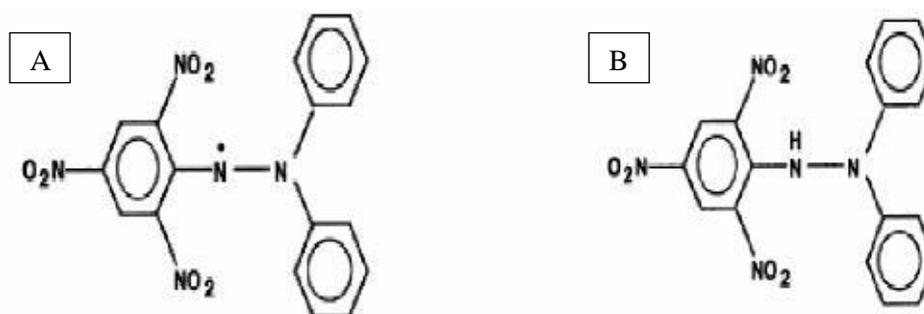
A 250µL de chaque échantillon ou standard, on ajoute 625µl d'une solution de vanilline (1%), et 625 µl d'acide sulfurique (10%). Le mélange est incubé durant 15 min. Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies

avec la catéchine et sont exprimées en microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g ECT}/\text{mg E}$).

4. Evaluation de l'activité antioxydante de *P. tomentosa*

4.1. Test de piégeage vis-à-vis le radical DPPH

Ce test a permis d'évaluer l'activité anti-oxydante d'un extrait, par piégeage des radicaux libres, en mesurant son activité donneuse des atomes d'hydrogène ou des électrons. Le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable de couleur pourpre, il devient réduit à la couleur jaune ((Boumarfegue *et al.*, 2012). 50 μl de différentes dilutions de chaque extrait de *P. tomentosa* ou standard (acide gallique et quercétine) ont été mélangés avec 1250 μl d'une solution méthanolique à 0,004% du DPPH. Après une période d'incubation de 30 min à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance des échantillons a été lue à 517 nm (Spectrophotomètre Thermo Spectronic, USA). Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indiquait une plus grande activité de piégeage des radicaux libres.



Diphenylpicrylhydrazyl (Radical libre) (B) Diphenylpicrylhydrazyl (forme réduite)

Figure 2. Forme libre et réduite du DPPH (Molyeux, 2004)

La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ test}]}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \times 100$$

Abs control : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm;

Abs test : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm.

4.2. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de différents extraits de *P. tomentosa* est évalué par la méthode de la réduction du fer décrite par OYAIZU (1986) qu'est basée sur la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en Ions ferreux (Fe^{2+}) en présence des antioxydants.

Différentes concentrations de chaque extrait ou standard (acide gallique et quercitrine) sont mélangées avec 2.5ml de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 2.5ml de Ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite ajouté 2.5 ml de TCA (10%), pour arrêt de la réaction. Le mélange est ensuite centrifugé (1000rpm/10min centrifugeuse à refroidissement). 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml de $FeCl_3$ (0.1%) sont additionnés à 2.5ml du surnageant. L'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le $FeCl_3$. La valeur EC est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du Fe^{3+} équivalente à 1 mg du l'extrait déterminée par l'équation de régression correspondante.

Le pouvoir antioxydant des extraits a été exprimé en microgramme d'équivalents du d'acide gallique et quercetine par milligramme d'extrait (μg EAG ou EQ/mg E), en choisissant une concentration commune entre les deux extraits.

5. Etude de la toxicité aiguë des extraits de *P. tomentosa*

5.1. Préparation des lots

Des souris mâles *Swiss Albino* marqués pour permettre une identification individuelle. Pour examiner la toxicité de chaque extrait, les souris sont réparties selon l'homogénéité de leurs poids en trois lots expérimentaux de 5 à 6 animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages en polyxèneet dans les conditions favorables d'hébergement, rapportées au-dessus. Ils ont été suivis quotidiennement pendant une semaine pour bien s'adapter au nouvel environnement, avec un renouvellement des copeaux de rabotage, pour assurer le bon état hygiénique des animaux. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique avec de l'eau potable à satiété.

5.2. Préparation des doses

Pour l'étude toxicologique, différentes doses, d'extraits aqueux EAQ et methanolique EMet de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa*, ont été solubilisés dans du NaCl (0.9%). Cependant, un volume constant égal à 0.5ml/animal de chacun de ces extraits a été administré pour toute la gamme des doses préparées en fonction de poids, à examiner la toxicité de 1000, 1500 et 2000mg/kg dans l'ordre moins vers plus concentré.

5.3. Mode du traitement

Dans la présente l'étude de la toxicité aiguë des extraits AQ et Met de *P. tomentosa*, nous avons reposé sur les lignes directrices de l'OCDE (2001 ; 2008), en appliquant la

méthode de l'ajustement des doses à la détermination de la toxicité aiguë et la DL₅₀ des produits chimiques testés.

Durant l'essai limite, deux groupes (groupe AQ₂₀₀₀ et groupe Met₂₀₀₀) aux 5 animaux (n=5) reçoivent une dose expérimentale unique de 2000 mg/kg de l'un des extraits, qui a été administrée séquentiellement par voie orale, en utilisant une sonde gastrique. A travers la même voie, des doses uniques de l'ordre de 1000 et 1500mg/kg de chaque extrait ont été également appliqués sur des lots (groupe AQ₁₀₀₀, AQ₁₅₀₀ et Met₁₀₀₀, Met₁₅₀₀) aux 6 animaux (n=6) pour confirmer l'essai limite. Par revanche, le groupe témoin a y compris 6 animaux, chacun reçoit un volume de 0.5ml du NaCl 0.9%.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de chacun d'extraits, on supprime alors la nourriture mais pas l'eau pendant 3 à 4h. Après la période de jeune, les animaux doivent être pesés avant l'administration par gavage. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture 1 à 2h.

5.4. Observation des signes de la toxicité

Les signes de la toxicité doivent porter individuellement sur la mortalité et/ou les modifications de poids, la peau, pelage, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement, induites par l'extrait. L'attention a été portée alors dans un tableau d'observation pour chaque animal de chaque groupe (Tableau 5)

Tableau 5. Observation les signée pour chaque animal de chaque groupe

Tableau d'observations pour animal.....gr..... (n=.....)

	0h	1H	3H	1J	2J	3J	4J	5J	6J	7J	8J	9J	10J	11J	12J	13J	14J
Mortalité																	
T° corporel																	
Poids																	
Peau																	
Pelage (alopécie)																	
des yeux																	
Salivation																	
Tachypenie ou dyspnie																	
Tremblement																	
Convulsion																	
Diarrhée																	
léthargie, sommeil et coma																	
anorexie et déshydratation																	

5.5. Prélèvement et préparation des échantillons

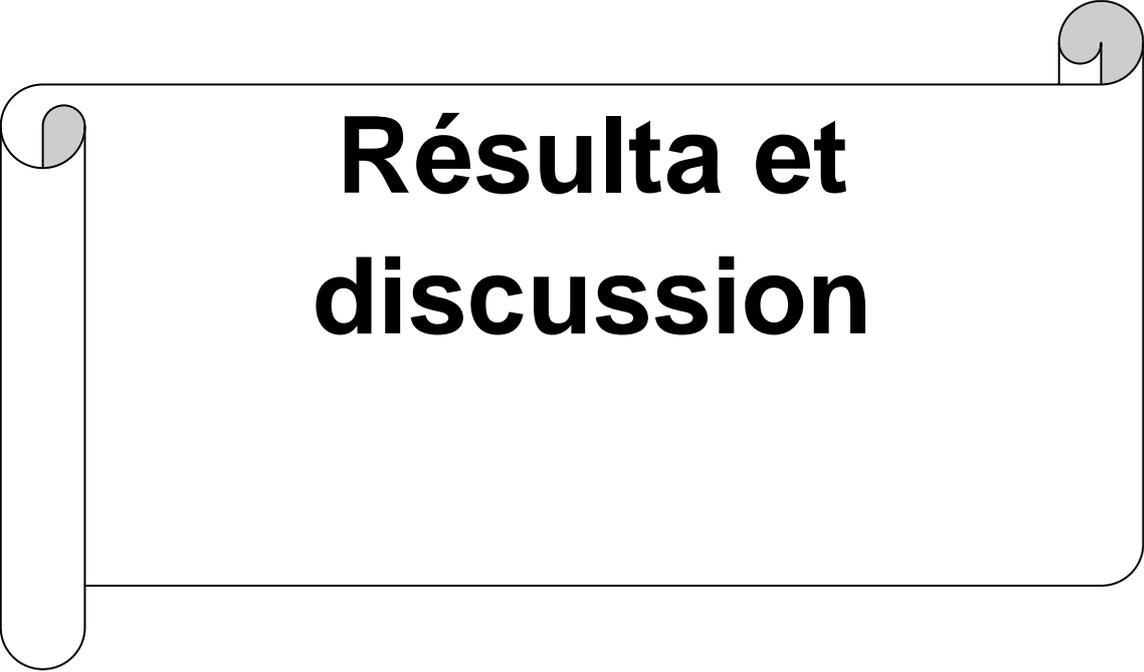
À jeun, le sang a été collecté à partir de la veine jugulaire externe après une deux semaines de suivi de la toxicité, autrement dit, de premier jour de gavage de souris jusqu'au 14eme jour lors de sacrifice. Le sang recueilli dans un eppendorf étiqueté à partir de chaque animal et centrifugé directement à 1000rpm/min pendant 10min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -4°C C jusqu'à son utilisation dans les analyses des paramètres biochimiques. Les analyses biochimiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital Bachir ben nacre Biskra (maternité). Les paramètres dosés sont la glycémie (Kaplan L, et al. 1984), le taux sanguin d'urée (Méthode de Berthelot 1960) et de la créatinine (Murray et al. 1984), et taux de la transaminase AST(TGO) en utilisant Kit de SPINREACT.

5.6. Etude histo-pathologique

L'étude histopathologique a été effectuée dans le laboratoire d'analyse des pathologies anatomiques, l'hôpital de gynécologie obstétrique et de pédiatrie (Biskra). Premièrement, les pièces anatomiques (foie et reins) récupérés des souris, ont été entièrement déshydratée avant d'être incluses dans la paraffine, les trois étapes de déshydratation, d'inclusion et de découpage ont été réalisées 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. Enfin, la lecture des lames a été réalisée par Dr. Mimouni S., Médecin spécialiste en anatomie pathologique (l'hôpital de gynécologie obstétrique et de pédiatrie -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 (camera de téléphone).

6. Analyses statistiques

Toutes les expériences in vitro ont été faites en triple et les résultats présentent la moyenne avec son écart type, alors que ceux des essais effectués in vivo sont exprimés en moyenne \pm SD selon le nombre des animaux survécus. La différence entre la réactivité d'extraits et les contrôles ainsi que la détermination des taux de signification sont effectués par le test d'échantillon unique par logiciel SPSS version 20.



Résulta et discussion

1.Extraction

Les extraits aqueux EAQ et méthanolique Emet de la partie aérienne de *Pergularia tomentos* sont obtenus par deux méthodes d'extraction différentes, une décoction de 15min et une macération dans de méthanol 80% durant 48h respectivement .Nous avons obtenu un extrait EAQ jaune en poudre d'un rendement est égale à 8.6%.Cependant, l'Emet obtenu est un extrait cristallin verdâtre, et de 9.97% du rendement.

L'utilisation d'eau et méthanol permet d'extraire les composés polaires et ceux à polarité moyenne, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs activités biologiques. Cependant, la solubilité de ces composés dépend de leur nature chimique, et la polarité du système solvant utilisé. Bin que ces facteurs, à coté de leur répartition dans la plante, peuvent influencer sur le rendement d'extraction.

2. Analyses phyto-chimiques des extraits de la plante *P.tomentosa*

2.1. Screening qualitatif des métabolites secondaires

Les résultats de tests screening phyto-chimique menés sur les extraits EAQ et Emet de la partie aérienne de l'espace *P. tomentosa* montrent la richesse et la diversité de cette plante en métabolites secondaires. Les résultats révèlent également que les deux méthodes d'extractions nous permettent d'extraire un large spectre des composés aux activités biologiques principalement les acide phénoliques, les flavonoïdes et les tanins. Cependant, l'extrait EAQ semble être plus riche en principes actifs que l'extrait brut Emet.

Tableau 6.Résulta de screening phytochimie des extrait EAQet Emet du *P.tomentosa*..SAP: saponines, TAN: tanins, ALC :Alcaloïdes, QUI :Quinones libres, ANTH :Anthraquinone, COM :coumarine, STE :Stérols, MUS :Mucilage, FLA :Flavonoïde, PHY :Polyphénols

	SAP	TAN	ALC	Qui	ANTH	COM	STE	MUS	FLA	PHY
EAQ	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
EMet	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

En effet, les terpènes sont des molécules volatiles, appartenant à la catégorie des huiles essentielles, qui sont entraînées à la vapeur lorsqu'ont subi à une température importante lors de la décoction ou l'évaporation(Mohammed,2015) ce qui peut expliquer cette perte. Par contre, les stérols sont des matières lipidiques hydrophobes insolubles ou présentent une faible solubilité dans l'eau et même dans les solvants alcooliques tels le

méthanol(Mohammed,2015), ce qui est corrélé avec leur absence dans les deux extraits. Par ailleurs, la plante *P. tomentosa* semble dépourvu les alcaloïdes, ce qui peut se lié aux propriétés génotypiques de la plante elle-même.

3.Quantification des polyphénols totaux, des Flavonoïdes et des tanins

Dans le but de caractériser le contenu en principaux métabolites secondaires des extraits du *P.tomantosa* obtenus dans le présent travail, des dosages de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins ont été effectué.

Le dosage des composés phénoliques a été fait selon la méthode au réactif du Folin-Ciocalteu décrite par (Slinkard et Singleton (1977)).Néanmoins, le contenu des deux extraits en flavonoïdes a été estimé par la méthode au trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Bahorumet al.,1996). En plus, la quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée parSun (1998).Des courbes d'étalonnage établies alors d'acide gallique (figure),de quercétine (figure)et de catéchine, sont utilisés comme des phénols standards.

Les teneurs d'extraits EAQ et EMet en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins sont exprimées en microgramme d'équivalents d'acide gallique($\mu\text{g EAG}$), de quercétine (μgEQ)et de catéchine (μgECT)par milligramme d'extrait, respectivement, et elles sont représentées dans le tableau (7)

Tableau 7.Teneurs des extraits EAQ et EMet du Principe métabolite secondair.les valeur représentent la moyen de 3 \pm SD

	EAQ	Emet
Polyphenols ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	22.37 \pm 2.38	12.33 \pm 1.46
Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ /mg E}$)	2.88 \pm 0.44	8.58 \pm 0.43
Tanins ($\mu\text{gECT/mgE}$)	143.3 \pm 4.6	67 \pm 0.9

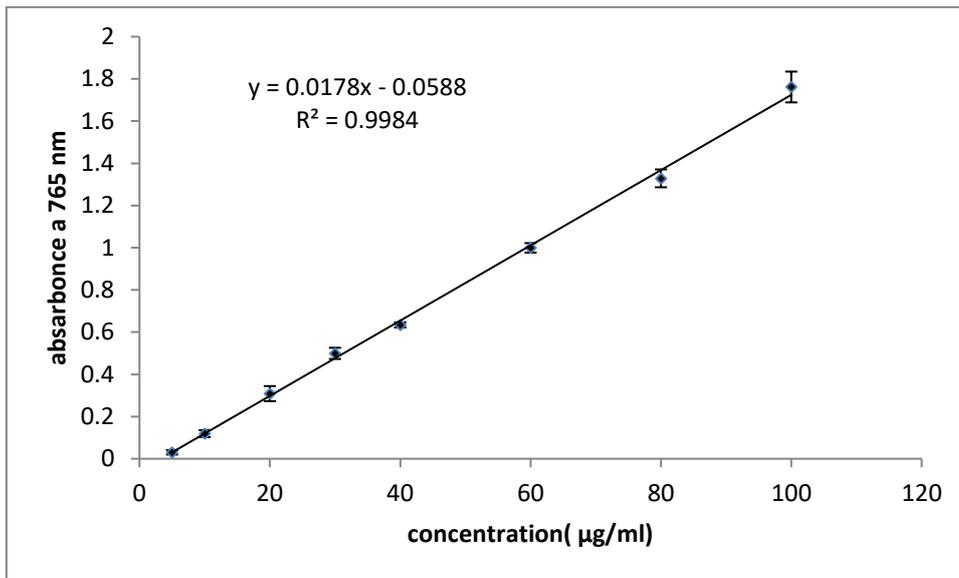


Figure 3. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (m±SD) en triplicate.

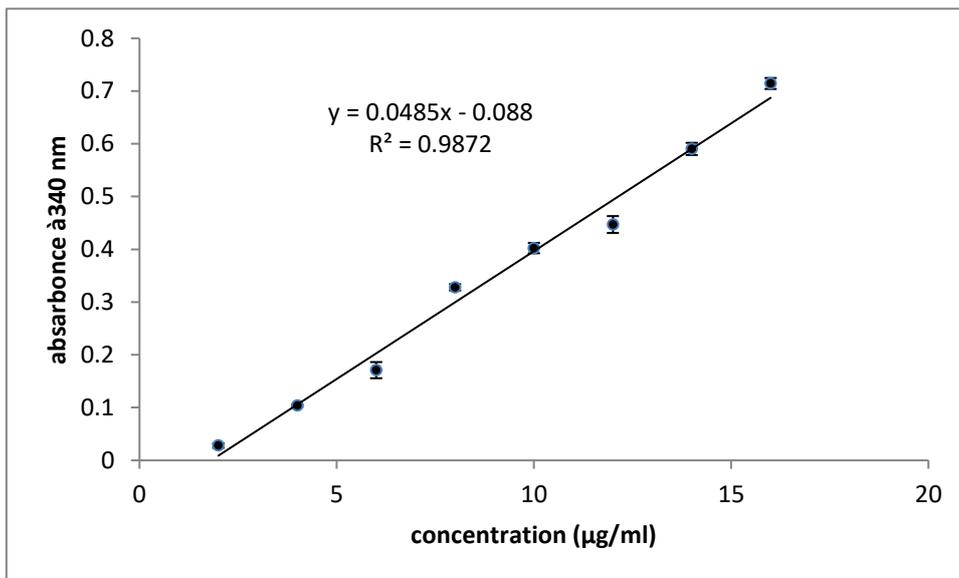


Figure 4. Droite d'étalonnage de quercetine(m±SD) en triplicate.

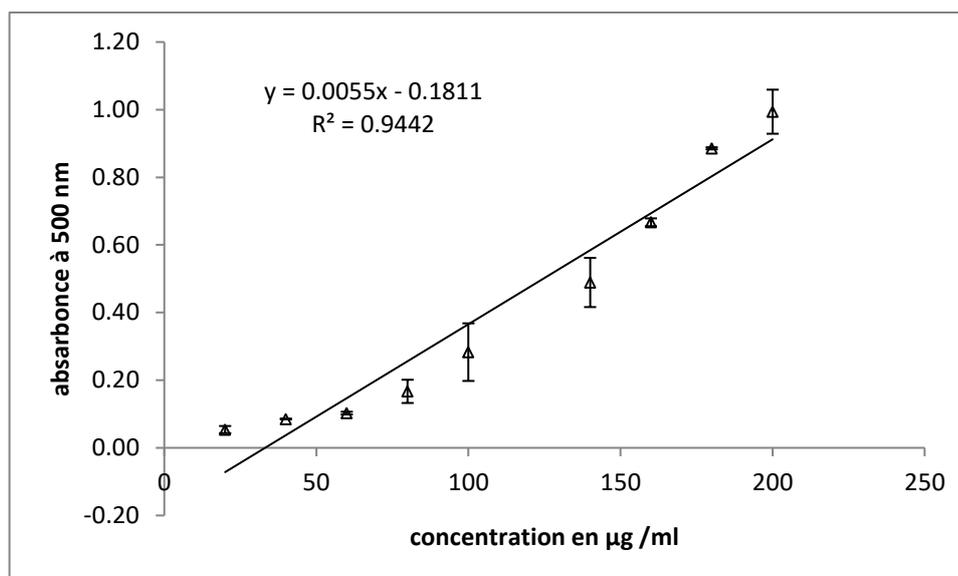


Figure 5. Droite d'étalonnage de catéchine ($m \pm SD$) en triplicate.

En corrélation avec les résultats de screening, l'étude phyto-chimique quantitative (tab6), autrement dit le dosage, a démontré que l'extrait aqueux du *P.tomentosa* est à la pointe par sa teneur en polyphénols que son extrait méthanolique. Au contraire, ce dernier semble avoir un contenu, plus important en flavonoïdes, qui est trois fois supérieur à celui d'EAQ. En outre, le dernier dosage effectué a également révélé que l'EAQ possède la teneur en tannins condensés la plus marquante avec une valeur égale à $(143.3 \pm 4.56 \mu\text{g ECT/mg})$ en comparaison avec celle enregistrée par l'Met $(67.8 \pm 0.9 \text{ ECT/mg})$.

Nos resultants sont en accord avec ceux reportés par les travaux de Boushale(2011) sur espèce *Retamasphaerocarpa* qui appartient à la même famille d'Asclepiadaceé. Ce qui a confirmé la richesse de la plante *Pergularia tomentosa* en large gamme de composés chimiques d'intérêts thérapeutiques pourrait justifier ses nombreux usages en médecine traditionnelle.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Activité anti-radicalaire (test du DPPH)

L'effet piègeur d'extraits EAQ et EMet de la plante *Pergularia tomentosaa* été évalué par la méthode spectro-photométrique vis-à-vis le radical DPPH. Ce dernier possède une coloration violette foncée qui va se transformer en jaune pâle, ce qui diminue son absorbance à 517nm, lorsqu'il est réduit par les composés antioxydants en lui donnant un proton ou un électron (Boumarfeguet *al.*, 2012). La valeur IC_{50} est alors définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), ou

encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituer du DPPH dissous dans du méthanol.

La figure6 révèle que les deux extraits de la partie aérienne de *P. tomantosa* exercent significativement une activité anti-radicalaire concentration-dépendante avec un effet piègeur maximal de 61.5% et de 92.97% engendré par l'EAQ et l'EMet, à partir d'une concentration de 25mg/ml, respectivement. Par contre, L'acide gallique et la quercetine, utilisé comme des agents antioxydants standards ,semblent avoir un effet antioxydant puissant de 96.33% et de 94.78% envers le radical DPPH à une concentration de 0.32mg/ml d'acide gallique et de 0.2mg/ml de quercetine, respectivement (figure 7).

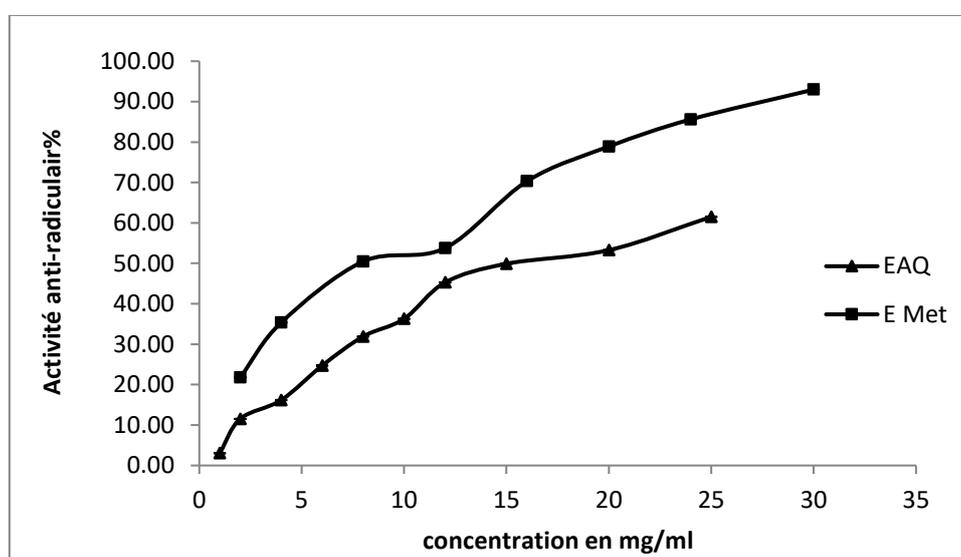


Figure 6.Activité anti-radicalaire d'extraits EAQ et EMet du *P.tomantosa* vis-à-vis le DPPH. Les valeurs représentent $m \pm SD$ (n=3).

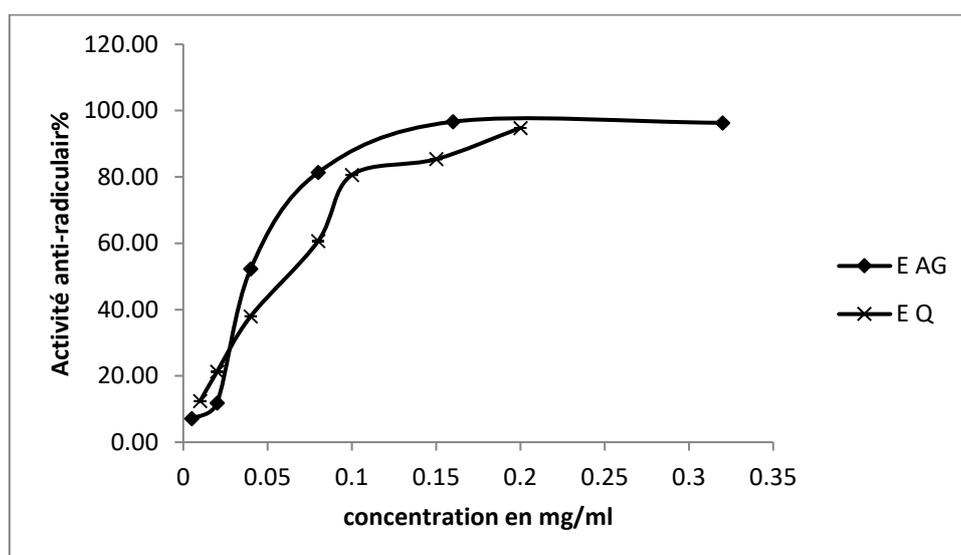


Figure 7.Activité anti-radicalaire d'acide gallique et quercetine vis-à-vis le DPPH. Les valeurs représentent $m \pm SD$ (n=3).

Les résultats obtenus dans le présent travail ont indiqué que les standards phénoliques, l'acide gallique, et la quercétine, possèdent une activité anti-radicalaire dose-dépendante, quelle est très importante et toute fois supérieure à celle enregistrée par les deux extraits de la partie aérienne de *P.tomentosa*. Puisque l'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, l'acide gallique semble être statistiquement ($p \leq 0.01$) le piègeur le plus puissant avec la faible valeur d'IC₅₀ qui est égale à 0.04 ± 0.01 mg/ml, suivi par la quercétine (0.05 ± 0.0 mg/ml), l'EMet et l'EAQ avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 6.7 ± 0.2 mg/ml et 17.8 ± 3.3 mg/ml, respectivement.

Tableau 8. IC₅₀ d'activité Anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH des extraits EAQ et Emet Les valeurs représentent $m \pm SD$ (n=3).

IC ₅₀ en mg/ml	
Acide Gallique	$0,04 \pm 0.1$
Quercétine	0.05 ± 0.0
E Met **	6.70 ± 0.2
EAQ**	17.86 ± 3.3

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Mouhamed, (2015) sur la même espèce. Récoltée de quatre régions différentes.

En outre, l'Emet de *P. tomentosa* présente un effet scavenger ou piègeur plus important ($p \leq 0.001$) que celui exercé par son extrait EAQ, ce qui est corrélé avec les résultats de dosage qui ont révélé la richesse de l'extrait brut hydroalcoolique en flavonoïdes que l'extrait aqueux. D'après ces résultats, on peut suggérer que l'effet antioxydant que présente une plante est proportionnelle à son contenu en polyphénols y présents tels les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins. Cela peut être également dû à la quantité, la nature chimique et le type des composés antioxydants présents dans chaque extrait (Jayaprakasha et Patil, 2007). En effet, nombreuses études ont rapporté que les flavonoïdes, parmi les composés phénoliques, sont les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Wang et Mazza, 2002).

De plus, le mécanisme de la réaction entre agent antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de celui-ci. En effet, La configuration spatiale et le nombre de groupements OH que présente la structure des flavonoïdes peuvent avoir une influence sur ce

mécanisme antioxydants (Hein *et al.*, 2002).L'action de ces métabolites antioxydants est supposée être due à leur capacité de donner un atome d'hydrogène ou un électron à partir des groupements d'hydroxyles que contiennent les flavonoïdes(Hein *et al.*, 2002).les tanins hydrolysables et condensés capturent les radicaux libres, la réaction de piégeage rapide a été inhibée par la complexation du tanin en protéine, les complexes protéine-tanin ont été alors convertis en une forme réfractaire au cours de la réaction avec les radicaux libres, vraisemblablement à cause de l'oxydation et de la formation de liaisons covalentes. Les complexes tannin-protéine dans le tractus gastro-intestinal peuvent fournir une activité antioxydant persistante (Riedlet *al.*,2002).

4.2.Pouvoir réducteur

Selon Oyaizu (1986), le test de réduction Fe (III) à Fe (II) mesure la capacité réductrice d'un composé ou d'un extrait, ce qui signifie son pouvoir à donner un électron. Afin d'évaluer alors le pouvoir donneur d'électrons d'extraits EAQ et EMet de *P.tomantosa*, nous avons appliqué ce test sur différentes concentrations de chacun.L'acide gallique(figure 8) et la quercetine (figure 9) ont été employé comme des composés phénoliques standards à différentes concentrations, et leur pouvoir réducteur est représenté dans les graphes 8 et 9 respectivement, sous forme des absorbances en fonction de concentration. Cependant, l'augmentation de l'absorbance correspond au pouvoir réducteur intense de l'échantillon étudié .Nos résultats sont exprimés ensuite en microgramme d'équivalents d'acide gallique et de quercetine, $\mu\text{g EAG}$ et $\mu\text{g EQ}$ (AydaKhadhri *et al.*,2016).

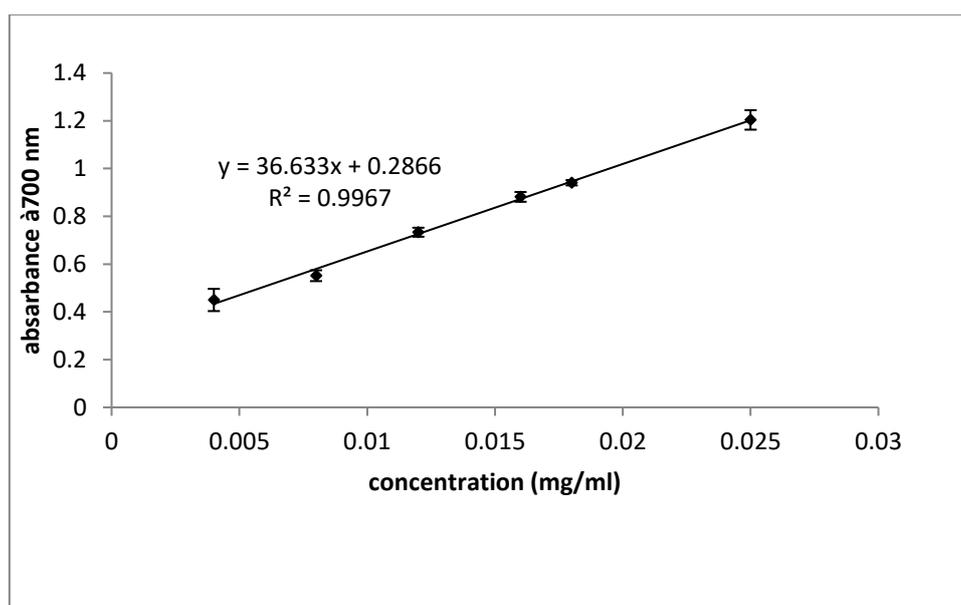


Figure 8.Pouvoir réducteur engendré par l'acide gallique .Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD (n=3).

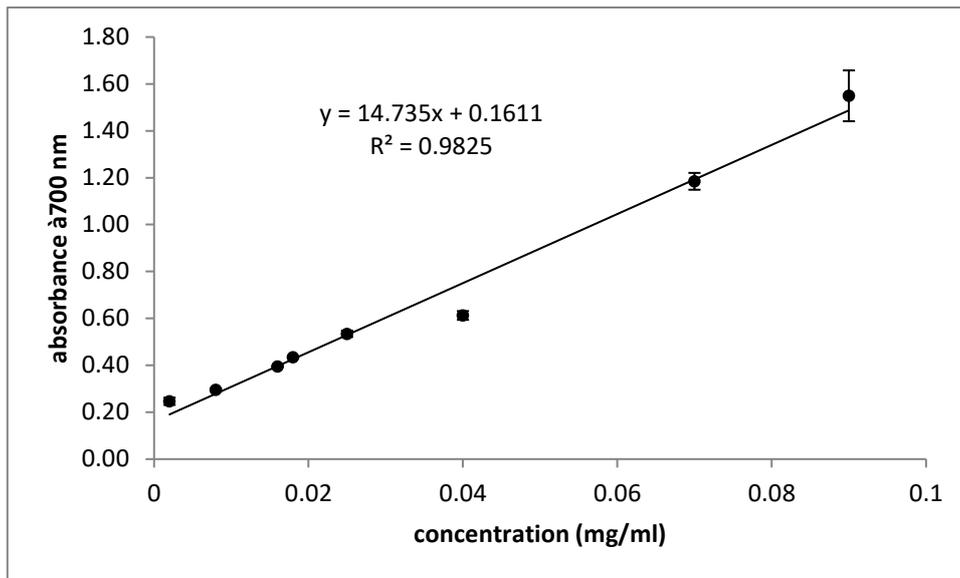


Figure 9. Pouvoir réducteur engendré par le quercetine. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD (n=3).

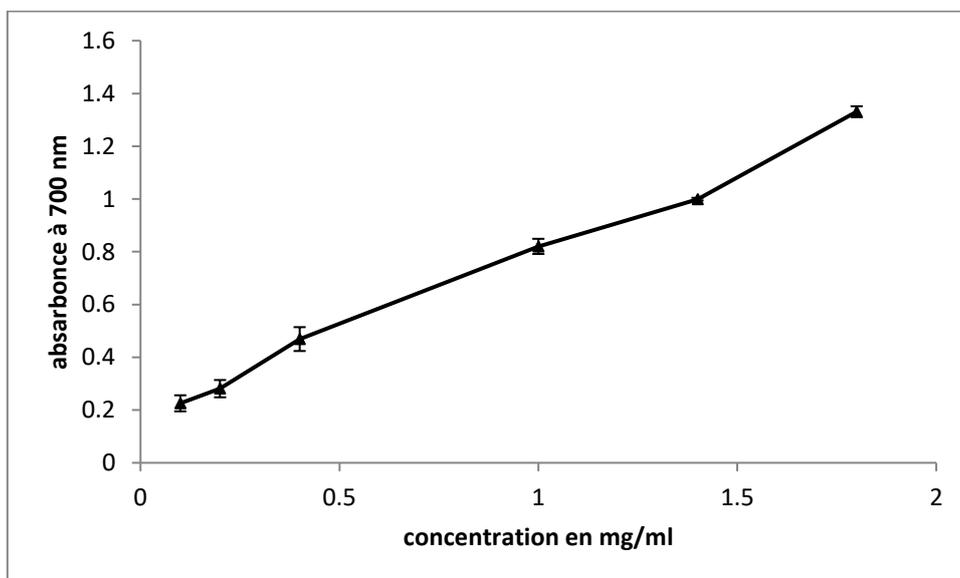


Figure 10. Pouvoir réducteur de l'extrait EMet. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD (n=3).

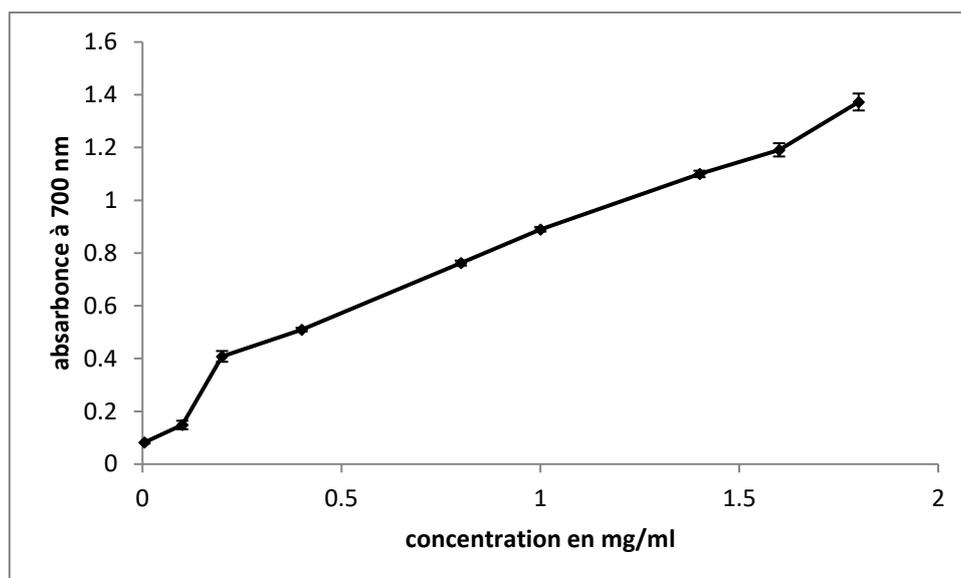


Figure 11. Pouvoir réducteur de l'extrait EAQ. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD (n=3).

Les résultats obtenus nous indiquent que l'extrait EMet (figure 10) et EAQ (figure 11) possèdent, tous les deux, une activité réductrice intéressante dose-dépendante et est statistiquement (*ns*) similaire à celle des composés phénoliques utilisés comme des antioxydants standards. Cependant, le pouvoir réducteur engendré par l'EAQ semble important et significativement (*ns*) supérieur à celui de l'EMet, ce qui a été signalé par les valeurs d'équivalent d'acide gallique et de quercétine (tab9).

Tableau 9. Pouvoir réducteur des extraits EAQ et EMet du *P.tomentosa* équivalent d'acide gallique et quercétine. Les valeurs représentent $m \pm SD$ (n=3)

	Pouvoir réducteur en μgEAG	Pouvoir réducteur en μgEQ
EAQ	0.016 ± 0.01^{ns}	0.049 ± 0.01^{ns}
EMet	0.014 ± 0.01	0.046 ± 0.001

Ces résultats suggèrent également que la plante étudiée constitue une source prometteuse des molécules bioactives tels les polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les tanins, qui présentent la capacité de donner des électrons et des protons ce qui favorise la réduction du fer ferrique Fe (III) en fer ferreux, aussi bien ces principes actifs peuvent récupérer les espèces oxygénées et les radicaux libres et les rend moins ou non réactifs (AydaKhadhriet *al.*, 2016).

5. Etude de la toxicité aiguë des extraits EAQ et EMet de *P. tomentosa*

Pour l'étude toxicologique, différentes doses, d'extraits aqueux EAQ et méthanolique EMet de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa*, ont été solubilisés dans du NaCl (0.9%) et administrées par voie orale aux souris mâles *Swiss Albino* marqués pour permettre une suivi individuelle. Durant l'essai limite, des groupes (AQ₁₀₀₀,AQ₁₅₀₀.AQ₂₀₀₀et Met₁₀₀₀, Met₁₅₀₀.Met₂₀₀₀) aux 6 à 5 animaux reçoivent une dose expérimentale unique de l'ordre de 1000 et 1500 mg/kg de chacun des extraits testés contre un groupe témoin (groupe T) a y compris 6 animaux, chacun reçoit un volume de 0.5ml du NaCl 0.9%.

5.1. Observation des manifestations de la toxicité aiguë

Les symptômes de toxicité aiguë ont été portée sur chaque animal dans chaque groupe pendant les 14jrs d'étude, principalement sur la mortalité, et sur des diverses manifestations de toxicité telles la variation du poids, l'alopecie, la salivation, la diarrhée, le sommeil et coma, la Tachypnée ou dyspnée, le tremblement, la convulsion, la léthargie, la consommation alimentaire (anorexie) et la consommation hydrique ou deshydratation (OCDE, 2001;OCDE, 2008).Toute variation du comportement, en plus ou en moins, par rapport à la ligne de base, est considéré comme représentative d'une altération du bien-être de l'animal (OCDE, 2008).En effet, l'ensemble des manifestations observées, pendant le 1^{er} jour d'administration d'extraits, inclue généralement le tremblement, la convulsion et la tachypenieet la léthargie chez certaines souris du groupe AQ₂₀₀₀. Par contre, nous n'avons remarqué rien sur les groupes, T et Met₂₀₀₀durant le 1^{er} jr d'administration .Cependant, la léthargie est le seul signée qui a été observé chez les groupes AQ₁₀₀₀, et Met₁₀₀₀pendant ce 1^{er} jr d'administration. Ensuite, une léthargie légèrea été remarquée avec une disparition complète d'autres symptômes chez les animaux traités, par les trois doses 1000, 1500 et 2000mg/kg de tous les deux extraits, au cours la période d'étude qui dure 14jrs. Aucune différence du comportement général n'est signalée entre les animaux de groupes traités et le groupe T durant toute les 14jrs.

Les convulsions et le tremblement et la tachypnée sont dus probablement à l'atteinte du système nerveux centrale. C'est ce qui est confirmé par notre étude phytochimique sur l'extrait aqueux de *P.tomantosa* qui a révélé la présence des alcaloïdes. Ces molécules sont connus par leurs effets neurologiques, dont les effets sont associés à plusieurs activités telles que l'hypoglycémie, l'hypotension et la dépression respiratoire (Kinghore et Balandrin, 1984; Wink, 1993).

5.2. Suivi de la mortalité

Selon les lignes directrices de l'OCDE (2008), pour la méthode de la détermination de la toxicité aiguë et la DL₅₀ d'une substance testée, la DL₅₀ est supérieure à la dose limite 2000mg/kg si au moins trois animaux survivent après l'administration de cette dose aux 5 animaux séquentiellement. Si un animal meurt de façon inattendue à un moment tardif de l'étude, et si d'autres survivent, il convient d'arrêter le traitement et d'observer tous les animaux. Cependant, le pourcentage de mortalité est alors calculé à partir d'un rapport entre le nombre des animaux meurent et le nombre initial quel renferme le groupe testé.

Le tableau (10) représente le pourcentage de mortalité d'animaux dans les différents groupes après qu'ils reçoivent la dose 1000, 1500 et 2000mg/Kg d'extraits EAQ et Emet de la plante *P. tomentosa* par gavage une seule fois. On n'a pas remarqué que la mort d'un seul animal dans le groupe AQ₂₀₀₀ en 1^{er} jour de gavage et de deux animaux dans le groupe Met₂₀₀₀ plus tard. En revanche, l'absence de la mortalité a été enregistrée chez le groupe témoin T et les groupes qui ont reçu les doses inférieures d'extraits aqueux et méthanolique où tous les animaux survivent. Selon Frank (1992), la substance ou l'extrait testé est légèrement toxique si la valeur de DL₅₀ se situe entre 500 et 5000mg/kg. D'après les résultats de la mortalité engendrée par les extraits de *P. tomentosa*, leur DL₅₀ est supérieure à 2000mg/kg et alors la plante pourrait être légèrement toxique.

Tableau 10. Pourcentage de mortalité dans le différents lots.

Dose (mg/kg)	EAQ			Emet		
	N initial	N mort	M%	N initial	N mort	M%
2000	5	1	20%	5	2	40%
1500	6	0	0 %	6	0	0 %
1000	6	0	0%	6	0	0%

5.3. Variation pondérale

La prise du poids des souris a été effectuée, à jeun, au temps 0 avant l'administration de chacun d'extraits du *P. tomentosa*, comme elle a lieu une fois/jrs après le gavage. La suivie de la variation de la masse corporelle des animaux (tab 11) au cours de la procédure de la toxicité aiguë révèle à nous qu'il y a significativement une augmentation légère de poids par 1 à 3g

dans les lots traités par les différentes doses d'extrait Emet et de 3 à 4g dans les lots traités par les différentes doses d'extrait EAQ tout au long des 14jrs en comparaison au poids initial pris au temps 0.

Tableau 11. Variation de masse corporelle des extraits du *P. tomentosa*. les valeur représenté m ±SD

Temps (jr) Dose (mg/kg)	EAQ		Emet	
	T ₀	T _{14eme jr}	T ₀	T _{14eme jr}
2000	24.4 ±1.5	28.2(+/-2.36)	26.2(+/-1.58)	29.8(+/-2.93)
1500	23(+/-3.73)	26.4(+/-4.8)	27.9(+/-2.25)	28.3(+/-2.07)
1000	27.1(+/-1.83)	30.1(+/-2.3)	32.5(+/-1.31)	33.8(+/-1.16)

L'appétit est souvent considérablement réduit lorsque les animaux souffrent. De plus, une réduction de l'absorption de nourriture et d'eau et, en conséquence, une perte de poids corporel sont utilisées comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques toxiques (OCDE, 2001;OCDE, 2008). Au contraire, les résultats de la suivie de variation pondérale pendant cette étude semble que le poids corporel des animaux a subi une augmentation, ce qui est corrélée à l'absence de l'anorexie ou la perte d'appétit, la deshydratation et la souffrance. Ces résultats nous permettent de dire que les extraits de *P. tomentosa*, en particulier l'EAQ, ne possèdent aucun effet néfaste sur l'état physiologique d'animaux.

5.4. Analyse des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques varient lors de stress, de douleur ou de souffrance liée à la toxicité. Leur variation est liée essentiellement à l'activation ou la suppression de certaines voies métaboliques et leur dosage est alors utile dans le diagnostic de maladies et de la toxicité reflétant ainsi l'activité du foie, de reins et du cœur. Les résultats d'analyses biochimiques effectuées sur le sang prélevé de souris de chacun de groupes, traités par l'extrait EAQ ou l'EMet de *P. tomentosa*, sont représentés sur le tableau11.

Tableau 12. Paramètres séro-biochimique obtenus de differents lot expéremementaux .les valeur representent m±SD. ns: différence non significative

Groupe Témoin (T)		Glycémie	Urée	créatinine	ASAT
		1.2±0.4	0.4±0.3	10.6±2.1	5.9±6.1
Groupes EAQ	2000mg/Kg**	0.4± 0.2	0.3± 0.1	6.6± 1.9	21.2± 0.4
	1500mg/Kg^{ns}	1.0±0.0	0.5±0.1	11.1± 4.9	16.1±5.2

	1000mg/Kg^{ns}	0.9±0.5	0.5±0.2	11.6 ±0.2	12.5±0.6
Groupes Emet	2000mg/Kg^{**}	0.5± 0.2	0.4± 0.3	6.9± 4.2	10.1± 0.2
	1500mg/Kg^{ns}	0.9± 0.1	0.5±0.1	10.8± 3.9	6.6± 0.5
	1000mg/Kg^{ns}	1.5±0.5	0.5±0.1	8.9± 0.7	19.4±0.4

Une étude de la fonction rénale et hépatique peut donc s'avérer utile pour évaluer les effets toxiques des plantes médicinales. Le but de cette analyse est de suivre la variation de quelques paramètres sériques, hépatiques(transaminases), rénales (Créatinine et urée) et la glycémie, après 14jrs d'administration par voie orale de différentes doses d'extraits EAQ et Emet du *P.tomentosa* en comparaison au groupe témoin T et de rechercher d'éventuel effet toxique à travers leur variation.

En comparaison au groupe T, les résultats d'analyse des paramètres biochimiques montrent une diminution significative ($p \leq 0.001$) dans les taux de paramètres rénaux et la glycémie chez les groupes AQ₂₀₀₀ et Met₂₀₀₀. Cependant, l'activité de la transaminase ... nom en entier (AST) semble très élevée trois fois chez les individus de ces deux groupes ($p \leq 0.001$). Par contre, les taux sanguins de la créatinine, de l'urée et de la glycémie ainsi que l'activité enzymatique de la transaminase AST, à dose 1000mg/Kg des deux extraits, semblent statistiquement (ns) similaire avec une très faible variation que ceux enregistrés par le groupe témoin.

L'AST est un enzyme considéré comme un bon indicateur de la fonction hépatique, est un enzyme dont son taux est élevé dans les hépatocytes, toutefois, elle est aussi largement distribué dans le cerveau, les reins, les muscles squelettiques et le myocarde (Sacher et McPherson, 1991). L'augmentation dans son activité enzymatique est un indice d'une toxicité s'accouple au dysfonctionnement probable au niveau de ces organes (Varley *et al.*, 1980). La transaminase sont des enzymes présente dans cytosol des hépatocyte. augmentation peut être prise comme un premier signe de lésions cellulaires qui mène à l'écoulement de l'enzyme dans le sérum (James *et al.*, 2010). Ainsi, l'augmentation significative d'AST suggère fortement que l'administration de *P.tomentosa* altère les hépatocytes (Sacher et McPherson, 1991).

De plus, la diminution des paramètres rénaux tels la créatinine et l'urée peut être attribuée à la richesse des extraits de *P. tomentosa* en tanins. Urée est un déchet azoté résulte de la dégradation de protéine par le foie. L'effet de l'acide tannique peut s'expliquer par une dénaturation des enzyme que dégradé les protéines (Mitjavila *et al.*, 1970 ; Yokozawa *et al.*, 1996). En outre, la réponse à la douleur se traduit par une hypoglycémie transitoire liée à l'activation du système orthosympathique, ce qui peut être dû à la présence des polyphénols,

particulièrement, les flavonoïdes qui présentent des activités hypoglycémiantes (Belmouhoub · *et al.*,2017).

5.5. Etude d'histopathologie

Dans la présente étude de la toxicité aiguë probablement induite par les extraits EAQ et EMet de la plante *P. tomentosa*, l'observation microscopique des préparations histologiques des deux tissus hépatique et rénal a été effectuée sous la supervision et le contrôle de Dr. Mimouni.S., Médecin spécialiste en anatomie pathologique (l'hôpital de gynécologie obstétrique et de pédiatrie -Biskra) et elle a montré que :

Le groupe témoin T: Les coupes hépatiques sont normales avec des hépatocytes séparés par des sinusoides étroites, bien que les coupes rénales de ce groupe témoin montrent des glomérules et des tubules normaux. Une congestion vasculaire est observée dans l'ensemble des prélèvements hépatiques et rénaux (figure 12).

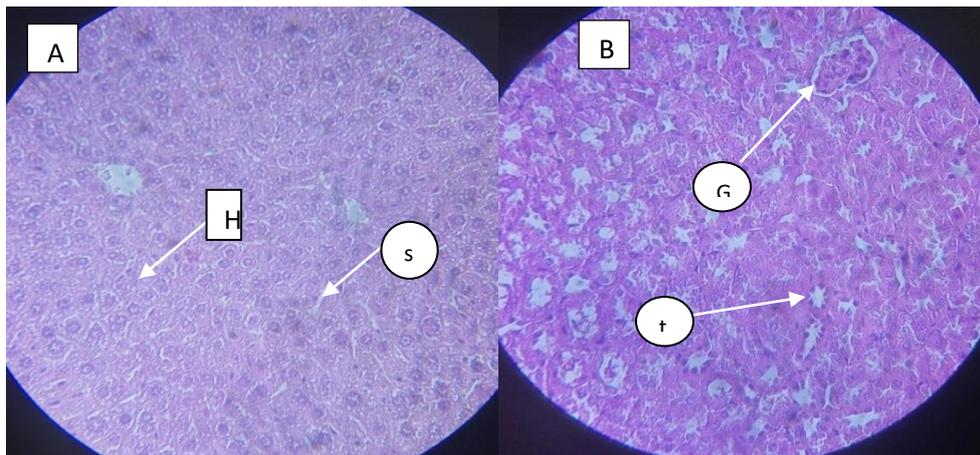


Figure 12. Coupes histologiques à partir du groupe témoin (x40) du Foie (A) et du rein (B). Les coupes représentent une structure cellulaire normale et parenchyme normal. H :morphologie cellulaire normal d'hépatocyte; S: sinusöide; G: Glomérules normaux; T: Tubule normal

Les groupes AQ₂₀₀₀ et groupe Met₂₀₀₀ : les résultats de l'examen d'histopathologie des coupes histologiques réalisées sur le foie (figure 13) présentent, respectivement, des modifications dégénératives plus au moins importantes. En effet, l'architecture du tissu hépatique est partiellement effacée, en présence d'une lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale modérée. Toutefois, les résultats indiquent qu'il n'y a pas encore de mort cellulaire mais une nécrose débutante qui peut mener à long terme à la mort cellulaire. Cependant, les coupes rénales (figure 14) des animaux traités par l'EAQ du *P.tomentosa*

présentent moins des modifications histopathologies que ceux-ci traités par l'EMet où elles sont caractérisées par la présente d'une inflammation discrète, en absence de toutes modifications histopathologies.

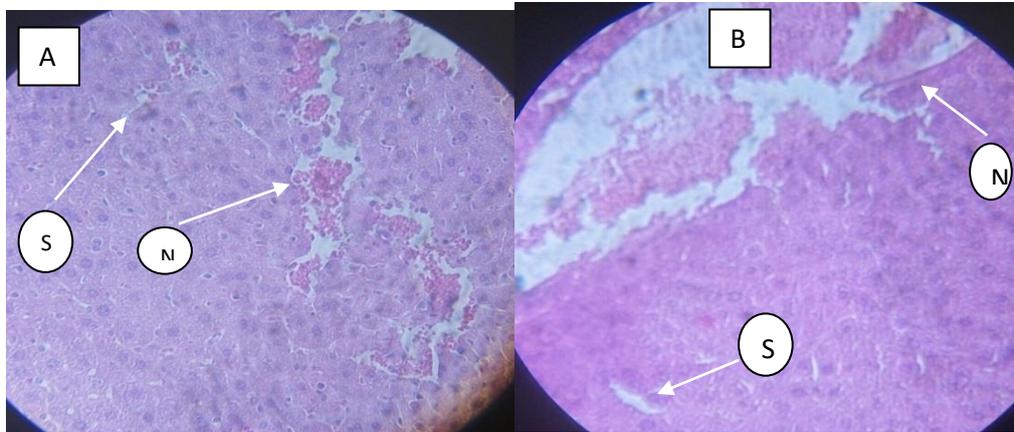


Figure 13. Coupes histologiques hépatiques (x40) des groupes EAQ₂₀₀₀EMet₂₀₀₀.(A)du groupe EAQ₂₀₀₀et (B) du groupe EMet₂₀₀₀. Présence d'une lésion nécrotico-inflammatoire lobulaireet portale. N : nécrotico-inflammatoire;SD :sinusoïdedilatée

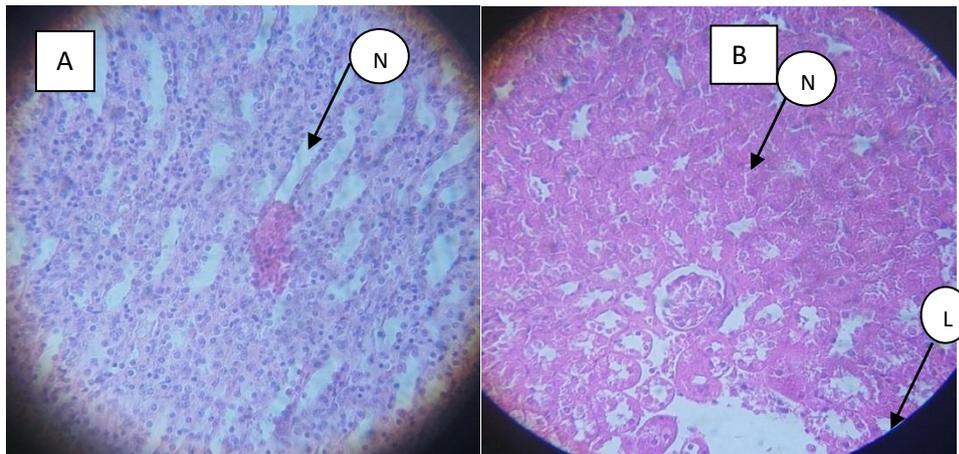


Figure 14.Coupe histologiques rénaux (x40).(A)des groupesEAQ₂₀₀₀ EMet₂₀₀₀. (A)du groupe EAQ₂₀₀₀et (B) du groupe EMet₂₀₀₀. L : lésion tissulaire ;N :nécrose.

Les groupes AQ₁₀₀₀ et groupe Met₁₀₀₀ : les résultats de l'examen d'histopathologies des coupes histologiques réalisées sur le foie (figure 15) présentent, respectivement, des modifications dégénératives plus au moins importantes. En effet, l'architecture du tissu hépatique est partiellement effacée, en présence d'une lésion nécrotico-inflammatoire lobulaireet portale discrète .Toutefois, les résultats indiquent qu'il n'y a pas encore de mort cellulaire mais une nécrose débutante qui peut mener à long terme à la mort cellulaire. Cependant, les coupes rénales(figure 16) des animaux traités par l'EAQ du *P.tomentosa* ne

présentent pas des modifications histopathologies que ceux-ci traités par l'EMet où elles sont caractérisées par la présente d'une inflammation discrète, en absence de toutes modifications histopathologies.

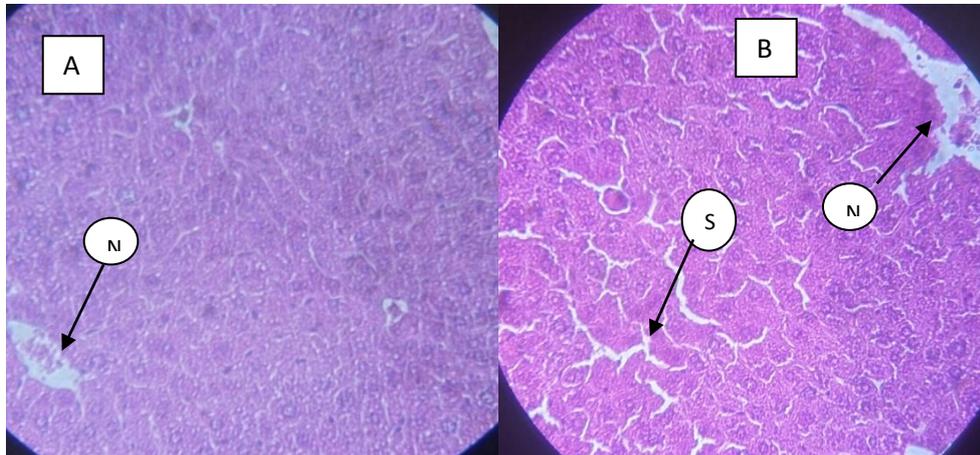


Figure 15.Coupes histologiques hépatiqueS (x40) des groupes EAQ₁₀₀₀ et EMet₁₀₀₀. (A) du groupe EAQ₁₀₀₀. (B) du groupe EMet₁₀₀₀. N : nécrotico-inflammatoire; SD :sinusoïde dilatée

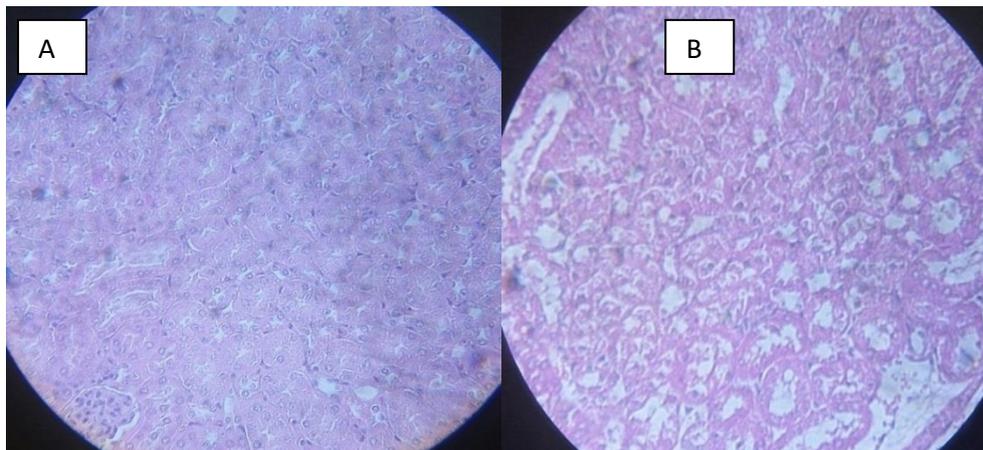
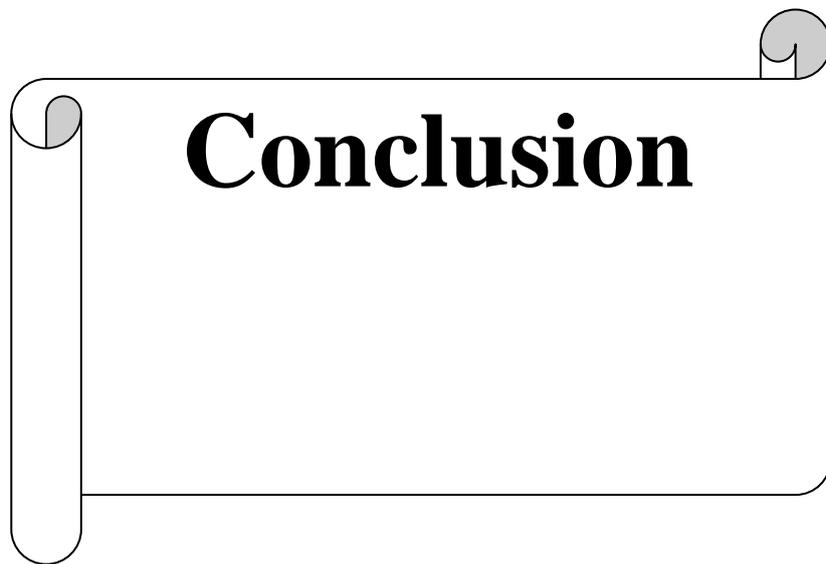


Figure 16.Coupes histologiques rénaux (x40) des groupes EAQ₁₀₀₀ et EMet₁₀₀₀. (A) du groupe EAQ₁₀₀₀. (B) du groupe EMet₁₀₀₀. Les animaux de tous les deux groupes représentent un parenchyme normal en absence de toute d'inflammation.

Ces résultats indiquent que les extraitsEAQ et EMetde la plante *P. tomentosa* pourraient induire un effet dégénératif dose-dépondant sur les tissus hépatiquesbeaucoup plus important que sur les reins. Néanmoins, l'extrait EMet semble le plus toxique, capable d'effectuer légèrement des altérations tissulaire sur le tissu rénal que l'extrait EAQ.



Conclusion

La présente étude a été réalisée pour évaluer les effets toxicité aigus de l'extrait aqueux et méthanolique préparé à partir des parties aériennes de *Pergulariatomantosa L.* L'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de la plante a été étudiée in vitro par différentes méthodes. En outre, le potentiel antioxydant des extraits aqueux et méthanoliques a également été testé in vivo en utilisant des souris *swissAlbino*.

Cette étude a montré que les extraits de *Pergulariatomantosa L.* contenaient des niveaux élevés des composés phénoliques. L'extrait aqueux contenait la plus grande quantité de polyphénol, et de tanins que l'extrait méthanolique, mais les Flavonoïdes présente dans méthanol plus que l'extrait aqueux.

L'étude de toxicité a révélé que l'extrait aqueux et méthanolique de *Pergulariatomantosa L.* causé faible signe de mortalité ou d'autres aucune signes de toxicité. Une étude de toxicité aiguë a suggéré que l'extrait aqueux et méthanolique de la plante est sûr jusqu'à la dose de 2000mg / kg de poids corporel de la souris lorsqu'il est consommé par voie orale. Par conséquent, selon la classification de France (1992), l'extrait aqueux pourrait être considéré comme légèrement toxique. L'extrait aqueux et méthanolique affecté sur les paramètres biochimiques et les hépatique et rénaux.

Les extraits étudiés de *Pergulariatomantosa L.* ont montré une activité antioxydante in vitro. L'extrait méthanolique et aqueux présentait l'activité de piégeage faible par rapport acide gallique et quercetine.

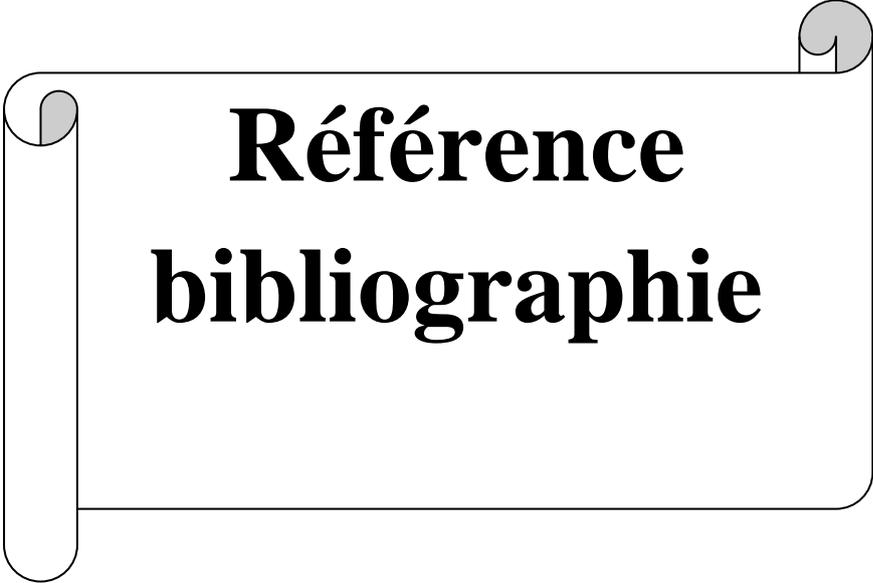
Perspective

D'autres recherches doivent être effectuées pour:

- Identifier les molécules actives pouvant être responsables de l'activité antioxydante ou effets toxiques causés par la plante étudiée.

- Évaluer les molécules bioactives d'importance thérapeutique dans la prévention des maladies induites par le stress oxydatif.

- Etude la toxicité à des doses plus 2000mg/Kg.



**Référence
bibliographie**

Référence Bibliographie

.AB Aliyu, AM Musa, JA Oshanimi, HA Ibrahim, AO Oyewale.2011.Phytochemical analyses and mineral elements composition of some medicinal plants of Northern Nigeria. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences, 7 (1) : 119-125

.Aher, V. D., Wahi, A., Pawdey, A M., Sonawane, A. 2011. Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue *.International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1) : 8-10.

. AHMED M. SALEM, GILANE M. SABRY, HANAA H. AHMED, AHMED A. HUSSEIN³, SOHEIR E. KOTOB. 2013.Amelioration of neuroinflammation and apoptosis characterizing alzheimer's disease by natural products. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5,(2): 87-94.

.Ahsan, H., Ali, A. and Ali, R. 2003. Oxygen free radicals and steautoimmunity.*Clinical and Experimental Immunology*, 131 :398-404.

Alam, A.H.M.K.et al. 2006. Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxydant activities of Rutamontana L. extracts. thèse de doctorat d'état ,UniversitéFerhat Abbas Sétif 1,sétif Algérie,113p.

AL-QURA'N.2005.Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan.*Toxicon*,46(2) :119-129

AL JABRI Sharifa, 2013. Chemical and Bio-analytical Studies on Pergulariatomentosa and Species from the Mentha Genus. Thèsedoctorat.Université de Leicester. 244 p.

Anisuzzaman, A.S.M., Sugimoto, N., Sadik, G. and Gafur, M.A. 2001. Sub-acute toxicity study of 5-hydroxy-2(hydroxy-methyl) 4H-pyran-4- One, isolated from *Aspergillusfumigatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(8) : 1012-1015

AydaKhadhri, IntidharBouali, SamiaBelkhir, RabhiMokded, Samira Smiti,PedroFalé, Maria Eduarda M. Araújo& Maria Luisa M. Serralheiro. 2016. In vitro digestion,antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of Ruta: *Rutachalepensis* and *Rutamontana*, *Pharmaceutical Biology*, DOI: 10.1080/13880209.2016.1230634

BAHORUN, T., GRINIER, B., TROTIN, F., BRUNET, G., PIN, T., LUNCKY, M., VASSEUR, J., CAZIN, M., CAZIN, C., PINKAS, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.

Bonnefont-Rousselot D. and Collin F. 2010. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278: 55-67.

Baki, M.A., Khan, A., Al-Bari, M.A.A., Mosaddik, A., Sadik, G. and Mondal, K.A.M.S.H. 2007. Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxidant activities of *Rutamontana L.* extracts. thèse de doctorat d'état, Université Ferhat Abbas Sétif 1, sétif Algérie, 113p.

Bartosz, G. 2003. Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxidant activities of *Rutamontana L.* extracts. thèse de doctorat d'état, Université Ferhat Abbas Sétif 1, sétif Algérie, 113p.

BEKHEETS.H.M., ABDEL-MOTAAL F.F. ET MAHALEL U.A., 2011. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.

Bismuth. C. et al. 1987. Etude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. thèse magister d'état, Université Ferhat Abbas, Sétif, algérie, 73p. 2015.

BOUHAMDJI A., 2012. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des feuilles de *Pergulariatomentosa L.* de la région d'Adrar. Mémoire master en biochimie appliquée. Université Tlemcen. 56 pp.

Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. 2012. Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium L.* extracts. *Chinese Medicine*, 3; 30-41.

BOUSSAHEL. 2011. Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. mémoire de magister d'état Université Ferhat Abbas, Sétif, p73

Carrée, P., 1953. Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed Ballière, Paris, p.475.

- Ciulel I.** 1982 .Methodology for analysis of vedetable drugs. Ed I.P.A.C.Romania.67p.
- C.K. Hindumathy.**2011. Invitro Study of Antibacterial Activity of CymbopogonCitratuS.World Academy of Science, Engineering and Technology. International Journal of Biotechnology and Bioengineering , 5(2) , 2011
- Dangoggo, S. et al .** 2002. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de Pergulariatomentosa issue de quatre site sahariens différents (Sahara septentrional).thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.
- Dragsted, A., Lang, B.** 1957. Etude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif .thèse magister d'état,Université Ferhat Abbas, Sétif,algèrie,73p. 2015.
- Frank C.L.U.** 1992. Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris pp 73- 202.
- Hadj-salem.** 2009 .screening retrieved no results.Eur J Neurol.16(6):697-704.
- 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 Pergulariatomentosa L. (Asclepiadaceae). International Journal of Pharmacology, 3 : 334–340.
- Hein, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.,** 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry ,13 : 572-584.
- HENEIDAK S., GRAYER R.J., KITE G.C. et SIMMONDS M.S.J.,** 2006-Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae), Biochemical Systematics and Ecology. 34 : 575-584.
- Jacquot J.P., Dietz K.J., Rouhier N., Meux E., Lallement P.A., Selles B. and Hecker A.** 2013. Redox regulation in plants: glutathione and “redoxin” related families. In: Oxidative stress and redox regulation. Springer Science Business Media Dordrecht, pp; 213-291.
- James. T., Mukinda, P., Eagles, F.K.,** 2010. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of Polygala fruticosa in female mice and rats. Journal of Ethnopharmacology ,128 (1) : 236-240.
- Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S.,** 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Food.Chem ,101pp 410–418.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., and Vuorela, H.J. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 :3954-3962.

Kalam, S., Singh, R., Mani, A., Patel, J., Khan, F.N. and Pandey, A. 2012. Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(1) : 18-34.

KEMASSI et al . 2014. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.

Karber, C., Behrens, B. 1935. Wiesind Reihenversuche für biologische Auswertungen am Zweckmässigsten Anzuordnen?. *Arch. Exp. Path. Pharm* ,177 : 379-388.

Ken M. Riedl, Stephane Carando, Helaine M. Alessio, Mark McCarthy, and Ann E. Hagerman. 2002. Antioxidant Activity of Tannins and Tannin-Protein Complexes: Assessment In Vitro and In Vivo. *American Chemical Society*, 14 :188–200

Kinghore, A.D., Balandrin, M.F. 1984. Quinolizidines alkaloids of the leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. *Wiley, New York* : 105-148.

Kirschvink, N., Moffarts, B.d. and Lekeux, P. 2008. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177 : 178-191.

K N'Guessan, B Kadja, G Zirihi, D Traoré, L Aké-Assi. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* ,6.1.

Kunwar, A. and Priyadarsini, K.I. 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences* ,1 (2) :53-60.

Laigneau Jaques . 2000. toxicité aigüe et effet hypoglycémiant de l'extrait éthanolique des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez les rats wister. MÉMOIRE DE MASTER d'état , UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAID, TLEMCEM, 45p.

Litchfield, J.T., Wilcoxon, F.A. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 99-113.

Loomis, T. A. and Hayes, A.W. 1996.Loomis's essentials of toxicology.4th ed., California, Academic press, 208- 245.

Lykkesfeldt, J. and Svendsen, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidativestress in farm animals. *The Veterinary Journal*,173 : 502-511.

MADHU BABU KASIMALA J., MERIH T., TUKUE M.2014. PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TWO COMMON TERRESTRIAL MEDICINAL PLANTS *Rutachalepensis*&*Rumexnervosus*.*Carib.j.SciTech*, 2: 634-641.

Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R. 2009. Oxidative stress and male infertility.*Indian J Med Res*, 129 : 357-367.

M. Belmouhoub , I. Chebout , M. Iguer-ouada.2017 . Antidiabetic and antihypercholesterolemic effects of flavonoid-rich fractions of *Rosmarinusofficinalis* in streptozotocin-induced diabetes in mice.*Phytothérapie* , DOI 10.1007/s10298-017-1103-6.

Miller, L.C., Tainter, M.L.(1944). Estimation of ED50 and its error by means of logarithmic.Probit paper. *ProcSocExp Viol Med* ,57 : 261-264.

MOHAMED KACEM, IMEN KACEM , GAËLLE SIMON , AMIR BEN MANSOUR , SAMIA CHAABOUNI , ABDELFAHAT ELFEKI , MOHAMED BOUAZIZ.2015. Phytochemicals and biological activities of *Rutachalepensis*L.growing in Tunisia*Food Bioscience*, 12: 73–83

N. DOHOU , K. YAMNI , S. TAHROUCH , L.M. IDRISSE HASSANI , A. BADOUC , N. GMIRA.2003. SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE ENDÉMIQUE IBÉRO-MAROCAINE, *THYMELAEA LYTHROIDES*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142 : 61-78

OCDE.2001. Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée. LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES,420

O'Hara, M., Kiefer, D., Farrel, K., Kemper, K. 1998. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch. Fam. Med*, 7 : 523-536.

OULD EL HADJ M.D., HADJ-MAHAMMED M. et ZABEIROU H.2003. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre site sahariens différents (Sahara septentrional).thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie,98p.

OYAIZU, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307–315.

Ozenda, 1991. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.

Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2) : 89-96.

Poole, A. and Leslie, G.B. 1989. A Practical Approach to Toxicological Investigations. 1st Ed. Great Britain. Cambridge University Press 2, 30-117

Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G.J. E. and Komaitis, M. 2006. Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxidant activities of *Rutamontana L.* extracts. thèse de doctorat d'état, Université Ferhat Abbas Sétif 1, sétif Algérie, 113p.

Radak, Z., Zhao, Z., Goto, S., and Koltai, E. 2011. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine*, 32 : 305–315.

Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2) : 219–236.

.RATHEESH M., HELEN A. 2007. Anti-inflammatory activity of *Rutagraveolens L.* in carrageenan induced paw edema in wistar male rats. *African Journal of Biotechnology*, 6 (10): 1209-1211.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 20 : 933-956.

S.Mitjavila G.de Saint-Blanquat R. Derache. 1970. Effect of tannic acid on intestinal absorption in the mouse. Der Einfluss von Gerbsäure auf die intestinale Absorption in der Maus. *Food and Cosmetics Toxicology*, 8(1) : 27-32.

Sacher, R.A., McPherson, R.A., 1991. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test. Pennsylvania, USA, pp. 416–443.

Schneider, C.D., and de Oliveira, A.R. 2004. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte*. 10(4) : 314-318.

Shahidi, F., Janitha, P.K., and Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 32 : 67-103

SHINKAFI S.A. 2013. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.

Shinkafi, SCHMELZER G.H. et GURIB-FAKIM A. 2014. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p

SLINKARD K., SINGLETON V. L. 1977. Total phenol analysis : automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic*, 28(1) : 49-55.

Stadtman, E.R. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol Med*, 10 : 249-253.

Sun. 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem*, 46 (10) : 4267–4274

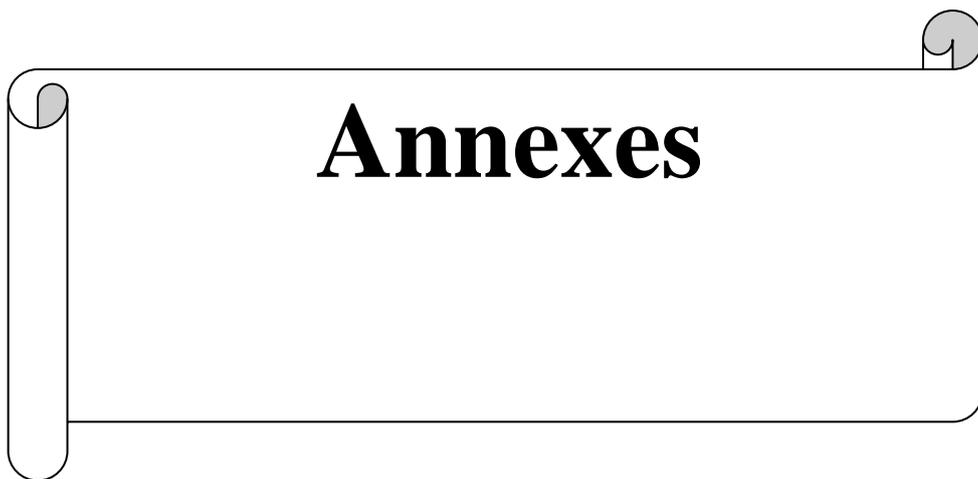
T. Mohammed ,2015. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). thèse de Magister d'état, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, Algérie, 98p.

Takako YOKOZAWA, Hae Young CHUNG, Li Qun HE, Hikokichi OURA. 1996. Effectiveness of Green Tea Tannin on Rats with Chronic Renal Failure, 60 (6) : 1000-1005.

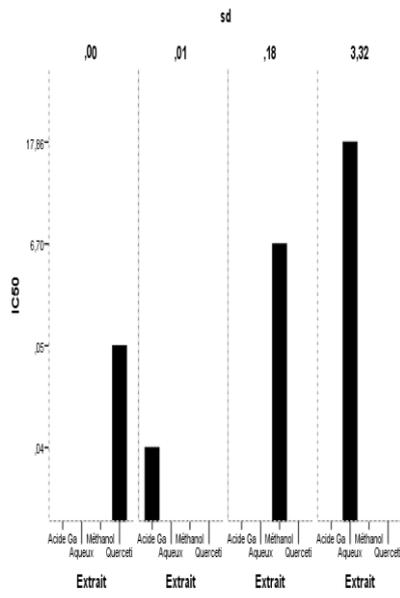
Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12) : 1231–1246.

Varley, H., Gowen Lock, A.H., Bell, M. 1980. Practical Clinical Biochemistry. Heinmann, New York, USA. p. 741.

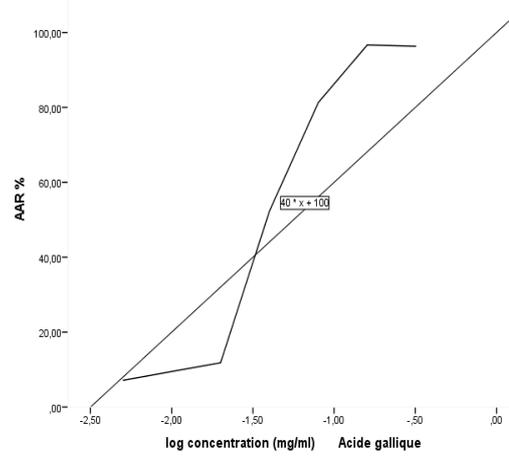
Wang, J., Mazza, G., 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 4183-4189.



Annexes



1



2



3



4

FOIE	2000	1000
T	Normal	Normal
AQP	Lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale modérée	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale discrète
MP	Lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale modérée	lésion nécrotico-inflammatoire lobulaire et portale discrète

Rein	R1	R3
Témoin	Normal	Normal
AQP	Absence d'inflammation	Absence d'inflammation
MP	discrète inflammation	discrète inflammation

الملخص.

لهدف من هذا العمل هو دراسة نشاط مضادات الأكسدة و السمية للمستخلص المائي و الميثانول لنبته P.tomantosa دراسة مضادات الأكسدة للمستخلصين عن طريق تجربة ارجاع DPPH و FRAP. كما قمنا بتحديد كمية كل من البوليفينول الفلافونويد و التانن. بينت النتائج على ان المستخلصين EMet و EAQ لديهما القدرة على ارجاع DPPH و Fe^{3+} . في دراسة السمية قمنا بحقن المستخلصين في الفئران (swissalbino) عن طريق الفم بتركيز مختلفة 1000مغ/كغ و 2000مغ/كغ. من النتائج المتحصل عليها ومن خلال تصنيف 1992, Franc, DI50. في مجال 500-5000مغ/ك (خفيف السمية). كما لاحظنا زيادة في وزن الفئران فتأثير على انسجة الكبد و الكلى و القيم الحيوية للدم.

الكلمات المفتاحية: مضاد الاكسدة , السمية , البوليفينول , الفلافونويد

Résume

L'objectif de cette étude est évaluée l'activité antioxydant et toxicité aigue de l'extrait aqueux (Aq) et méthanolique (Meth) de plant Pergulariatomantosa. l'extrait aqueux est obtenue par décoction et l'extrait hydroalcoolique par macération dans méthanol. l'activité antioxydant a été évaluée en utilisant le test de DPPH et FRAP. Dans le première temps, la teneur de polyphénol totaux a été déterminé par le réactif Folin-Ciocalteu : 22.37 +/- 2.38 et 12.33 +/- 1.46 ($\mu\text{g EAG/mg E}$) dans les extraits aqueux et méthanol respectivement. les Flavonoïdes en été évaluée par la méthode $AlCl_3$. Leur teneur 2.86 +/- 0.43 et 8.44 +/- 0.42 (mg EQ / g E) dans les extraits AQ et Méth respectivement. par ailleurs les deux extraits possède une activité réductrice les radicaux liber et les ion Fe^{3+} . la toxicité aigue de notre extraits sont teste sur les souris sweesalbino male que injectée par voie orale à 2dose (1000 , et 2000 mg/kg) de l'extrait AQ et Méth, le resulta montre que selon le classification Frank 1992. la substance ou l'extrait testé est légèrement toxique si la valeur de DL50 se situe entre 500 et 5000mg/kg., ne remarque pas les signe de l'intoxication , croissance de poids , effet léger sur les paramètre biochimique et tissulaire de foie et rein .

Les Mote clé :Antioxydant , toxicité , Polyphénol et Flavonoïde

Abtract

The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity and auge toxicity of the water(Aq) and methanolic (Meth) extract of the plant Pergulariatomantosa. The aqueous extract is obtained by decoction and the hydroalcoholic extract by maceration in methanol. the antioxidant activity was evaluated using the DPPH and FRAP test. In the first step, the total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu reagent: 22.37 +/- 2.38 and 12.33 +/- 1.46 ($\mu\text{g EAG / mg E}$) in aqueous extracts and methanol, respectively. Flavonoids in summer evaluated by $AlCl_3$ method. Their content 2.86 +/- 0.43 and 8.44 +/- 0.42 (mg EQ / g E) in the extracts AQ and Meth, respectively. Moreover, the two extracts have a reducing activity, free radicals and Fe^{3+} ions. Acute toxicity of our extracts are tested on males albino swee mice that injected orally at 2dose (1000, and 2000 mg / kg) of the extract AQ and Meth, the result showed that according to the classification Frank 1992. the substance or the extract tested is slightly toxic if the LD50 value is between 500 and 5000mg / kg., do not notice the signs of intoxication, weight growth, slight effect on the biochemical and tissue parameters of liver and kidney.

Key Mote: Antioxidant, Toxicity, Polyphenol and Flavonoid