الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif
Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie

جامعة فرحات عباس - سطيف
كلية علوم الطبيعة والحياة

N^{0} ……../SNV/2021

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté par : **Melle REZZAGUI Abir**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie et physiologie expérimentale

THEME :

Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L.

Soutenu publiquement le.../…/2012

Devant le jury

Président :	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Rapporteur :	Dr. DAHAMNA Saliha	M.C. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examinateur :	Pr. KHENNOUF Seddik	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examinateur :	Pr. ARRAR Lekhmici	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.

Année universitaire 2011-2012

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif
Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie

جامعة فرحات عباس - سطيف
كلية علوم الطبيعة والحياة

N^{0} ……../SNV/2021

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté par : **Melle REZZAGUI Abir**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie et physiologie expérimentale

THEME :

Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L.

Soutenu publiquement le.../…/2012

Devant le jury

Président :	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Rapporteur :	Dr. DAHAMNA Saliha	M.C. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examinateur :	Pr. KHENNOUF Seddik	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examinateur :	Pr. ARRAR Lekhmici	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.

Année universitaire 2011-2012

A ma mère Rebiha et à mon père Abdelhafid …

Depuis mes premiers pas à l'école, vous ne vous êtes jamais laissé de me relater l'importance des études. Votre affection et votre amour sans limite m'ont accompagnée tout au long de la réalisation de ce travail. Vos sacrifices consentis m'ont permis d'atteindre cette étape de ma vie.

Que vous trouvez ici l'expression de mon éternelle reconnaissance et qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.

A mon frère Ahmed Kamel Elddine et à ma sœur Foulla …

Vous avoir à mes côtés représente un bonheur pour moi.

Que vous trouvez le témoignage de mon amour et ma profonde admiration et qu'Allah vous protège et vous prête la bonne santé et une longue vie.

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines, à toute la famille REZZAGUI et la famille SAHRAOUI …

En témoignage de mon amour et ma profonde affection.

A ma très chère amie Nahed …

A tous mes amies et mes collègues de la promotion 2009/2010 …

Je dédie ce travail…

Votre fille, sœur, amie….

Abir

Remerciement et Louange à ALLAH, Tout Puissant, Seigneur des Mondes qui m'a accordé la santé, le courage et la force pour la réalisation et la finition de ce travail.

Remerciements

Mes vifs remerciements s'adressent :

A vous, mes professeurs de toujours : mes chers parents, pour votre amour, pour tous vos sacrifices, et pour tous l'enseignement que m'avez transmis ; que dieu vous gardent.

A Mme. SERAÏCHE Née DAHAMNA S. Maitre de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie – Université Ferhat Abbas – Sétif, pour avoir accepté de m'encadrer et pour la confiance qu'elle a voulu m'accorder au cours de la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

A Mr. BAGHAINI A. Professeur à l'université Ferhat Abbas – Sétif, pour son encouragement durant toute notre formation et pour avoir accepté de juger et d'améliorer ce travail et m'honoré par leur présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

A Mr. ARRAR L. Professeur à l'université Ferhat Abbas – Sétif, d'avoir accepté de jurer ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

A Mr. KHENNOUF S. Professeur à l'université Ferhat Abbas – Sétif, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

A Mr. HOUCHER B. Professeur à l'université Ferhat Abbas – Sétif, pour son encouragement et ses conseils si précieux. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

A Melle. MERGHEM M. Doctorante et maitre-assistant à la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour sa précieuse aide et son soutien tant moral que scientifique. Quelle soit remerciée de sa bienveillante attention.

Aux personnels du Laboratoire Central et Laboratoire d'Anatomie-pathologique du CHU de Sétif, pour leur aide concernant la réalisation des coupes histologiques et l'analyse biochimique. Qu'ils trouvent ici mes vifs remerciements.

Aux personnes qui m'ont accompagné tout au long de ses trois années, je pense plus particulièrement à mes collègues et mes amis, pour les moments qu'on a passé ensemble, en particuliers à la promotion 2009/2010. Trouvez ici l'expression de toute ma sympathie.

A tous ceux qui m'ont soutenu d'une manière ou d'une autre le long de ces derniers trois ans, je vous dis merci, et merci du fond de mon cœur.

Résumé

Peganum harmala L. (Nitrariacées), connue également par Harmel, est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter une variété de troubles. La présente étude visait à évaluer l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L. (EBr, EAq, EHx, ECh, EAe, EAq*), ainsi que l'effet toxique, aigu et subaigu, exercé par l'administration orale de l'extrait brut à des souris *Albinos* de la souche *NMRI* des deux sexes.

Les résultats ont montré la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans les graines. Un effet piégeur significatif du radical DPPH et une inhibition de l'oxydation couplée de β-carotène/acide linoléique élevée ($p<0.001$), ont été également signalé, comparativement aux antioxydants standards (acide gallique et BHT). L'étude de la toxicité aiguë a montré que cette plante est faiblement toxique avec une DL_{50} égale à 2.8585g/kg du poids corporel. Cependant, le traitement subaigu pendant quatre semaines avec la dose de 285.8mg/kg a permis d'établir une diminution significative des GR et d'Hémoglobine accompagnée par une augmentation des GB ($p<0.05$). Concernant les paramètres biochimiques, une élévation significative des taux sériques de PAL, de Bilirubine et d'AU a été enregistrée. Les paramètres urinaires ne sont pas influencés par le traitement, à l'exception d'une faible augmentation en glucose urinaire. En outre, l'examen histologique a confirmé les analyses biochimiques, par l'observation de plusieurs anomalies tissulaires au niveau du parenchyme hépatique et rénal. Ensemble, ces résultats suggèrent que, malgré l'effet antioxydant important des graines de *Peganum harmala* L., l'usage prolongé de la plante pourrait être à l'origine de différents anomalies hépatotoxiques et néphrotoxiques.

Mots clés : *Peganum harmala* L., antioxydant, DPPH, β-carotène, alcaloïdes, toxicité aigüe, toxicité subaiguë, DL_{50}, paramètres hématologiques, biochimiques, urinaires et histologiques.

ملخّص

تعتبر نبتة الحرمل (*Peganum harmala* L.) إحدى أهمّ النباتات المستعملـــة في الطب التقليـــدي الجزائري نظرا لفعاليتها في علاج العديد من الأمراض. تهدف هذه الدراســة إلى تقدير النشاطية المضادّة للأكسدة لمختلف مستخلصات بذور الحرمل (EBr, EAq, EHx, ECh, EAe, EAq*)، إضافة إلى معرفة الأثر السّمي الحادّ و شبه الحادّ النّاجم عن معالجة فئران مخبرية بيضاء من كلا الجنسين بالمستخلص الخام.

أظهرت النتـــائج احتواء مختلف المستخلصـــات على كميات معتبرة من المركبـــات الفينـــــــــولية و الفلافنويـدات. علاوة على هذا فقد وضح لنا التقدير الكمي للنشاطية الإزاحية تجاه جذر DPPH و تثبيط الأكسدة المزدوجة للبيتا-كاروتين و حمض اللينولييك نشاطية مضادة للأكســـــــدة معتبرة ($p<0.001$) مقارنة مع مضادات الأكسدة النموذجية (حمض الغاليك وBHT). من جهة أخرى بينت دراسة السمية الحادة للمستخلص الخام أن نبتة الحرمل تندرج في خانة المواد منخفضة السمية، حيث قدرت الجرعة القاتلة ل 50% من الحيوانات المخبرية ب 2.8585غ/كغ. في حين أن المعالجة شبه الحادة بجرعة 285.8مغ/كغ عن طريق الفم و لمدة أربعة أسابيع قد أدت إلى انخفاض في بعض المؤشرات الدموية (الهيموغلوبين و كريات الدم الحمراء) مرفوقا بارتفاع في عدد كريات الدم البيضاء ($p<0.05$).

فيما يخص المؤشرات البيوكيميائية، فقد لوحظ ارتفاع محسوس في معدلات أنزيم الفوسفتاز ألكلين، البيلروبين و حمض البولة، في حين لم تظهر نتائج تحليل البول أي اختلاف في المؤشرات المدروسة ما عدا تغير طفيف في نسبة السكر. أما على المستوى النسيجي، فقد لوحظ حدوث تغيرات كثيرة على مستوى كل من أنسجة الكبد و الكلى مما يؤكد النتائج البيوكيميائية المحصل عليها.

استنادا إلى كل هذه النتائج، فأنه و رغم النشاطية المضادة للأكسدة المعتبرة التي أظهرتها مستخلصات بذور الحرمل، فان استعمال هذه النبتة لفترة طويلة يؤدي إلى العديد من الاختلالات الوظيفية الكبدية أو الكلوية.

الكلمات المفتاح: *Peganum harmala* L.، مضاد للأكسدة، DPPH، بيتا-كاروتين، القلويدات، سمية حادة، شبه حادة، DL_{50}، مؤشرات دموية، بيوكيميائية، بولية و نسيجية.

Summary

Peganum harmala L. (Nitrariacae), commonly known as Harmel, is one of the most important plants used in Algerian phytotherapy to cure a lot of disorders. The present study aimed to evaluate the antioxidant activity of *Peganum harmala* L. seed extracts (BrE, AqE, HxE, ChE, AeE, Aq*E) and the potential acute and sub-acute toxicity of the crud extract orally administered in *Albinos' NMRI* mice of both sexes.

Our results showed that the different seed extracts contains high amounts of polyphenols and flavonoids. Moreover, the evaluation of DPPH scavenger effect and the inhibition of the coupled oxidation of β-carotene/linoleic acid showed a potential antioxidant activity ($p<0.001$) when compared to control (gallic acid and BHT). On the other hand, the assessment of the acute toxicity in mice demonstrated that this plant is lowly toxic with a LD_{50} of 2.8585g/kg of body weight. In the sub-acute study, daily oral administration of crude extract at the dose of 285.8mg/kg for four weeks resulted in a significant decrease in the RBC, and Hemoglobin, which is associated with an increase in the WBC ($p<0.05$). The biochemical analysis showed a significant increase in serum PAL, UA and Bilirubin in treated animals. However, urinary parameters, except a low change in the level of urinary glucose, were not affected by the treatment. Histological analysis confirmed the biochemical analysis by the presence of numerous liver and kidney tissular alterations. Taken together, these results suggest that, in spite the potential antioxidant activity exhibited by *Peganum harmala* L. seeds, the chronic use of this plant may cause several hepatotoxic and nephrotoxic effects.

Key words: *Peganum harmala* L., antioxidant, DPPH, β-carotene, acute toxicity, sub-acute, alkaloids, LD_{50}, hematological, biochemical, urinary and histological parameters.

Sommaire

Introduction 1

Revue bibliographique 3

1. *Peganum harmala* L. 4

1.1. Présentation de la plante 4

1.2. Classification botanique 5

1.3. Etudes phytohimiques 6

1.4. Les alcaloïdes 6

1. 4. 1. Les alcaloïdes de *Peganum harmala* L. 7

1. 4. 2. Activités biologiques des alcaloïdes 8

1.5. Activités pharmacologiques 10

1.6. Donnés toxicologiques 10

2. La toxicité 11

2.1. L'effet toxique 11

2.1.1. Toxicité aiguë 11

2.1.2. Toxicité à terme (subaiguë et chronique) 12

2.2. Devenir d'un toxique dans l'organisme 13

2.3. Manifestation toxique dans l'organisme 14

2.3.1. Le foie 15

2.3.2. Le rein 17

3. Le stress oxydant 18

3.1. Les radicaux libres 19

3.1.1. Qu'est-ce qu'un radical libre ? 19

3.1.2. Sources de production des ERO 20

3.1.3. Paradoxe des ERO 21

3.2. Les antioxydants 22

3.2.1. Les antioxydants endogènes 22

3.2.2. Les antioxydants exogènes 23

Matériels et Méthodes 26

1. Matériels 27

1.1. Matériels biologique 27

1.1.1. La plante 27

1.1.2. Les animaux 27

1.2. Produits chimiques 27

2. Méthodes 28

2.1. Préparation des extraits des graines de *Peganum harmala* L. 28

2.1.1. L'extrait aqueux 28

2.1.2. L'extrait brut 28

2.1.3. Fractionnement de l'extrait brut 29

2.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits 29

2.2.1. Dosage des polyphénols totaux 29

2.2.2. Dosage des flavonoïdes 31

2.3. Évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits 32

2.3.1. Effet piégeur des extraits contre le radical DPPH 32

2.3.2. Test du blanchissement de β-carotène 32

2.4. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L. 33

2.4.1. Évaluation de la toxicité aiguë 33

2.4.2. Toxicité subaiguë 35

2.5. Analyses statistiques 37

Résultats 38

1. Extraction des graines de *Peganum harmala* L. 41

2. Teneur des extraits en polyphénols et en flavonoïdes 42

2.1. Teneur en polyphénols 42

2.2. Teneur en flavonoïdes 43

3. Activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala* L. 44
3.1. Effet piégeur envers le radical DPPH 44
3.2. Test du blanchissement de β-carotène 45
4. Effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala L.* 47
4.1. Toxicité aiguë 47
4.1.1. Observations cliniques et de survie 47
4.1.2. Détermination de la DL_{50} 49
4.2. Toxicité subaiguë 52
4.2.1. Évolution pondérale 52
4.2.2. La masse relative des organes 53
4.2.3. Effet de l'extrait brut sur les paramètres hématologiques 53
4.2.4. Effet sur les paramètres biochimiques 54
4.2.5. Analyses urinaires 55
4.2.6. Examen anatomopathologique 56
Discussions 58
1. Teneur des extraits des graines de *Peganum harmala* L. en polyphénols et en flavonoïdes 61
2. Activité antioxydante des extraits des graines de *Peganum harmala* L. 63
2.1. Effet piégeur envers le radical DPPH 63
2.2. Test du blanchissement de β-carotène 65
3. Effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L. 67
3.1. Toxicité aiguë 67
3.2. Toxicité subaiguë 70
Conclusion et perspectives 76
Références bibliographiques 78

Liste des abréviations

A	Absorbance
AChE	Acétylcholinestérase
ALAT	Alanine Amino-transférase
ANOVA	Analyse des variances
ASAT	Aspartate Amino-transférase
AU	Acide urique
BHT	Hydroxy-toluène Butylène
CAT	Catalase
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
DL	Dose létale
dL	Décilitre
DPPH	2-2-Diphényl-1-picryl-hydrazyl
EAe	Extrait ou fraction d'acétate d'éthyle des graines de *Peganum harmala*
EAq	Extrait aqueux des graines de *Peganum harmala*
EAq*	Extrait ou fraction aqueuse résiduelle des graines de *Peganum harmala*
EBr	Extrait brut des graines de *Peganum harmala*
ECh	Extrait ou fraction du chloroforme des graines de *Peganum harmala*
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EHx	Extrait ou fraction d'hexane des graines de *Peganum harmala*
GB	Globules blancs
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Globules rouges
GS	Graines secs
HSV	Virus d'Herpès simple
IC_{50}	Concentration inhibitrice de 50%
MAO-A	Monoamine oxydase de type A
mg EAG	Milligramme équivalent d'acide gallique
mg EQ	Milligramme équivalent de quercétine
mg ER	Milligramme équivalent de rutine
NADH	Nicotinamide adénine di-nucléotide réduit
PAL	Phosphatase alcaline
PT	Protéines totaux
R^2	Coefficient de corrélation

ERO	Espèces réactives de l'oxygène
SD	Déviation standard
SEM	Erreur standard des moyennes
SOD	Superoxyde dismutase.
TCE	Teneur en composés extractibles (rendement)
TG	Triglycérides
THH	Tétrahydroharmine
TPT	Teneur en polyphénols totaux
UI	Unité internationale
UV	Ultraviolet
VGM	Volume globulaire moyen
VPM	Volume plaquettaire moyen

Liste des figures

Figure 1. Arbuste de *Peganum harmala* L. …….…….…..... 4

Figure 2. Différents parties de l'espèce *Peganum harmala* L.……5

Figure 3. Synthèse des β-carbolines de *Peganum harmala* L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane……... 7

Figure 4. Structure générale des quinazolines des graines de *Peganum harmala* L ……. 8

Figure 5. Le piégeage des ERO par les indoles ……9

Figure 6. Cheminement d'un toxique dans l'organisme……..…..14

Figure 7. Organisation structurale du lobule hépatique ……15

Figure 8. Organisation structurale du néphron rénal ……. 17

Figure 9. Les différentes sources des espèces réactives de l'oxygène……... 21

Figure 10. Mécanismes d'action des antioxydants……... 22

Figure 11. Structure de quelques molécules antioxydantes non enzymatiques……..….24

Figure 12. Le piégeage des ERO par les flavonoïdes ……... 25

Figure 13. Droite d'étalonnage de l'acide gallique…….……...… 30

Figure 14. Droites d'étalonnage de la quercétine et de la rutine…….……...… 31

Figure 15. L'effet piégeur du DPPH par les extraits de *Peganum harmala* L., l'acide gallique et le BHT……..…… 44

Figure 16. L'activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala* L., du BHT et des contrôles négatifs dans le test du blanchissement de β-carotène…… 45

Figure 17. Pourcentage d'inhibition du blanchissement de la β-carotène après 24 heures…….. 46

Figure 18. L'effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L. sur le comportement des animaux……49

Figure 19. Droite exprimant le taux de mortalité dans chaque lot en fonction du logarithme de la dose et l'équation de la droite de régression linaire……. 51

Figure 20. Micrographe des coupes histologiques dans le foie des souris.…….. 57

Figure 21. Micrographe des coupes histologiques dans le rein des souris……... 57

Figure 22. La réduction du radical DPPH…… 64

Listes des tableaux

Tableau 1. Composition chimique des graines de *Peganum harmala* L…… 6

Tableau 2. Activités pharmacologiques des graines de *Peganum harmala* L…….. 10

Tableau 3. Echelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner……..12

Tableau 4. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote……..…….. 20

Tableau 5. Teneur en composé extractible (TCE), ou rendement d'extraction des extraits des graines de *Peganum harmala* L…….…….....41

Tableau 6. Teneur des polyphénols totaux (TPT) dans les différents extraits des graines de *Peganum harmala* L…… 42

Tableau 7. Teneur des flavonoïdes dans les différents extraits de *Peganum harmala* L..... 43

Tableau 8. L'effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L. sur le comportement des animaux et le taux de mortalité…….48

Tableau 9. Transformation en pourcentage du nombre des souris mortes après l'administration d'une prise unique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L…50

Tableau 10. La conversion en unités probits du pourcentage de mortalité et la correction des pourcentages. ……...…..... 50

Tableau 11. L'évolution pondérale des souris des groupes témoin et traité le long de l'expérience……...…….....52

Tableau 12. Les valeurs de la masse relative calculé pour chaque organe……. 53

Tableau 13. La formule numérique sanguine déterminée chez les souris traités et témoins.. 54

Tableau 14. Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques sériques…… 55

Tableau 15. Les résultats de l'analyse urinaire chez les souris traitées et témoins..……..... 55

Introduction

L'histoire de la phytothérapie remonte aux origines de l'humanité. Depuis longtemps, les hommes récoltent les plantes, non seulement pour se nourrir, mais aussi pour soulager leurs maux. Aujourd'hui, et lorsqu'on commence à prendre conscience de nos corps, on rejette certains médicaments modernes à causes de leurs effets secondaires puissants, et on les remplace par la médecine traditionnelle, qui est répondu partout dans le monde, non seulement chez les populations en développement, mais aussi des pays très développés.

Les plantes médicinales forment une source riche d'une variété de composés biologiquement actifs. Ces composés possèdent des activités biologiques diverses, notamment ceux de l'activité antioxydante envers les radicaux libres. Ceci, vient du fait que le stress oxydant est impliqué dans un grand nombre de maladies humaines et que l'idée derrière l'utilisation de plusieurs recettes traditionnelles est non seulement le traitement des maladies, mais encore leur prévention face au vieillissement.

Malheureusement, les plantes parce qu'elles sont naturelles, sont considérées à tort comme non dangereuses, et les gens les utilisent dans des contextes très variés et nombreux. Selon le CAPM (Centre Antipoison Marocain) en 2010, la fréquence des intoxications par les plantes représente 5.1% des cas totaux d'intoxication. En France et en Belgique, elle représente environ 5% des intoxications, en Italie 6,5%, en Suisse 7,2%, en Turquie 6%, et 3.2% selon l'association américaine des centres antipoison (Rhalem *et al.*, 2010).

Les remèdes traditionnels utilisés sont, souvent, un mélange des plantes dont la connaissance et les impératifs de préparation, de dosage et de consommation ne sont pas bien maitrisés. Ainsi les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité (Khattabi *et al.*, 2010).

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

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est de rechercher une éventuelle activité antioxydante à partir des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L., et d'évaluer l'effet toxique provoqué par l'administration orale de l'extrait brut de cette herbe. Pour cela, nous avons fixé les buts suivants :

* La détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala* L.
* L'étude de l'effet piégeur (effet scavenger) des extraits des graines de *Peganum harmala* L. envers le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH).
* L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'oxydation de l'acide linoléique (oxydation lipidique) par le test du blanchissement de β-carotène.
* L'évaluation de l'effet toxique aigu manifesté après une seule prise de l'extrait brut administrée *per os* à des souris *Albinos* de la souche *NMRI* des deux sexes.
* Le calcul de la dose létale 50 (DL_{50}) qui tue 50% de la population animale traitée oralement par l'extrait brut des graines de *Peganum harmala* L.
* L'étude de l'influence du traitement subaigu pendant quatre semaines à des souris femelles sur quelques paramètres hématologiques, biochimiques, urinaires et histologiques hépatiques et rénaux.

Revue bibliographique

1. *Peganum harmala* L.

1.1. Présentation de la plante

Peganum harmala L. est une plante herbacée glabre et pluriannuelle qui peut atteindre 70cm d'hauteur. Elle est caractérisée par des tiges très rameuses et des feuilles divisées en étroites lanières **(Figure 1 et 2).** Cette espèce a plusieurs noms vernaculaires comme '*Harmel* ou *Harmal El sahari'* en Algérie et en Afrique du Nord, '*Rue sauvage'* en France, '*African rue* ou *Syrian rue'* en Etats Unis et '*Espand'* en Iran. Il s'agit d'une espèce qui pousse spontanément dans les régions steppiques et semi-arides. Elle est native à l'Afrique du Nord, la région méditerranéenne, le Moyen Orient, l'Inde et Pakistan **(**Yousefi *et al.,* 2009).

Figure 1. Arbuste de *Peganum harmala* L. (Faculty.ksu.edu.sa, 2012)

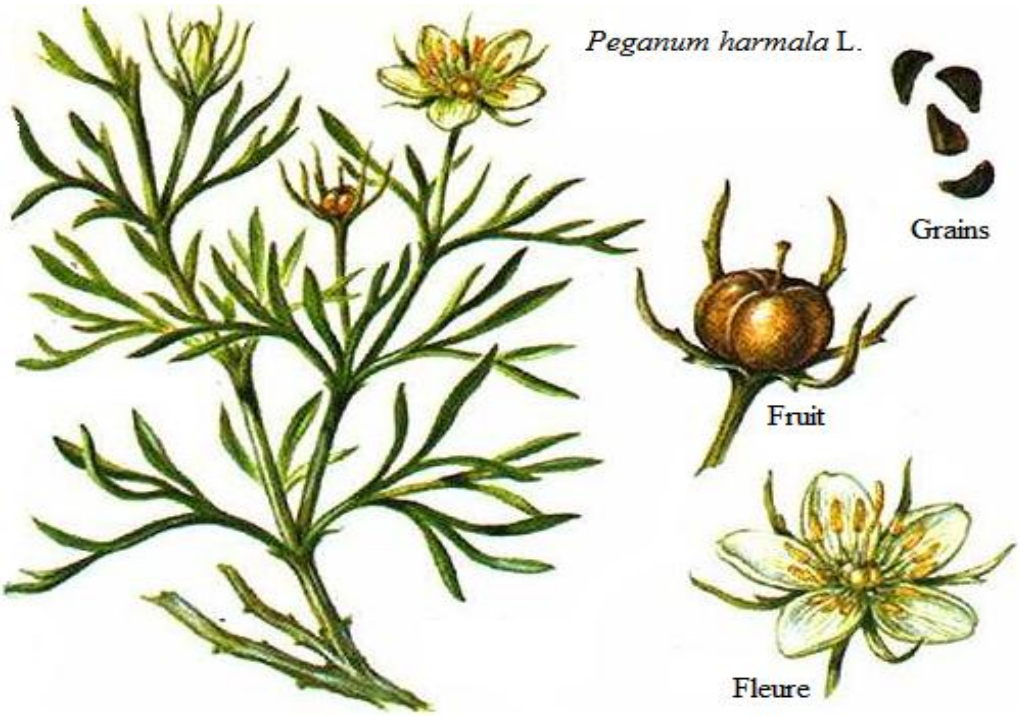

Figure 2. Différents parties de l'espèce *Peganum harmala* L. (Healthyhomegardening.com, 2012).

1.2. Classification botanique

(The Angiosperm Phylogeny Group, 2009 ; Moghadam *et al.*, 2010).

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Malvides
Ordre	Sapindales
Famille	Nitrariacées
Genre	*Peganum*
Espèce	*Peganum harmala* L.

1.3. Etudes phytohimiques

Différentes classes de métabolites secondaires ont été mis en évidence dans les graines de *Peganum harmala* L., dont les alcaloïdes sont les plus importants. Ces métabolites secondaires sont consignés dans le **tableau 1.**

Tableau 1. Composition chimique des graines de *Peganum harmala* L.

Métabolites secondaires	Composition %	Molécules identifiées	Références
Alcaloïdes	5 à 10%	β-carbolines Quinazolines	(Kartal *et al.*, 2003) (Khashimov *et al.*, 1969 ; Zharekeev *et al.*, 1974)
Polyphénols	4.6%	Flavonoïdes, Quinones Tanins, Coumarines	(El Allagui *et al.*, 2006 ; Baghiani *et al.*, 2012)
Saponines	ND	NI	(Farouk *et al.*, 2009 ; El Allagui *et al.*, 2006)
Huiles fixes	15.86%	Acide linoléique, acide linolénique, palmitique, melissique, β-sitosterol, etc. Terpènes et stérols	(Kurachko *et al.*, 1969 ; Agedilova *et al.*, 2006) (Farouk *et al.*, 2009)
Caroténoïdes	0.7%	α-carotène, σ-carotène β-carotène	(Kurachko *et al.*, 1969) (Asilbekova, 2006)

NI : non déterminé ; **NI** : non identifié.

1.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale dont le rôle dans le métabolisme est mal compris, ou d'origine animale où ils peuvent agir comme des neurotransmetteurs dans le système nerveux central (SNC) ou périphérique (SNP) comme la sérotonine et la dopamine (Brielemann *et al.*, 2006).

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés en médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine), anesthésiques (atropine), ou comme agents anticancéreux (taxol, vinblastine).

1. 4. 1. Les alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

L'espèce *Peganum harmala* est très riche en alcaloïdes indoliques (dérivés de l'acide aminé Tryptophane) de type β-carboliniques (**Figure 3**). Les plus importants sont l'Harmaline, l'Harmane, l'Harmine et le Tetrahydroxyharmine (THH) (Kartal *et al.*, 2003).

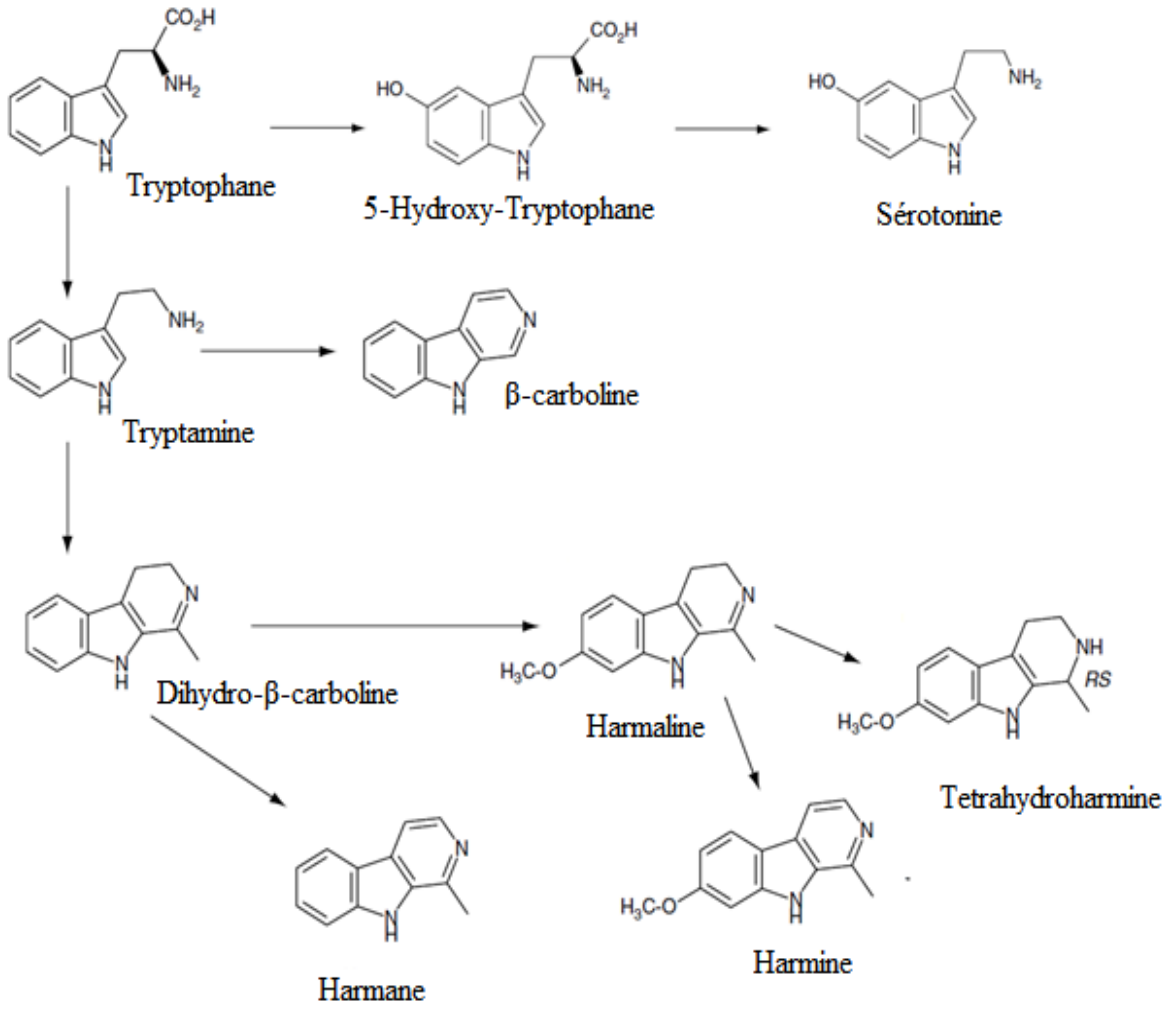

Figure 3. Synthèse des β-carbolines de *Peganum harmala* L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane. (Aniszewski, 2007).

Les graines de *Peganum harmala* contiennent également une autre classe d'alcaloïdes, les quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique et qui sont représentés par la Péganine, le Vasicinone **(Figure 4),** et la Desoxypéganine (Khashimov *et al.,* 1969 ; Zharekeev *et al.*, 1974).

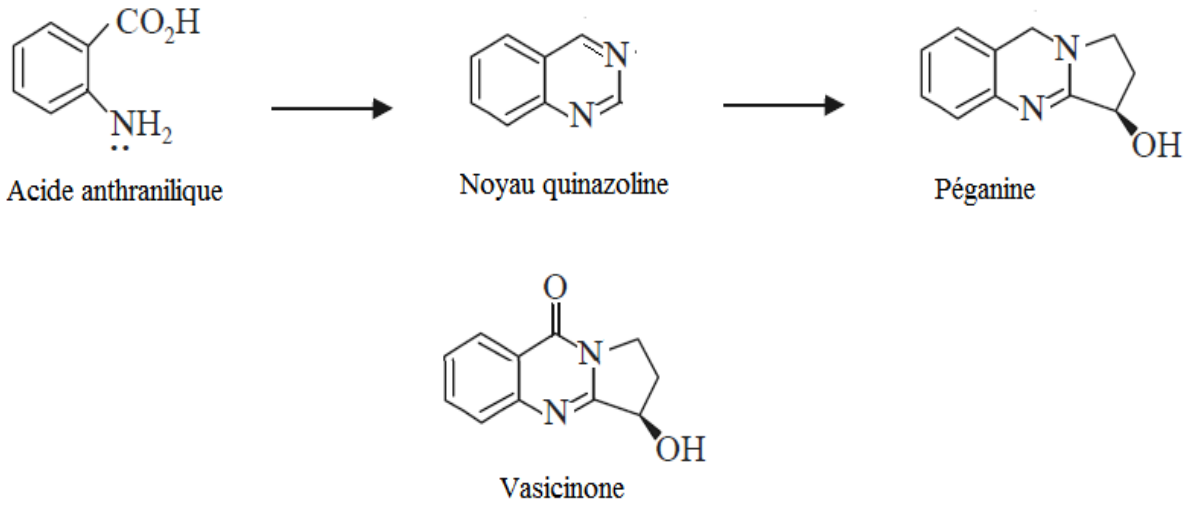

Figure 4. Structure générale des quinazolines de *Peganum harmala* L. (Aniszewski, 2007).

1. 4. 2. Activités biologiques des alcaloïdes

a) Activité neuropharmacologique

Les β-carbolines sont très connus par leurs effets neuropharmacologiques et toxicologiques. L'Harmine, l'Harmaline et le THH sont des agents analgésiques, antidépressifs, narcotiques et hallucinogènes très puissants, d'une part par la désactivation des Monoamines Oxydases de type A (MAO-A) responsables de la dégradation et de la régulation du taux de la sérotonine et des catécholamines dans les tissus (Kim *et al.,* 1997 ; Herraiz *et al.,* 2010), et d'autre part par l'inhibition de la recapture de la sérotonine par les neurones pré-synaptiques (Frison *et al.,* 2008). Egalement, les alcaloïdes β-carboliniques de *Peganum harmala* peuvent agir comme des agonistes des récepteurs de la sérotonine et de la dopamine (Glennon *et al.,* 2000).

Concernant les alcaloïdes quinaziloniques, la Péganine et la Désoxypéganine peuvent avoir un pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, conduisant donc à l'arrêt de l'influx nerveux dans les neurones cholinergiques (Tuliaganov *et al.,* 1986). Ces alcaloïdes agissent également comme des agents abortifs et broncho-dilatateurs (Aniszewski, 2007).

b) Activité cytotoxique

L'action des alcaloïdes β-carboliniques n'est pas restreinte aux effets neuropharmacologiques, ils peuvent aussi avoir une action cytotoxique en intercalant entre les bases azotées de l'ADN ce qui mène donc à l'inhibition d'ADN Topoisomèrase I, et par conséquent, l'inhibition de la réplication de l'ADN et la division cellulaire (Sobhani *et al.,* 2002 ; Nafisi *et al.,* 2010).

c) Activité antioxydante

De nombreuses études ont signalé l'activité antioxydante exercée par les alcaloïdes β-carboliniques (Tse *et al.,* 1991 ; Crespo *et al.,* 2002 ; Moura *et al.,* 2007). Une activité basée sur l'effet piégeur des radicaux libres par le noyau indolique en produisant un radical indolyl stable **(Figure 5).**

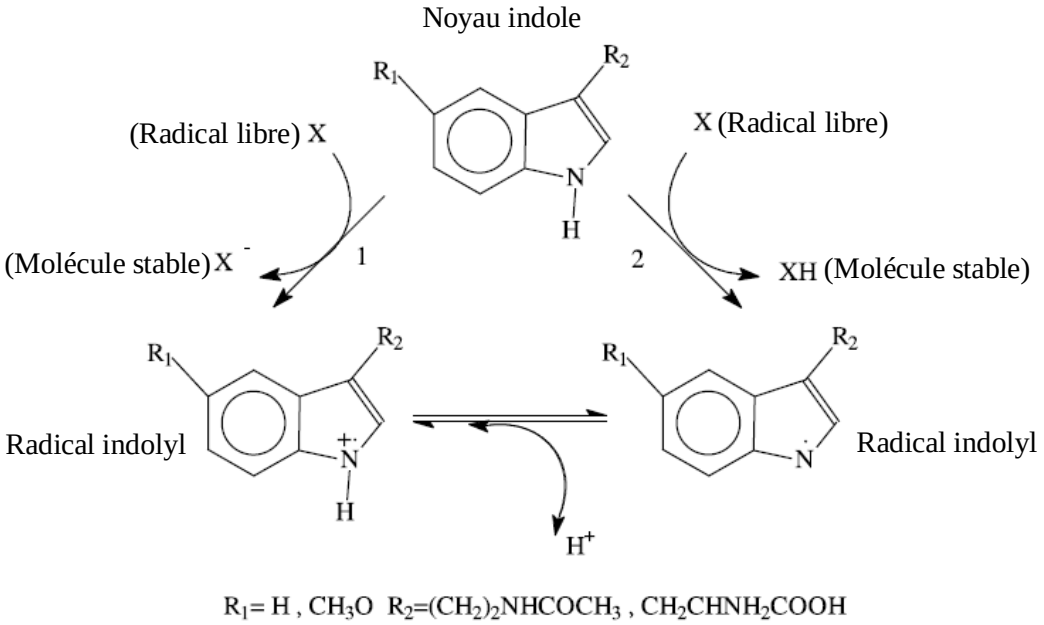

Figure 5. Le piégeage des ERO par les indoles (Crespo *et al.,* 2002).

1.5. Activités pharmacologiques

Les graines de *Peganum harmala* ont fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence des activités variées **(Tableau 2).** La majorité d'entre elles sont concernées surtout des effets cytotoxiques, anti-nociceptifs et antimicrobiens.

Tableau 2. Activités pharmacologiques des graines de *Peganum harmala* L.

Activités	Références
Analgésique	(Farouk *et al.*, 2008)
Anti-nociceptive	(Monsef *et al.*, 2004 ; Farouk *et al*., 2009)
Hypoglycémiante	(Singh *et al.*, 2008)
Antifongique	(Nenaah, 2010)
Antibactérienne	(Arshad *et al.*, 2008 ; Moghadam *et al.*,2010 ; Nenaah, 2010) (Darabpour *et al*., 2011)
Antivirale (HSV)	(Kiani *et al.*, 2010)
Antiparasitaire	(Yousefi *et al.*, 2009 ; Rahimi-Moghaddam *et al.*, 2011)
Cytotoxique	(Lamchouri *et al*., 2000 ; Sobhani *et al.*, 2002 ; Nafisi *et al.*, 2010)
Antioxydante	(Baghiani *et al.*, 2012)
Vaso-relaxante	(Shi *et al.*, 2001; Berrougui *et al.*, 2006)

1.6. Donnés toxicologiques

Malgré les nombreux rapports d'intoxication humaine et animale enregistrés suite à l'ingestion de *Peganum harmala,* cette plante a été largement utilisée en médecine traditionnelle, en tant qu'agent abortif, emménagogue, narcotique, antihelminthique, antispasmodique, et dans certains cas des rhumatismes, d'asthme et du cancer (Duke, 2002).

Les alcaloïdes de *Peganum harmala* sont doués de propriétés toxiques. Ils provoquent des problèmes d'empoisonnement chez l'homme ainsi que chez les animaux, notamment les chameaux et les brebis, qui mangent cette plante en grande quantité comme un fourrage dans

les périodes de sécheresse. Les alcaloïdes peuvent provoquer une hypothermie permanente, des troubles respiratoires, des vomissements, des maux de ventre, des hallucinations et des convulsions (Mahmoudian *et al.*, 2002 ; Frison *et al.*, 2008), en inhibant la MAO-A et l'AChE (Tuliaganov *et al.*, 1986 ; Kim *et al.*, 1997). Dans la plus part des cas, les animaux intoxiqués meurent, généralement, 36-38 heures après l'apparition des premiers signes d'intoxication du SNC et SNP.

2. La toxicité

2.1. L'effet toxique

Selon la fréquence et la durée de l'exposition ou l'administration du toxique, on peut distinguer plusieurs formes de toxicité : la toxicité aiguë et la toxicité à terme : subaiguë et chronique.

2.1.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë englobe tous les phénomènes spécifiques et les signes adverses, qui se manifestent juste après l'exposition de l'organisme à une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un agent chimique. L'effet toxique aigu est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (LeBlanc, 2010).

La dose létale 50 (DL_{50}) : Une façon pratique de caractériser et classer la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa DL_{50}. Celle-ci désigne la dose d'une substance qui peut causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (Lapointe, 2004). De ce fait, la mesure de la DL_{50} peut établir un classement pour ces substances : plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxiques, et l'inverse est juste (**Tableau 3**).

Tableau 3. Échelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner (Frank, 1992).

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

Cependant, la DL_{50} a une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement, etc. (Lapointe, 2004).

2.1.2. Toxicité à terme (subaiguë et chronique)

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler irréversibles (exemple : Neurotoxicité de l'hexane). L'évaluation de la toxicité aiguë d'une substance ne permet pas de prédire ce type de toxicité. Des études destinées à évaluer la toxicité subaiguë et chronique doivent donc être effectuées (Reichl, 2004).

La toxicité subaiguë est due à l'exposition répétée à une dose du toxique, qui ne cause aucune toxicité aiguë évidente, pendant une période assez prolongée mais à condition de ne pas constituer une partie significative de la vie de l'espèce examinée. Dans les essais de la toxicité

subaiguë, l'administration orale pendant 28 ou 90 jours chez le rat (ou bien la souris) ou le chien, respectivement, serait typique (Hodgson et Cunny, 2010).

Le terme chronique est utilisé pour décrire l'ensemble des effets cumulatifs, beaucoup plus insidieux et irréversibles, apparus après une longue période d'exposition ou d'administration de très faibles doses de l'agent chimique en question (Hodgson et Cunny, 2010). Ces doses sont assez petites qu'aucun effet aigu n'est manifesté, alors que la durée de l'administration forme une partie significative de vie de l'espèce mis en expérience (généralement 90 jours chez le rat et la souris).

2.2. Devenir d'un toxique dans l'organisme

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

La toxicocinétique s'intéresse à l'influence qu'exerce l'organisme sur un toxique. Cette influence découle des processus conduisant à la formation des métabolites et qui gouvernent le cheminement du toxique dans l'organisme (l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'élimination) **(Figure 6)**. Autrement, la toxicodynamie s'intéresse à l'influence qu'exerce un toxique sur l'organisme et aux facteurs qui interviennent dans la réponse toxique (Lapointe, 2004). Ce n'est qu'après cette phase que nous pourrons observer les effets toxiques d'une substance.

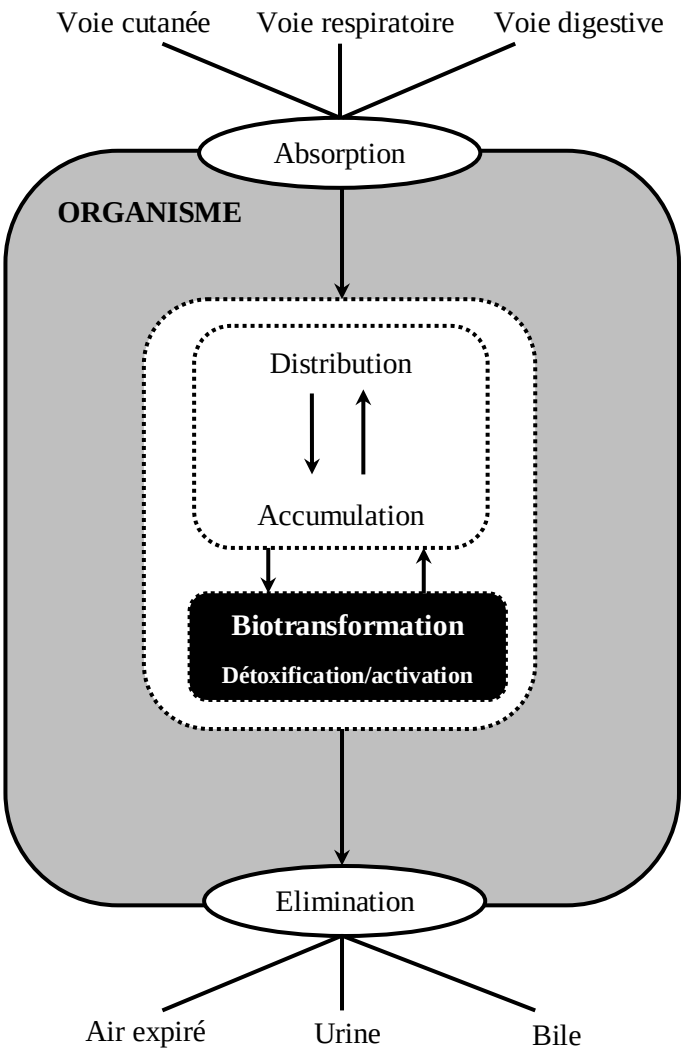

Figure 6. Cheminement d'un toxique dans l'organisme (Lapointe, 2004).

2.3. Manifestation toxique dans l'organisme

L'expression des effets toxiques ou la manifestation toxique peut être très différente dans l'organisme vivant. Ces réponses toxiques ont été classées en catégorie comme suit :

1) Action toxique directe : les lésions tissulaires, 2) Effets physiologiques et biochimiques, 3) Tératogenèse, 4) Immunotoxicité, 5) Mutagénèse et 6) Carcinogenèse (Timbrell, 2000).

Les toxiques ne produisent pas des effets avec la même intensité sur tous les organes. Celui-ci dépond de nombreux facteurs, y compris l'importance de l'organe et la quantité des substances toxiques et/ou des métabolites réactifs qu'il contient. Des organes tels que le rein

et le foie sont bien approvisionnés avec le sang et sont métaboliquement actifs, parce qu'ils ont un rôle important dans la biotransformation et l'excrétion des toxiques. Ces organes sont appelés organes cibles puisqu'ils sont plus vulnérables et plus exposés aux toxiques que les organes ou les tissus mal irrigués ou métaboliquement moins actifs tels que la peau et l'os **(**Timbrell, 2000 ; Lapointe, 2004).

2.3.1. Le foie

Le foie est un organe vital, tout comme le cœur et les poumons. Il est souvent l'organe cible chez les animaux d'expérience (Rhiouani *et al*., 2008), car il remplit de multiples fonctions et son rôle est très important dans le maintien de l'équilibre général. Il participe à la digestion, à l'emmagasinage des aliments ainsi qu'à la détoxication (en aidant l'organisme à se débarrasser de ses poisons) et à l'élimination *via* les canalicules biliaires (Gérolani, 2005).

a) Structure générale du parenchyme hépatique

De point de vue histologique, le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoïdes **(Figure 7).** L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique qui est entouré d'espaces portes, où sont groupées les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires (Wallace et Meyer, 2010).

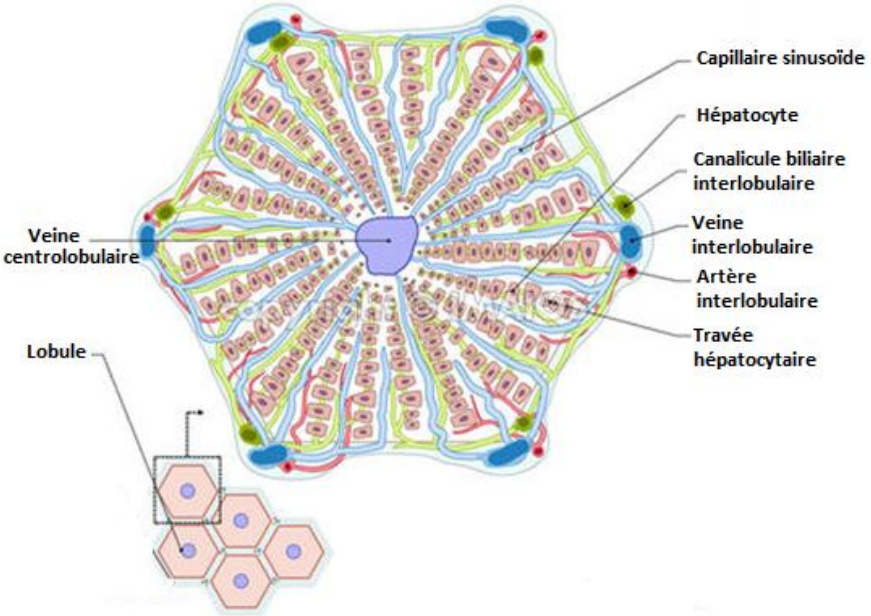

Figure 7. Organisation structurale du lobule hépatique (Wallace et Meyer, 2010**).**

b) Rôle du foie dans le métabolisme des toxiques

Le foie a un rôle majeur dans la biotransformation de toutes les substances circulant dans le sang, y compris les toxiques. A ce niveau, les toxiques peuvent être neutralisés ou activés en subissant deux types de réactions : les réactions de la phase I et les réactions de la phase II (Hodgson et Rose, 2010).

- Réactions de la phase I (Fonctionnalisation)

  Dans cette phase, des groupements fonctionnels (OH, NH, COOH) sont ajoutés à la molécule de toxique, la rendre un substrat approprié pour les enzymes de la phase II. Les principales enzymes de cette phase sont les cytochromes P_{450}, les oxydases, les peroxydases, les glucosidases etc.

- Réactions de la phase II (Conjugaison)

  A ce niveau, les produits de la première phase subissent des réactions de conjugaison avec d'autres molécules endogènes (acides aminés, sucres, glutathion et sulfate). Les produits conjugués sont généralement, plus polaires, moins toxiques et plus aisément éliminables que les molécules mères ; c'est la détoxification. Dans quelques exceptions, les métabolites deviennent plus toxiques et réactifs que les molécules mères ; on dit que les molécules mères sont activées.

c) Différents types d'hépatotoxicité

L'ensemble des atteintes toxiques généralement figurés au niveau hépatique sont regroupés sous le mot l'hépatotoxicité. Ces atteints dépend fréquemment de la nature du toxique, la sévérité de l'intoxication, et ainsi du type d'exposition (aiguë ou chronique) : Stéatose, les Hépatites aigus (Nécrose, Fibrose, Cytolyse, Choléstase), les Hépatites chroniques (Cirrhose), ainsi que les dommages vasculaires, biliaires et tumorales (Wallace et Meyer, 2010).

2.3.2. Le rein

De même que pour le foie, le rein est un organe important dans le cheminement des substances toxiques. Sa fonction majeure consiste à filtrer le sang, en dégageant toute substance nocive et en conservant les molécules essentielles (Reichl, 2004).

a) Unité structurale du rein ; le néphron

Microscopiquement **(Figure 8)**, chaque rein est constitué d'un complexe des unités fonctionnelles appelées néphrons (Lacarelle et Viala, 2005). Ceux-ci sont composés des glomérules (petits réseaux de vaisseaux sanguins) et des tubules (subdivisé en tubule proximal, l'anse d'Henlé, le tubule distal) et finalement le tube collecteur.

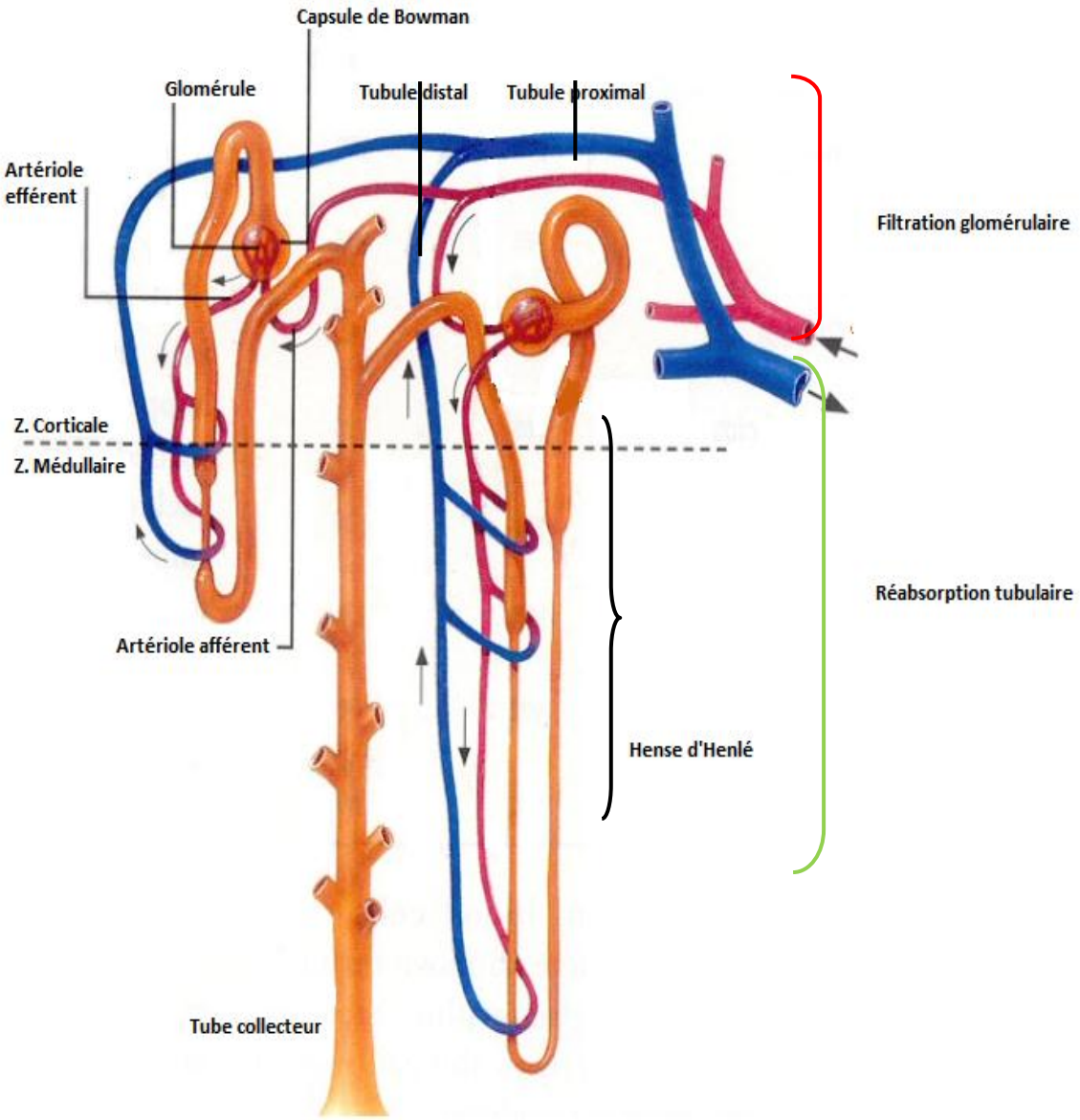

Figure 8. Organisation structurale du néphron rénal (Tarloff et Wallace, 2010).

b) Le rein et l'élimination des toxiques

La filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire (98% des électrolytes et d'eau et virtuellement, 100% du glucose et d'acides aminés filtrés par les glomérules) sont les principales étapes de la formation de l'urine **(Figure 8).** Cependant, le rein exerce plusieurs d'autres fonctions vitales (régulation de la pression sanguine et du volume extracellulaire, le maintien de la balance acido-basique et électrolytique) qui sont intimement liés à son rôle dans le maintien de l'homéostasie intérieure, permettant de protéger les cellules *vis-à-vis* des conséquences des variations environnementales de l'organisme (Tarloff et Wallace, 2010).

c) Différents types de la néphrotoxicité

Les toxiques peuvent affecter toutes les parties du néphron notamment le système tubulaires où se concentre la plus grande partie des toxiques portée par la circulation sanguine. Il en résulte de nombreux troubles connus sous le nom de néphrotoxicités (Lacarelle et Viala, 2005). Ces atteintes néphrotoxiques commencent des changements biochimiques simples au niveau des glomérules ou des tubules (dysfonctionnement rénal minimal) jusqu'à la mort cellulaires (insuffisance rénale) (Bhadauria et Agrawal, 2012).

3. Le stress oxydant

Le stress oxydant est responsable des dommages cellulaires liés à plusieurs maladies tel que le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'influenza, le syndrome de Down, les hépatites, l'arthrite rhumatoïdes, les désordres du système nerveux, l'ulcère, la pneumonie ainsi que le vieillissement**.** Il réfère à une rupture dans la balance oxydant/antioxydant cellulaire durant laquelle, la génération des oxydants est parfaitement maitrisé par les systèmes de défense antioxydants, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Pandey et Rizvi, 2011). Cette rupture peut être due soit à la

surproduction des radicaux libres (oxydants) et/ou par un déficit en antioxydants (Alexandrova et Bochev, 2007).

3.1. Les radicaux libres

L'oxygène est un élément indispensable à la vie de tous les organismes aérobies, parce qu'il permet de produire la majorité de l'énergie chimique en oxydant les substances organiques dans leurs mitochondrie. Cependant, l'oxygène peut être une source d'agression pour ces organismes qui convertissent une partie de cet élément en métabolites hautement réactifs : les radicaux libres, qui peuvent être d'origine endogène ou encore exogène (Pandey et Rizvi, 2011 ; Kalam *et al.*, 2012).

3.1.1. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les radicaux libres sont des atomes, molécules ou des partis de molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbite extrême tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), et le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) (Wu et Cederbaum, 2003). Du fait de leur instabilité chimique, les radicaux libres ont une tendance à revenir vers un état plus stable en donnant un électron ou en prenant un autre à partir d'une autre molécule. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour des radicaux libres et initient ainsi une chaîne de réaction (Lev *et al*., 2007).

Par ailleurs, il existe d'autres dérivées oxygénés réactives dont leur toxicité est très importante tel que l'oxygène singlet, l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, et le peroxynitrite, qui ne sont pas des radicaux libres **(Tableau 4)**, mais peuvent être des précurseurs des radicaux. De point de vue terminologique, l'ensemble des radicaux libres et des espèces réactives non radicalaires est souvent connue sous le nom des espèces réactives de l'oxygène ou ERO (Lev *et al*., 2007).

Tableau 4. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Valko *et al.*, 2007).

Radicaux libres	Non radicaux libres
Superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	Oxygène singulet ($^1O_2$)
Radical Hydroxyle ($OH^{\bullet}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$)	Ozone (O_3)
Dioxyde d'azote ($NO_2^{\bullet}$)	Acide hypochloreux (HOCl)
Peroxyle, alkoxyle ($ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Peroxyle lipidique ($LOO^{\bullet}$)	Peroxide lipidique (LOOH)

3.1.2. Sources de production des ERO

Les ERO peuvent apparaître ou se former suite à des facteurs exogènes ou endogènes **(Figure 9).** Le métabolisme aérobique de chaque cellule produit d'une façon permanente des ERO. Ils sont principalement des sous-produits de la chaine respiratoire mitochondriale, qui constitue la source endogène majeure de cette production (Wu et Cederbaum, 2003).

Les ERO, notamment l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, sont aussi produites au cours des différentes réactions enzymatiques catalysées par le NADH oxydases, xanthine oxydase, cytochrome P_{450} et les peroxydases (Drögue, 2002). En présence des métaux de transition (ions du fer et de cuivre), les peroxydes d'hydrogène sont convertis en radicaux hydroxyles très réactives par la réaction de Fenton**.** La production exogène des ERO peut résulter aussi suite à l'exposition, aux rayons ionisants (UV, visible, gamma, X), aux métaux de transition, à l'oxygène en quantité excessive et à certains médicaments **(**Kalam *et al.*, 2012).

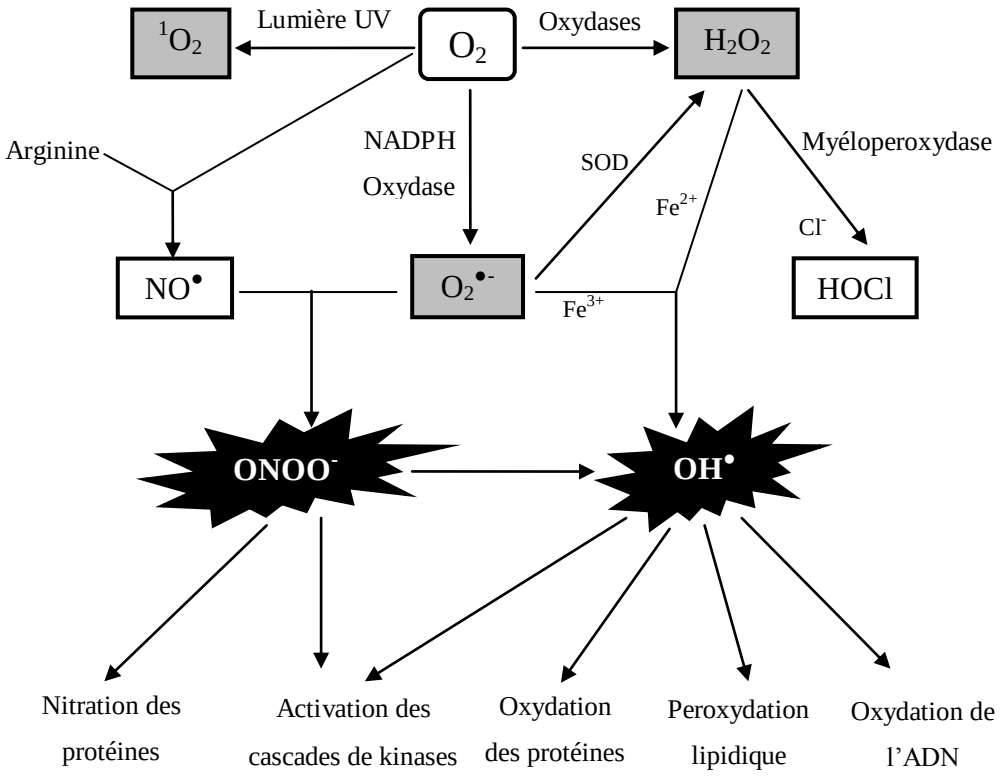

Figure 9. Les différentes sources des ERO (Favier, 2003).

3.1.3. Paradoxe des ERO

Dans les conditions physiologiques, les ERO sont produites en permanence dans l'organisme et à des faibles concentrations. Ils ont des rôles physiologiques très importants au sein des cellules en agissant sur le fonctionnement de certaines enzymes, la transduction de signaux cellulaires, la défense immunitaire, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la régulation de la dilatation capillaire, et sur la régulation des gènes (Favier, 2003). Cependant, la rupture de l'équilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production des ERO entraine des lésions biochimiques au niveau cellulaire du fait de leurs effets sur le plan moléculaire. Parmi ces effets, on peut citer l'altération des protéines, l'apparition de cassures au niveau d'ADN, ou des atteintes des membranes cellulaires par l'induction de ce qu'on appelle la peroxydation lipidique (Alexandrova et Bochev, 2007).

3.2. Les antioxydants

On désigne par antioxydant toute substance, qui lorsqu'elle est présente en faible concentration dans la cellule, est capable de retarder, de neutraliser ou de réduire l'oxydation et les dommages causés par les radicaux libres sur les composés cellulaires (Rahman, 2007). L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction des ERO. Ces systèmes peuvent être exogènes ou endogènes et sont réagis en synergie afin de protéger les cellules *vis-à-vis* aux ERO **(Figure 10).**

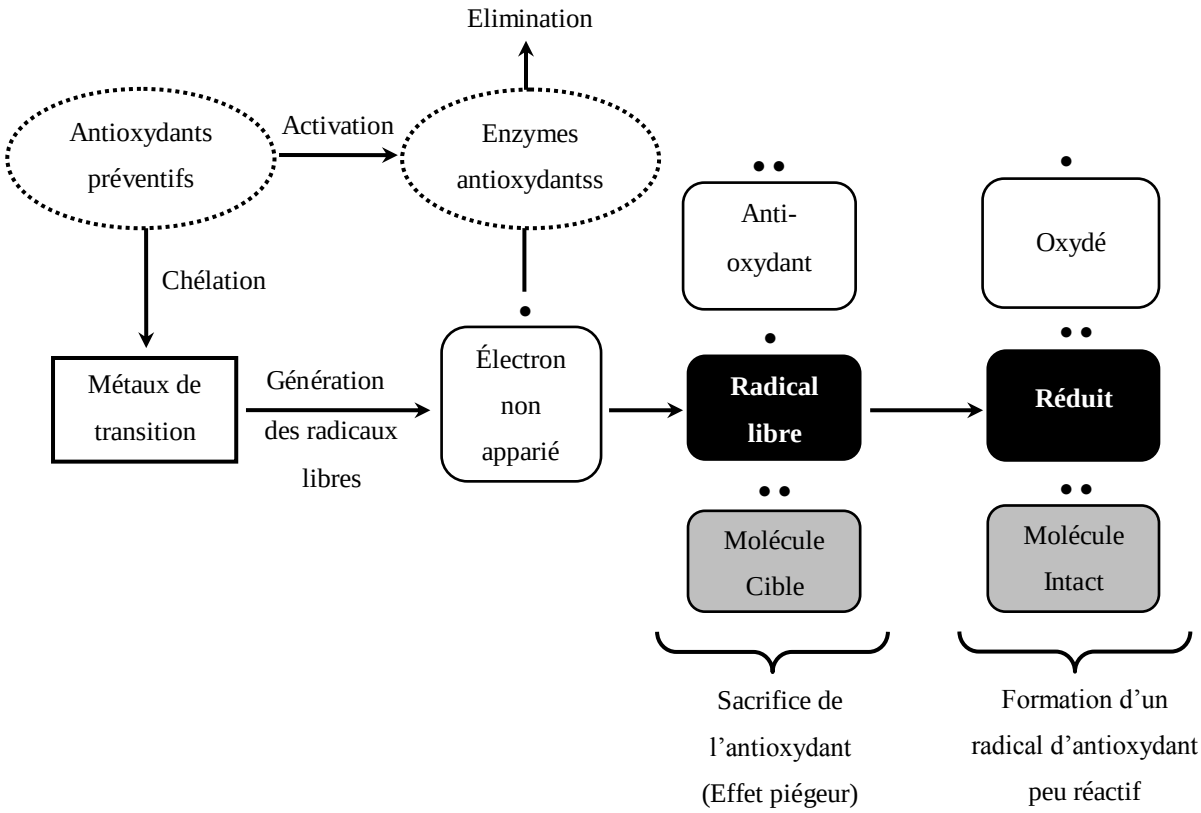

Figure 10. Mécanismes d'action des antioxydants (Kalam *et al.*, 2012).

3.2.1. Les antioxydants endogènes

La production physiologique des ERO est contrôlée au sein des cellules par les systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques.

a) Antioxydants enzymatiques

Les principaux enzymes antioxydants impliqués dans la neutralisation des ERO dans les cellules sont : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPX) (Matés *et al.*, 1999). Ces enzymes forment un système de protection très efficace puisqu'ils ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente et permettre l'élimination de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en catalysant les réactions suivantes :

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{GPX}} 2H_2O + GSSG$$

b) Antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice enzymatique est renforcée par celle de différents composés réducteurs d'origine métabolique. Ces composés antioxydants sont produits dans les cellules de l'organisme **(Figure 11)** et parmi lesquels on peut citer le glutathion, l'acide lipoïque, L-arginine, Ubiquinone, l'acide urique, la mélatonine, la transferrine etc. (Pham-Huy *et al.*, 2008). De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion qui protège, non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote (Favier, 2003).

3.2.2. Les antioxydants exogènes

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Kalam *et al.*, 2012). Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes parmi eux sont les

vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols (**Figure 11**), les acides gras (oméga-3 et oméga-6) ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces substances ne permettent l'élimination que d'un seul radical libre à la fois. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, ces antioxydants doivent être donc régénérés par d'autres systèmes (Pham-Huy *et al*., 2008).

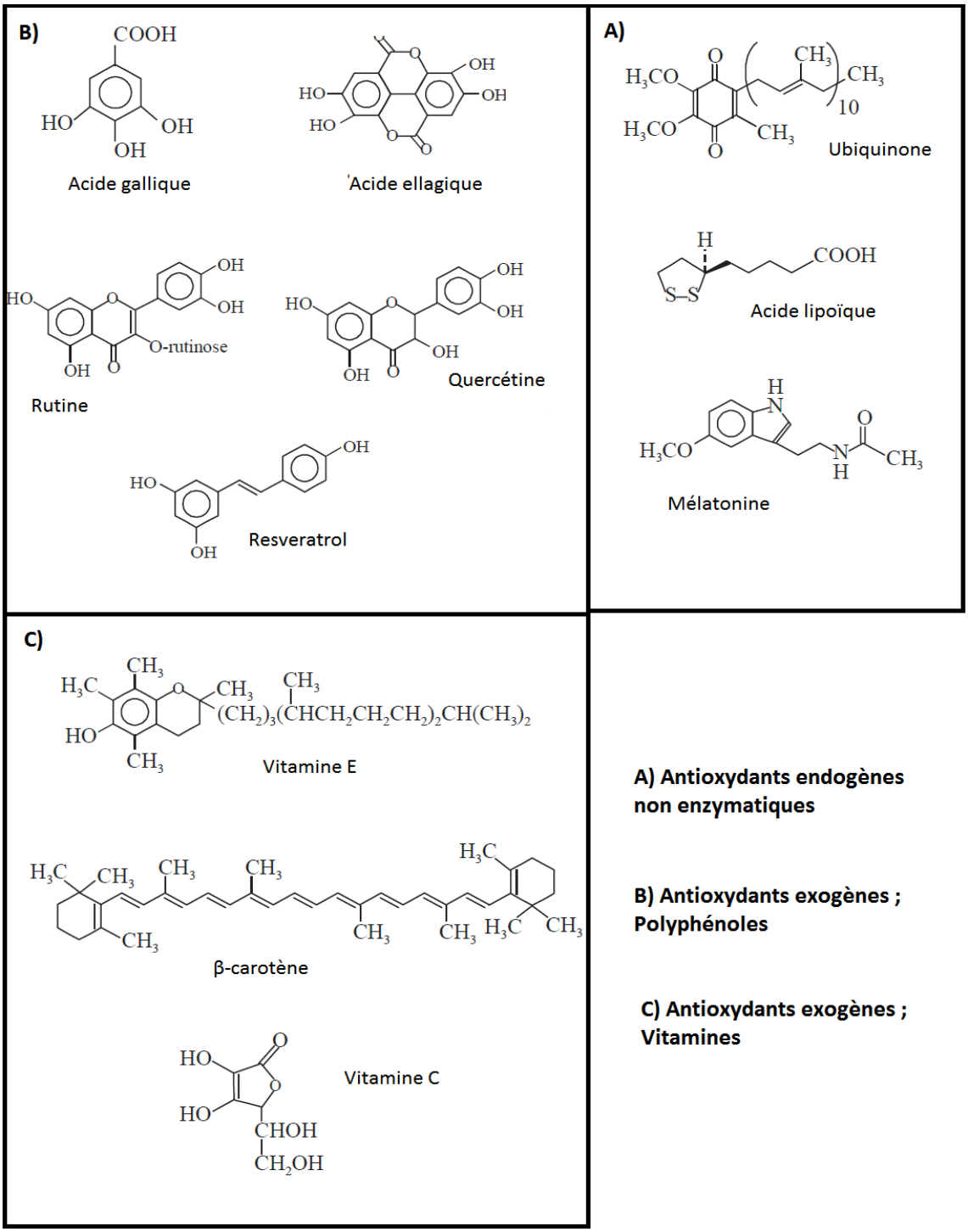

Figure 11. Structure de quelques molécules antioxydantes non enzymatiques. (Kar, 2007).

Les polyphénols comme des agents antioxydants

Les polyphénols sont des composés que l'on trouve dans tous les plantes et renferment plus de 8000 composés naturels dont les flavonoïdes sont la classe majeure et la plus importante (Djeridane *et al.*, 2006). Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes, tels que l'activité anti-inflammatoire et anti-tumorale, sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels **(Figure 12).** En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Niki, 2010).

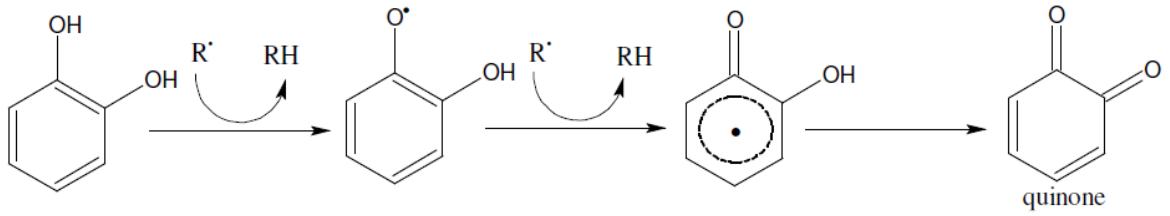

Figure 12. Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériels biologique

1.1.1. La plante

Les graines de *Peganum harmala* L. ont été achetées à partir d'un herboriste à Chelghoum Laid, Wilaya de Mila, au mois de Novembre 2010. Cette plante a été authentifiée par Mr. LAOUER H. Professeur au niveau du Laboratoire de valorisation des ressources biologiques - Université Ferhat Abbas – Sétif.

1.1.2. Les animaux

Les souris mâles et femelles *Albinos,* de la souche *NMRI* dérivées de la souche *Swiss*, proviennent tous de l'Institut Pasteur d'Alger. Les souris utilisées dans la toxicité aiguë ont un poids moyen de 27,97 ± 3,08g (femelles) et 26,92 ± 3,15g (mâles). Alors que celles utilisées dans l'évaluation de la toxicité subaiguë en utilisant ont un poids moyen de 32.75 ± 2.14g (femelles).

L'élevage de ces animaux a été effectué dans le laboratoire de la Phytothérapie appliquée aux maladies chroniques - Université Ferhat Abbes - Sétif, avec un cycle photopériodique naturel. La température dans le laboratoire est 20 ± 1°C. Les animaux sont logés, selon le sexe, dans des cages d'aluminium chacun porte 4 animaux, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. La litière utilisée est la sciure, renouvelée trois fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

1.2. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans notre étude sont :

- Les solvants : le Méthanol, le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

- Les réactifs : $AlCl_3$, Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3, acide gallique, quercétine, rutine, BHT (Butylated hydroxy toluen), DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), β-carotène, Tween40, acide linoléique.

Ces solvants et réactifs sont obtenus auprès de Fluka, Prolabo, Sigma-Aldrich, Organics et Janssen Chemica.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits des graines de *Peganum harmala* L.

Les graines de *Peganum harmala* ont été nettoyées des impuretés, lavés avec de l'eau de robinet et séchés à l'abri de la lumière pendant quelques jours, ensuite broyés à l'aide d'un mortier en poudre moyennement fine, à partir de laquelle des différents extraits ont été préparés.

2.1.1. L'extrait aqueux

L'extrait aqueux (EAq) est préparé en suivant la méthode décrite par Mbiantcha et ses collaborateurs (2011), avec quelques modifications. La macération est faite avec 100g de la poudre des graines dans 1000ml de l'eau distillée tiède pendant 3jours. Une filtration sur coton hydrophile, puis sur papier Wattman N°3 a été effectuée. Pour l'évaporation de l'eau distillée, le filtrat est placé dans l'étuve à 45°C jusqu'à l'obtention d'un extrait, conservé par la suite, à - 4°C jusqu'à son utilisation.

2.1.2. L'extrait brut

L'extraction brute (EBr) a été effectuée avec le méthanol 80% (10g de la poudre des graines / 100ml) pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après filtration sur coton hydrophile, puis à travers le papier Wattman N°3, puis une deuxième macération a été réalisée. Les filtrats sont recombinés puis évaporés (par un rotavapeur, BÜCHI) presque à sec

et les résidus finaux ont été mis à sécher dans une étuve à 45°C, jusqu'à l'obtention d'un extrait sous forme de poudre conservée à - 4°C jusqu'à son utilisation (Mbiantcha *et al*., 2011).

2.1.3. Fractionnement de l'extrait brut

Le fractionnement de l'extrait brut s'effectue selon la méthode de Markham (1982) en utilisant une série de solvants à polarité croissante. L'extrait brut est, initialement, mélangé avec l'hexane (V/V), et après décantation, la phase organique est récupérée. Cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse est soumise à un autre fractionnement par le chloroforme puis par l'acétate d'éthyle pour donner, à la fin de l'opération, la fraction du chloroforme (ECh), et la fraction d'acétate d'éthyle (EAe), en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'hexane. Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse résiduelle (EAq*) qui est également soumise à une évaporation et conservée avec les autres extraits à - 4°C.

2.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits

2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification de ces métabolites est effectuée selon plusieurs méthodes analytiques. La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu.

a) Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation en milieu alcalin du réactif Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite, qui a une

absorbance maximale à 765nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait analysé (Georgé *et al*., 2005).

b) Protocole

Les polyphénols ont été déterminés en spectrophotométrie, en suivant le protocole réalisé par Li et ses collaborateurs (2007). Brièvement, 500µl du réactif Folin-Ciocalteu (dilué à 10% dans de l'eau distillée) sont ajoutés à 100µl d'extrait avec des concentrations bien déterminées. Quatre minutes après, 400µl d'Na_2CO_3 (75mg/ml), sont additionnées au mélange réactionnel. Après une incubation de 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 765nm.

La droite d'étalonnage est réalisée par l'acide gallique (0-160µg/ml), en suivant les mêmes étapes de dosage. Les concentrations des composés phénoliques sont déterminées à partir de la droite de régression de la courbe d'étalonnage (**Figure 13**). Les résultats sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ g).

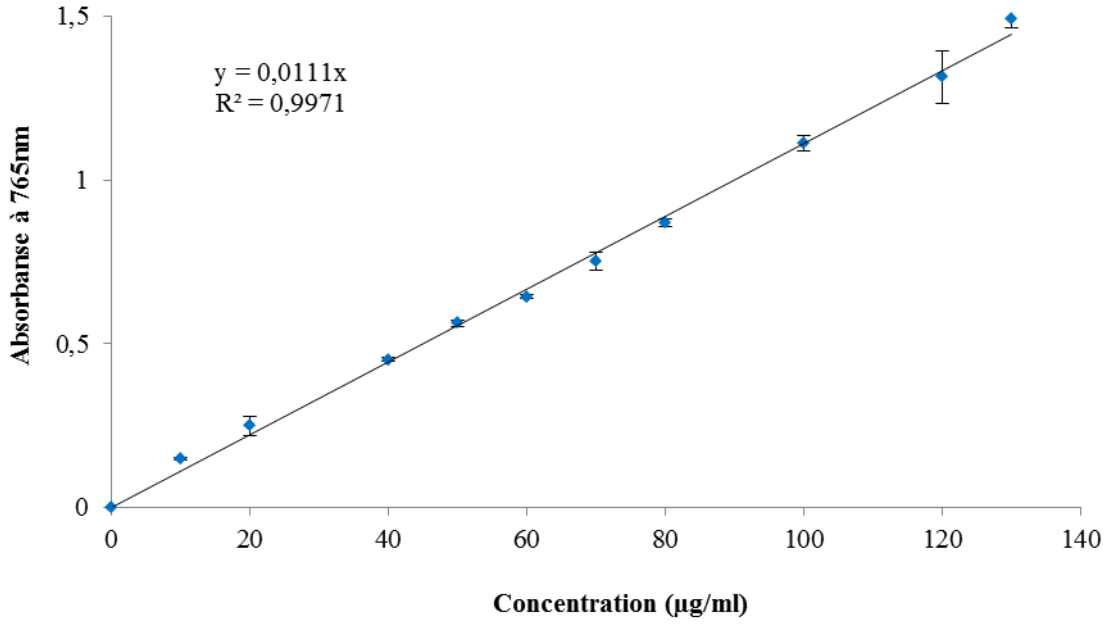

Figure 13. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes, dans les extraits de *Peganum harmala*, a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), en suivant le protocole de Bahorun et ses collaborateurs (1996).

a) Principe

La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produise un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430nm (Ababsa, 2009).

b) Protocole

À 1ml d'échantillon, 1ml de la solution d'$AlCl_3$ (2% dans de l'méthanol) est ajouté. Après 10min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, les absorbances sont mesurées par le spectrophotomètre à 430nm. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

Dans les mêmes conditions, deux gammes d'étalonnages de la quercétine et de la rutine (0-40µg/ml), sont établies. La quantité des flavonoïdes est déterminée à partir de la droite de régression des droites d'étalonnages (**Figure 14**). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine (ou rutine) par gramme d'extrait (mg EQ ou mg ER/g).

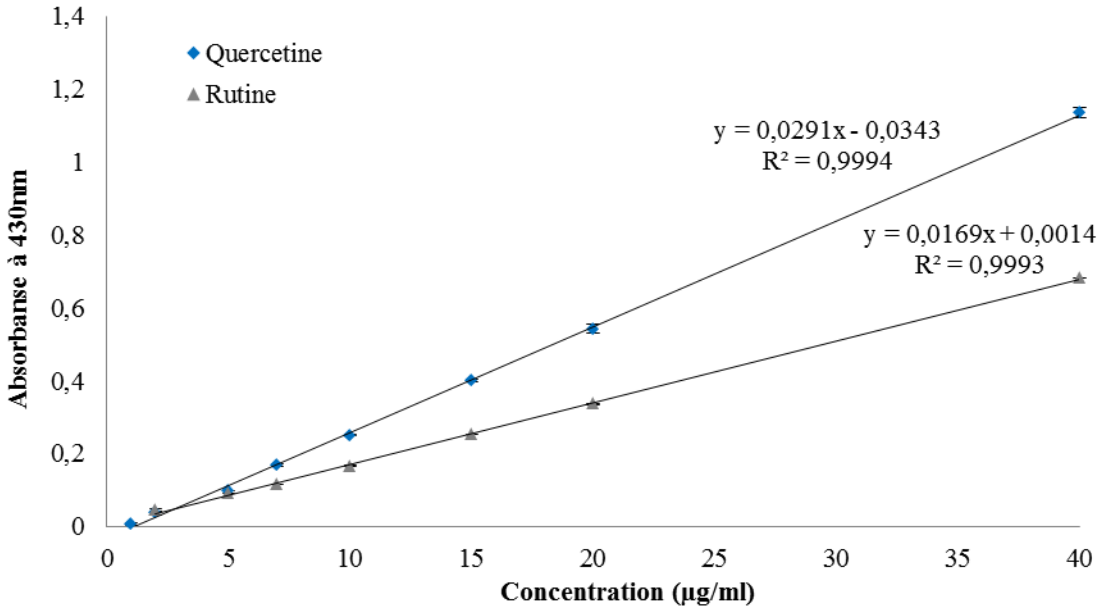

Figure 14. Droites d'étalonnage de la rutine et de la quercétine.

2.3. Évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits

Deux tests différents ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des graines de *Peganum harmala* L : le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) et le test du blanchissement de β-carotène.

2.3.1. Effet piégeur des extraits contre le radical DPPH

a) Principe

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala* est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical DPPH. La réduction du radical DPPH, ayant une couleur violette foncée, par les groupements hydroxyles des antioxydants présents dans les extraits, conduisant à la formation d'un composé stable d'une couleur jaune. La couleur violette foncée, mesurable à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire de l'extrait (Locatelli *et al*., 2010).

b) Protocole

Dans ce test, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 0,4mg de DPPH dans 100ml du méthanol au jour de la manipulation. Cinquante microlitres (50µl) des extraits ou des standards (acide gallique et BHT) sont ajoutés à 1250µl de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel est laissé à l'obscurité pendant 30min et l'absorbance est mesurée à 517nm (Burits et Bucar, 2000). L'effet piégeur est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

2.3.2. Test du blanchissement de β-carotène

a) Principe

Le potentiel antioxydant des extraits de *Peganum harmala,* dans ce type de test, est déterminé en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β-carotène (décoloration ou blanchissement) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

b) Protocole

L'activité antioxydante dans ce test, est réalisée selon la méthode décrite par Miller en 1971 et qui est modifiée par Aslan et ses collaborateurs (2006). Brièvement, une émulsion de β-carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0.5mg de β-carotène dans 1000µl du chloroforme. Vingt-cinq microlitres (25µl) de l'acide linoléique et 200mg de Tween 40 sont additionnées. Le chloroforme est ensuite évaporé, en utilisant un rota-vapeur (BÜCHI), et 100ml d'eau distillée oxygéné ont été ajoutés avec une agitation vigoureuse de l'émulsion résultante.

Pour la réalisation du test, 2500µl de l'émulsion précédente sont ajoutés à 350µl de l'extrait à analyser (2mg/ml). L'antioxydant standard (BHT) est utilisé comme un contrôle positif, alors que le contrôle négatif est réalisé par le solvant de solubilisation des extraits**.** La décoloration de β-carotène est suivie à 490nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité inhibitrice de la dégradation de β-carotène des extraits (% inhibition) est calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = A_t \text{ (extrait)} \times 100 / A_t \text{ (BHT)}$$

A_t (extrait) : absorbance de l'extrait dans un temps déterminé.
A_t (BHT) : absorbance de BHT dans un temps déterminé.

2.4. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L.

Afin d'évaluer l'effet toxique subaigu de l'extrait brut de *Peganum harmala*, une détermination de l'effet toxique aigu est nécessaire, en mesurant la dose létale 50 (DL_{50}).

2.4.1. Évaluation de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë de l'extrait brut de *Peganum harmala* a été estimée en utilisant la méthode décrite par Tahraoui et ses collaborateurs (2010), qui consiste à répartir les souris**,** en 7 lots de 10 animaux (mâles et femelles). L'un des lots est utilisé comme témoin (recevant de l'eau

distillée) alors que les autres lots ont été traités, chacun, par une dose unique de l'extrait brut de *Peganum harmala* (solubilisé dans de l'eau distillée et ajusté à 10ml/kg par dose). L'administration a été effectuée par gavage orale aux doses suivantes (0, 0.1, 0.5, 1, 3, 6 et 12g/kg du poids corporel). Après l'administration de l'extrait, les souris sont surveillées en permanence dans la première, 6ème et 24ème heure après le traitement, pour toute mortalité ou changement de comportement. Ces signes de la toxicité ont été suivies quotidiennement pendant 14 jours. Dans le 15ème jour, le nombre des animaux morts est calculé et transformé en pourcentage, alors que les animaux restant vivants sont sacrifiés.

Détermination de la DL_{50} de l'extrait brut de *Peganum harmala* L.

La DL_{50}, exprimée en mg/kg du poids corporel, est déterminée par la méthode graphique de Miller et Trainer, (1944) décrite par Randhawa en 2009 et par la méthode de calcul de Dragstedt et Lang, (1957) cité par El Allaoui et ses collaborateurs (2011).

a) Méthode graphique (Miller et Trainer 1944)

Dans cette méthode, les pourcentages de la mortalité des rats doivent être convertis en unités probits. La DL_{50} est donc déterminée à partir de la droite exprimant le taux de mortalité des rats (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée (mg/kg de poids coporel). La DL_{50} représente l'abscisse du point correspondant à 5 unités probits.

Pour calculer l'écartype de la DL_{50}, il suffit de déterminer les doses correspondantes aux 16% et 84% de mortalité, et de faire soustraire la première dose de la deuxième selon l'équation suivante :

$$\text{Approx. SEM de la } DL_{50} = \frac{(DL_{84} - DL_{16})}{\sqrt{2N}}$$

N : Nombre des animaux dans chaque lot.

b) Méthode de calcul (Dragstedt et Lang 1957)

Dragstedt et Lang stipulent deux postulats :

« Tout animal ayant survécu à une dose administrée donnée aurait survécu à toute dose inférieure à celle-ci, et tout animal ayant succombé à une dose déterminée aurait succombé à n'importe laquelle des doses supérieures. Alors, on peut, pour chaque dose, rassembler tous les morts déjà observés aux doses inférieures et tous les vivants observés aux doses supérieurs ». Donc, nous pouvons calculer la DL_{50} d'après la formule suivante :

$$DL_{50} = \frac{50\,(X_1\text{-}X_2) + X_1Y_2 - Y_1X_2}{Y_2\text{-}Y_1}$$

Dont laquelle : X_1 : dose inférieure encadrant la DL_{50}

X_2 : dose supérieure encadrant la DL_{50}

Y1 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_1

Y_2 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_2

2.4.2. Toxicité subaiguë

a) Traitement des animaux

Seize souris femelles ont été réparti en deux groupes, chacun contient 08 animaux. Le premier groupe sert comme un témoin, recevant de l'eau distillée tout le long de la durée de l'étude. Les animaux du deuxième groupe ont été traités par une dose de 285.8mg/kg/jour (1/10 de la DL_{50}) (Hsu *et al*., 2011). L'extrait brut solubilisé dans de l'eau distillée est administré par gavage oral pendant quatre semaines successives (6jours/7). A la fin de la quatrième semaine, toutes les souris ont été euthanasiées et un prélèvement du sang et des organes a été effectué.

b) Prélèvement du sang, analyses biochimiques et hématologiques

A la fin de la durée du traitement, les souris ont été anesthésiées légèrement avec de l'éther di-éthylique. Les prélèvements sanguins ont été réalisés chez les souris anesthésiées par la ponction cardiaque. L'échantillon du sang est récupéré dans deux tubes, l'un contenant

l'EDTA et l'autre l'héparine. Les tubes EDTA ont été, immédiatement, usées pour les analyses hématologiques, alors que les tubes héparinés ont été centrifugés à 4000rpm pendant 10min et le sérum obtenu est conservé à -20°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses biochimiques.

*** Paramètres hématologiques**

Les paramètres hématologiques pour la formule numérique sanguine sont : Globules rouges (GR), Globules blancs (GB), Hématocrite, Hémoglobine, Plaquettes, Volume globulaire moyen (VGM), Volume plaquettaire moyen (VPM), Concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine (CCMH). Ces paramètres ont été mesurés au niveau du Laboratoire Central du CHU de Sétif.

*** Paramètres biochimiques**

Les paramètres sériques suivants : Glucose, Créatinine, Acide urique (AU), Cholestérol, Triglycérides totaux (TG), Alanine aminotransférase (ALAT), Aspartate aminotransférase (ASAT), Phosphatase alcaline (PAL), Albumine, Bilirubine et les Protéines totales (PT), ont été testés au niveau du Laboratoire Central de l'Hôpital Universitaire de Sétif (CHU).

c) Collecte des urines

Les analyses des urines ont été conduites durant les deux derniers jours de la durée du traitement. Les animaux de chaque groupe ont été placés, individuellement, dans des cages à métabolisme de 2 à 4 heures avec un accès libre à l'eau seulement.

***Analyses des urines**

Tout changement de densité, pH, du taux de glucose, de la bilirubine ainsi que la présence du sang, des protéines, des nitrites, des leucocytes et des cétones dans les urines, a été évalué en utilisant des bandelettes réactives d'analyse urinaire.

e) Réalisation des coupes histologiques

Après le sacrifice des souris, les organes vitaux (cœur, foie, reins, cerveau, estomac, poumons, rate) ont été déplacés, lavées avec de l'eau physiologique, pesés et fixés dans le formol 10% jusqu'au leurs utilisation dans les coupes histologiques. Un examen macroscopique des organes est effectué, avant leur fixation, pour noter tout changement de couleur ou de forme des organes.

La réalisation des coupes histologiques incluant la déshydratation des tissus, l'inclusion et la coupe, est effectuée au niveau du Laboratoire d'Anatomie Pathologique (CHU-Sétif). Les coupes de 5µm d'épaisseur sont étalées sur des lames, séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine (Bensalem-bendjelloul, 1998).

2.5. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± la déviation standard (Moyenne ± SD). Les résultats des différents tests sont analysés par le test-*t* de Student pour les comparaisons simples, et ANOVA à un seul facteur suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les valeurs de p inférieur à 0.05 ($p<0.05$) sont considérées statistiquement significatives. La corrélation fait par la régression linéaire est exprimée par le coefficient de corrélation (R^2). La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel Sigma Plot version 11.0 et Graphpad Prism version 5.0.

Résultats

1. Extraction des graines de *Peganum harmala* L.

L'extraction des graines de *Peganum harmala* a été réalisée en deux étapes : la première est l'extraction par le méthanol 80% ou par l'eau distillée et la deuxième étape consiste à faire fractionner l'extrait brut par une série de trois solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle). De ce fait, six extraits ont été récupérés : l'extrait aqueux (EAq), l'extrait brut (EBr), la fraction d'hexane (EHx), la fraction du chloroforme (ECh), la fraction d'acétate d'éthyle (EAe) et la fraction aqueuse résiduelle (EAq*).

Après l'extraction et l'élimination de toute trace de solvant, le rendement est calculé selon la formule ci-dessous et les résultats obtenus (teneur en composés extractibles, TCE) sont présentés dans le **tableau 5**.

$$\text{Rendement (TCE)} = \frac{\text{Poids de l'extrait}}{\text{Poids sec de la plante}} \times 100$$

Tableau 5. Teneur en composés extractibles (TCE), ou rendement d'extraction des graines de *Peganum harmala* L.

Extraits	Rendement (TCE) % Par rapport au poids des graines	Rendement (TCE) % Par rapport à l'extrait brut
EAq	8,66	-
EBr	20,18	100
EHx	0,13	0,64
ECh	0,46	5,63
EAe	1,14	2,30
EAq*	16,45	81,51

Les résultats montrent que le rendement de l'extraction par le méthanol est la plus élevée (20.18%) comparant à celui de l'extrait aqueux (EAq, 8.66%). D'un autre part, la comparaison entre les rendements des différentes fractions par rapport à l'EBr indique que la teneur en composés extractibles diminue dans le sens décroissant de la polarité des solvants utilisés (81.51%, 5.63%, 2.3% et 0.64% pour EAq*, EAe, ECh et EHx, respectivement). En plus, la somme des rendements de ces fractions est estimée par 90.08% avec une perte de 9.02% en composés extractibles.

2. Teneur des extraits en polyphénols et en flavonoïdes

2.1. Teneur en polyphénols

La teneur des différents extraits des graines de *Peganum harmala* en polyphénols a été déterminée par la méthode du Folin-Ciocalteu et exprimée en mg EAG/g d'extrait (ou par gramme de graines sèches, g GS). Les résultats sont regroupés dans le **tableau 6.**

Tableau 6. Teneur en polyphénols totaux (TPT) dans les différents extraits des graines de *Peganum harmala* L.

Extraits	Teneur en polyphénols totaux		TPT/TCE (%)
	mg EAG/g d'extrait	mg EAG/g GS	
EAq	125.53 ± 5.21	10.87 ± 0.45	12.55
EBr	79.73 ± 2.74	16.09 ± 0.55	7.97
EHx	23.54 ± 1.75	0.030 ± 0.002	2.35
ECh	164.64 ± 5.1	0.76 ± 0.02	16.46
EAe	65.69 ± 1.11	0.75 ± 0.01	6.57
EAq*	102.85 ± 0.79	16.92 ± 0.13	10.28

Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n=3).

D'après ce tableau, la teneur en polyphénols des différents extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala* varie de 23.54 à 164.64mg EAG/g**.** Il est clair que l'ECh est la fraction la plus riche en polyphénols (164.64mg EAG/g d'extrait) suivie par l'EAq, l'EAq*, l'EBr, l'EAe et l'EHx.

En comparant la teneur en polyphénols avec celle des composés extractibles dans les différents extraits, elle semble très faible (**Tableau 6).** Le rapport TPT/TCE est compris entre 2.35% et 16.46%. De ce fait, d'autres composés que les polyphénols ont été donc constaté dans l'EHx, EAe, EBr, EAq*, EAq et ECh avec un pourcentage de 97.6%, 93.4%, 92.02%, 89.7%, 87.44% et 83.53%, respectivement.

2.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est quantifiée par la méthode au trichlorure d'aluminium et les résultats, obtenus à partir de l'équation de la droite de régression des droites d'étalonnages de la quercétine et la rutine (mg EQ/g ou mg ER/g), sont représentés dans le **tableau 7**.

Tableau 7. Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits de *Peganum harmala* L.

Extraits	Teneur en flavonoïdes	
	mg EQ/g d'extrait	mg ER/g d'extrait
EAq	10.81 ± 0.62	22.52 ±1.07
EBr	4.03 ± 0.29	10.84 ± 0.5
EHx	10.99 ± 1.25	22.83 ±2.15
ECh	38.99 ± 0.79	71.04 ±1.37
EAe	7.13 ± 0.81	16.16 ±1.39
EAq*	14.78 ± 0.31	29.34 ± 0.53

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3).

Le dosage des flavonoïdes a révélé que l'ECh est la fraction la plus riche en flavonoïdes (38mg EQ/g et 71.04mg ER/g). Tel résultat est comparable à celui du dosage des polyohénols. L'ordre de la teneur en flavonoïdes est comme suite : ECh > EAq* > EHx > EAq > EAe > EBr.

3. Activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala* L.

3.1. Effet piégeur envers le radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala* a été faite en comparaison avec celle d'autres antioxydants tels que l'acide gallique et le BHT, et a été exprimée en IC_{50}. Ce paramètre est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel, où l'activité la plus forte correspond à l'IC_{50} la plus faible.

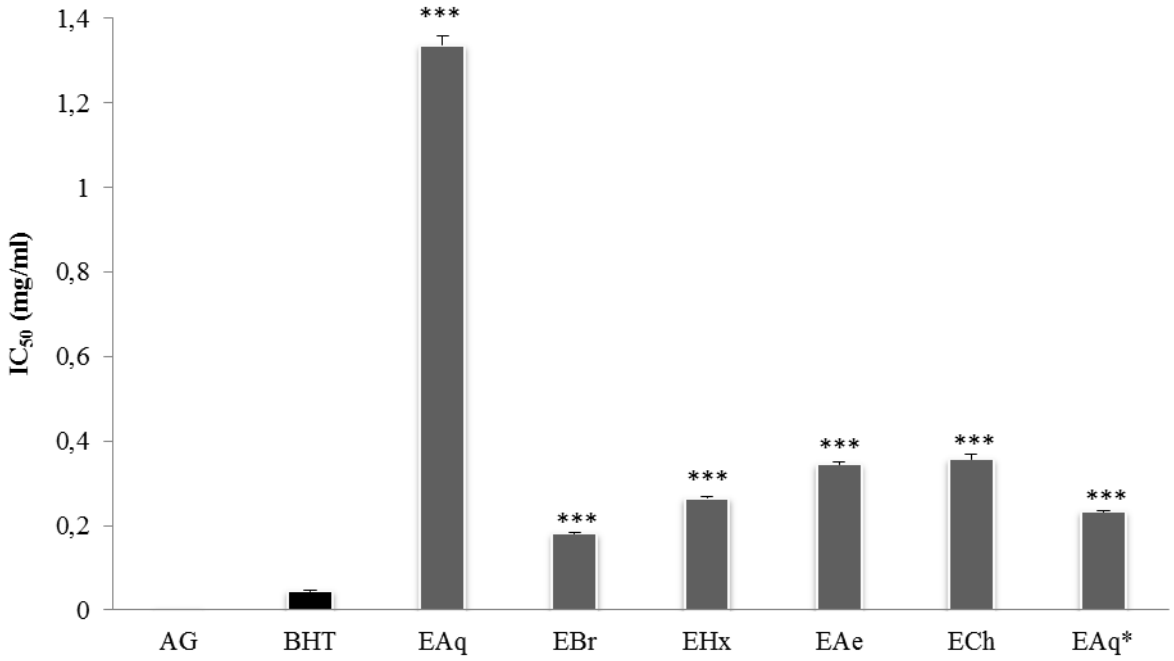

Figure 15. L'effet piégeur du radical DPPH par les extraits des graines de *Peganum harmala* L., l'acide gallique et le BHT. Les résultats sont exprimés en µg/ml. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3) ; *** $p < 0.001$, comparant avec l'acide gallique et au BHT (ANOVA à un facteur suivi du test du Tukey).

Les résultats ont montré que les différents extraits des graines de *Peganum harmala* piègent les radicaux DPPH avec des IC_{50} de 181, 233.33, 265, 345, 375.67, et 1336.67µg/ml pour EBr, EAq*, EHx, EAe, ECh et EAq, respectivement (**Figure 15**). Une activité qui reste toujours, significativement ($p<0.001$) très inférieure à celles des standards : l'acide gallique (1.44µg/ml) et le BHT (44.73µg/ml).

3.2. Test du blanchissement de β-carotène

Pour déterminer la puissance des extraits des graines de *Peganum harmala* à ralentir ou inhiber l'oxydation de β-carotène, un suivi de la réaction d'oxydation a été réalisé en mesurant tout abaissement d'absorbance à 490nm en fonction du temps. Les courbes obtenues, exprimés en pourcentage d'inhibition du blanchissement de β-carotène, sont représentés dans la **figure 16.**

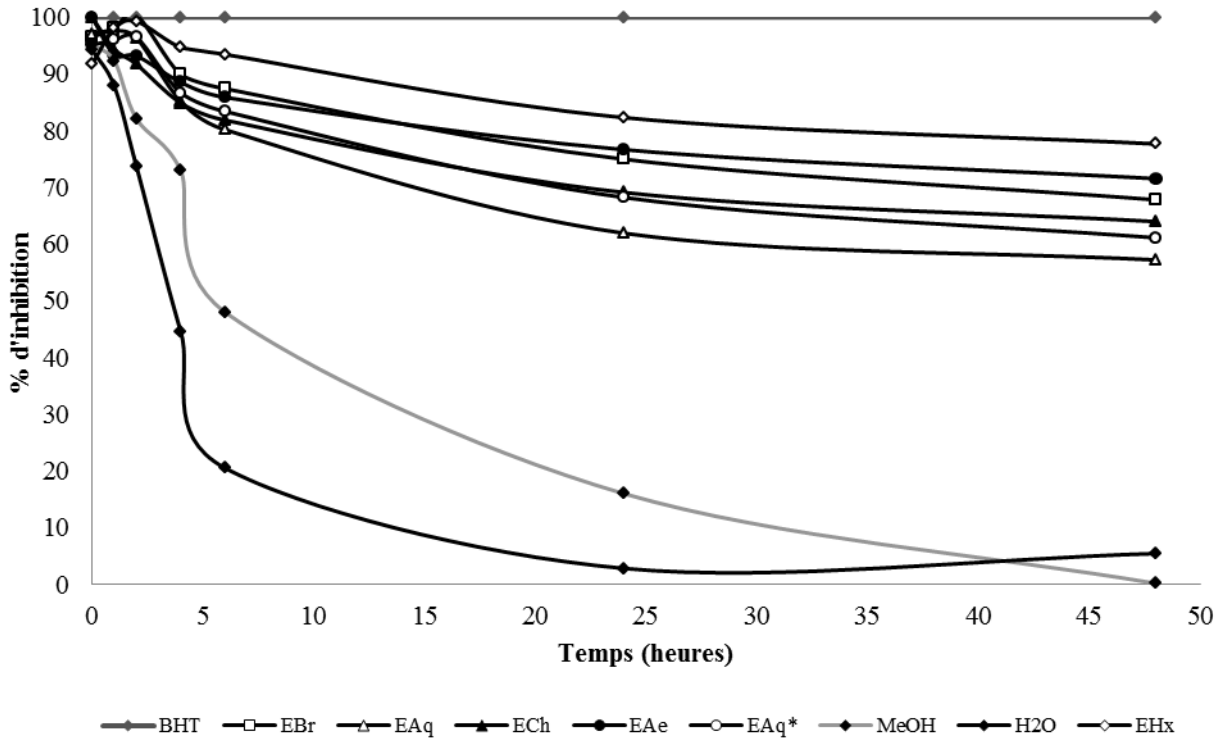

Figure 16. L'activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala* L., du BHT et des contrôles négatifs dans le test du blanchissement de β-carotène. Chaque point représente la moyenne ± SD (n = 3).

Les résultats ont montré que le pourcentage d'inhibition de chaque extrait diminue progressivement pour atteindre des valeurs plus ou moins basses. Cette diminution est plus rapide par rapport à celle de BHT et moins par rapport aux contrôles négatifs (H_2O et MeOH).

En présence du contrôle positif (BHT), les absorbances de la solution de β-carotène restent stables durant toute la période d'incubation (100% d'activité antioxydante). Alors que les contrôles négatifs ne montrent qu'une très faible activité antioxydante qui ne dépasse pas 3% et 17% pour le H_2O et MeOH, respectivement, après 24 heures d'incubation. Les différents extraits des graines de *Peganum harmala* ont montrés une activité antioxydante remarquable où les pourcentages sont aperçus dans la **figure 17.**

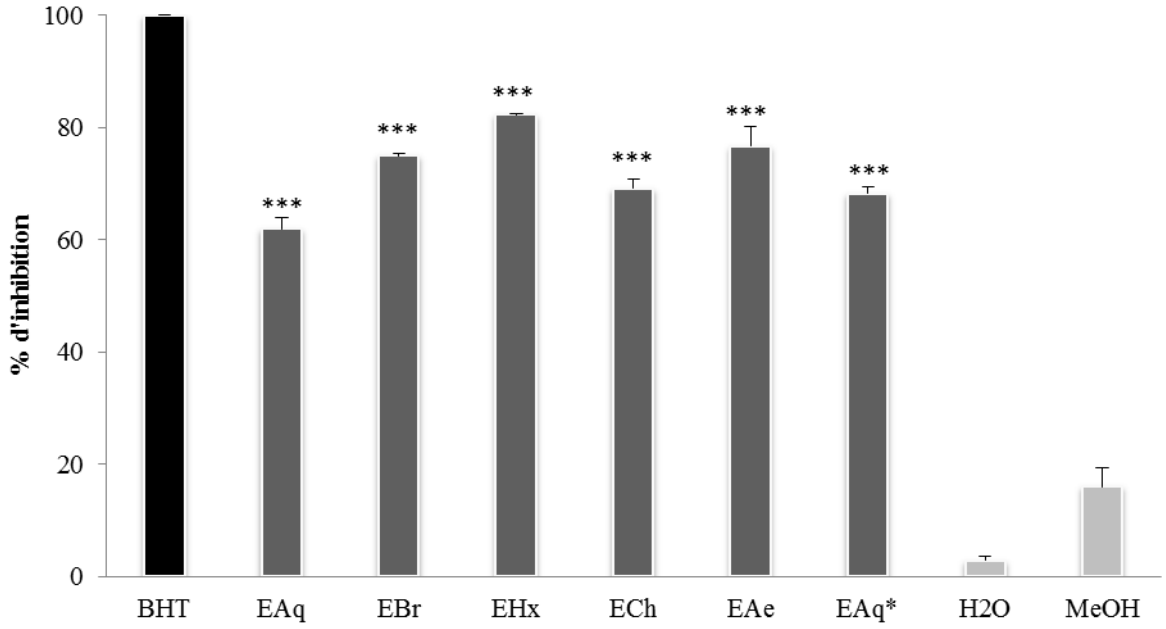

Figure 17. Pourcentage d'inhibition du blanchissement de β-carotène après 24 heures par les extraits de *Peganum harmala* L., le BHT et les contrôles négatifs. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3) ; *** $p < 0.001$, comparant avec BHT (ANOVA à un facteur suivi du test de Tukey).

Cette représentation montre que l'oxydation couplée de l'acide linoléique et de β-carotène est efficacement inhibée par extraits de *Peganum harmala*. Ainsi, l'activité antioxydante la plus élevée est donné par l'EHx avec 82.31% d'inhibition, une activité qui reste significativement inférieure à celle du BHT ($p<0.001$). Les autres extraits montrent des activités voisines

mineures dont aucune différence significative n'a été décrite entre les pourcentages d'inhibition de l'EBr et l'ECh ainsi pour l'EAe et l'EAq* ($p>0.05$). L'ordre donc devient comme suit : EHx > ECh (76.66%) = EBr (74.97%) > EAe (69.11%) = EAq*(68.22%) > EAq (61.93%).

4. Effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala L.*

4.1. Toxicité aiguë

4.1.1. Observations cliniques et de survie

Les signes cliniques et de mortalité apparus chez les souris de chaque groupe ont été suivis continuellement pendant une heure après l'administration orale de l'extrait brut. Cette observation a été étendue le long de la durée d'étude de la toxicité aiguë (14 jours), pour déceler les effets retardés de l'extrait brut. Le lot témoin (0g/kg), contenant les souris gavées par l'eau distillée, n'a montré aucun signe de toxicité immédiat ou de mortalité. Cependant, la prise des différentes doses de l'extrait brut des graines de *Peganum harmala*, par voie orale, a provoquée des changements plus ou moins graves dans l'activité physique et le comportement des souris qui peuvent aller jusqu'à la mort. Le **tableau 8 (Figure 18)** résume l'ensemble des troubles enregistrés au cours de cette expérience.

Tableau 8. L'effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L. sur le comportement des animaux et le taux de mortalité.

Dose (g/kg)	Sexe	Mort (D/T)	Signes de toxicité	Latence (h/min)
0	M	0/5	Normal.	-
	F	0/5	Normal.	
0.1	M	0/5	Normal.	-
	F	0/5	Normal.	
0.5	M	0/5	Hypoactivité, isolement, redressement des poils, anorexie.	30 min
	F	0/5	Hypoactivité, redressement des poils.	
1	M	1/5	Hypoactivité, isolement, redressement des poils, somnolence, anorexie, bradycardie, difficulté de respiration et tremblements du corps.	47 h
	F	0/5	Hypoactivité, isolement, redressement des poils, somnolence, anorexie, bradycardie et difficulté de respiration.	
3	M	3/5	Somnolence permanente, anorexie, hypoactivité, isolement, redressement des poils, bradycardie, difficulté de respiration, des tremblements graves du corps, dyspnée et convulsions.	3h à 41h
	F	1/5	Somnolence, hypoactivité, isolement, redressement des poils, bradycardie, difficulté de respiration, des tremblements légers du corps et dyspnée.	
6	M	4/5	Somnolence permanente, anorexie, hypoactivité, isolement, redressement des poils, bradycardie, difficulté de respiration, des convulsions, dyspnée, des tremblements graves du corps, inconscience, perte d'équilibre, spasmes musculaires cloniques, état narcotique et périodes d'excitations occasionnelles conduisant à la fin à la mort de l'animal.	2h à 11h
	F	4/5		
12	M	5/5	Somnolence, hypoactivité, isolement, redressement des poils, bradycardie, difficulté de respiration, dyspnée, des tremblements graves du corps, des spasmes musculaires cloniques, des convulsions, inconscience, perte d'équilibre, les animaux entre par la suite dans un état narcotique avec des périodes d'excitation occasionnelles conduisant à la fin à la mort.	10min à 27h
	F	5/5		

F : femelle ; **M** : male ; **T** : totale ; **D** : décès ; **h** : heure ; **min** : minute

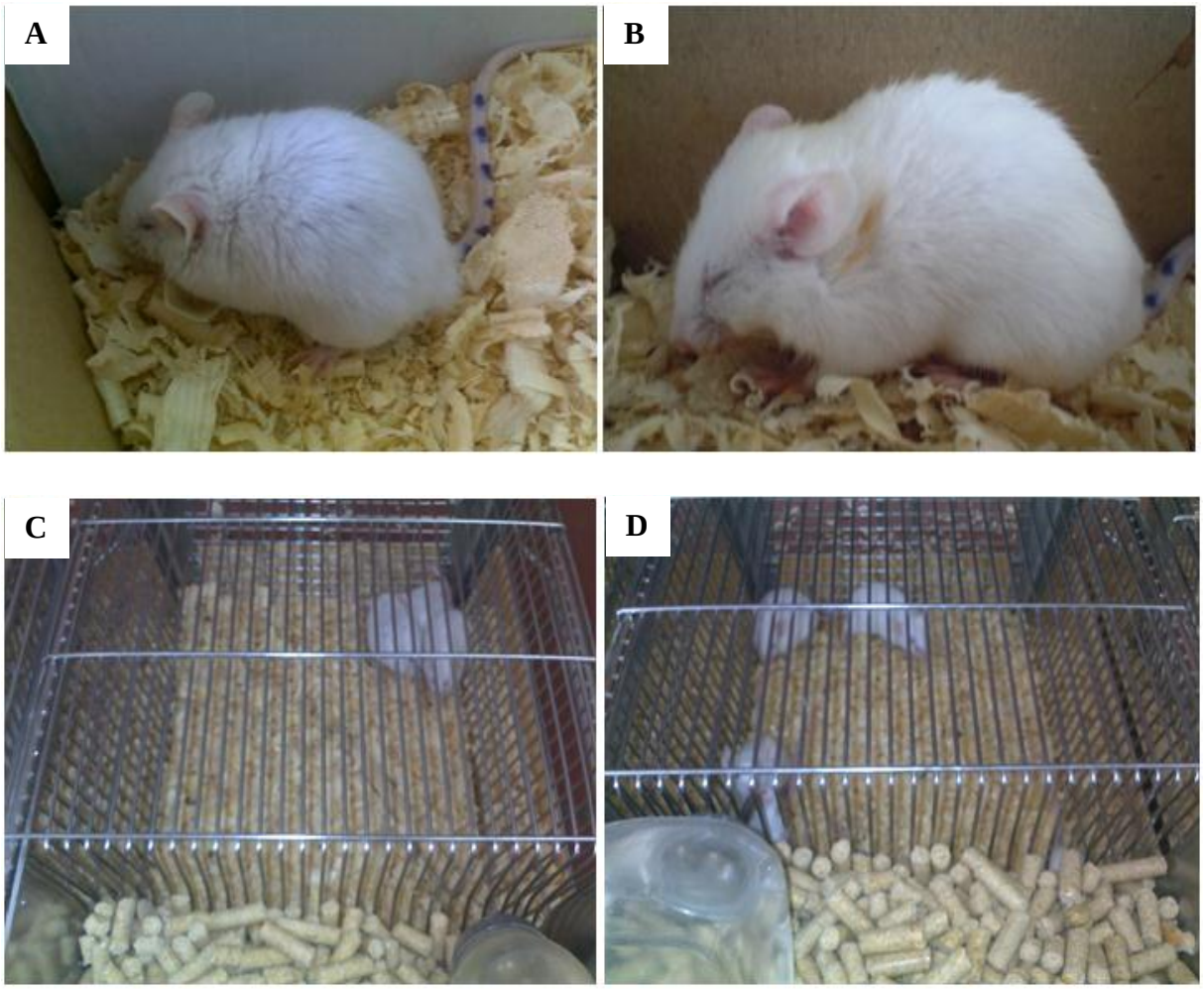

Figure 18. L'effet toxique de l'extrait brut sur le comportement des animaux. **A** : redressement des poils, **B** : somnolence, **C** : hypoactivité des animaux traités, **D** : activité des animaux témoins.

4.1.2. Détermination de la DL_{50}

Afin de déterminer la DL_{50} de l'extrait brut de *Peganum harmala*, cinq doses ont été choisies y compris la DL_0 et la DL_{100}. La première dose est définie comme étant la plus forte dose dans laquelle tous les animaux gavés survivent, alors que la deuxième est la plus faible dose qui conduit à la mort de tous les animaux de l'expérience. Le taux de mortalité observé au cours de ces expériences (exprimé en pourcentage) est reporté dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Transformation en pourcentage du nombre des souris mortes après l'administration d'une prise unique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L.

Lot	Nombre des souris	Dose (g/kg)	% de mortalité
C	10	0	0
1	10	0.1	0
2	10	0.5	0
3	10	1	10
4	10	3	40
5	10	6	80
6	10	12	100

Deux méthodes ont été utilisées pour la détermination de la DL_{50} de l'extrait brut des graines de *Peganum harmala* : La méthode de Miller et Trainer dite méthode **graphique**, et la méthode de Dragstedt et Lang ou méthode de **calcul**.

* **Méthode graphique**

Cette méthode consiste à convertir les pourcentages des animaux morts dans chaque lot en unités probits (**Tableau 10**).

Tableau 10. La conversion en unités probits du pourcentage de mortalité et la correction des pourcentages.

Lot	Dose (g/kg)	Log dose	% de mortalité	% corrigées	Probits
1	0.5	-0,3	0	2,5	3,04
2	1	0	10	10	3,72
3	3	0,47	40	40	4,75
4	6	0,78	80	80	5,84
5	12	1,08	100	97,5	6,96

La droite qui donne la mortalité (exprimés en unités probits) en fonction du logarithme la dose administrée (exprimés en g/kg du poids corporel) a été tracée, et la détermination de la DL_{50} est effectuée en utilisant l'équation de la droite de régression (**Figure 19) :** elle représente l'abscisse du point correspondant à 5 unités probits (50% de mortalité).

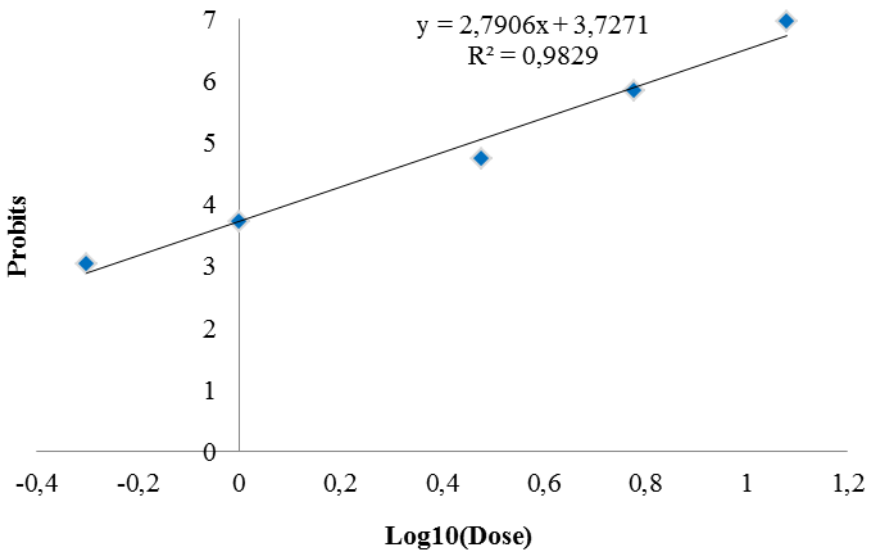

Figure 19. Droite exprimant le taux de mortalité dans chaque lot (unités probits) en fonction du logarithme de la dose (g/kg).

Donc, la DL_{50} exprimée en Moyenne ± SEM, est :

$$DL_{50} = 2.8585 \pm 1.1786 \text{ g/kg.}$$

Avec un intervalle de confiance de 1.6799 à 4.0371g/kg du poids corporel.

* **Méthode de calcule**

Le calcul de la DL_{50} en utilisant la formule suivante :

$$DL_{50} = \frac{50\ (X_1\text{-}X_2) + X_1Y_2 - Y_1X_2}{Y_2\text{-}Y_1}$$

A partir de cette formule, on a estimé que la DL_{50} est égale à 3.7182 g/kg.

Le calcul de la DL_{50} par la méthode de Dragstedt et Lang nous donne une valeur appartenant à l'intervalle de confiance trouvé graphiquement par la méthode de Miller et Trainer, ce qui confirme l'intégralité de nos résultats.

4.2. Toxicité subaiguë

L'administration d'une dose de 285.5mg/kg de l'extrait brut des graines de *Peganum harmala* pendant quartes semaines n'a montrée aucune mortalité. Cependant, les animaux traités sont très calmes et présentent une remarquable anorexie et somnolence par rapport aux témoins.

4.2.1. Évolution pondérale

Pendant toute la période de l'expérience, un suivi du poids corporel des animaux a été effectué chaque semaine (**Tableau 11**).

Tableau 11. L'évolution pondérale des souris des groupes témoin et traité le long de l'expérience.

Semaine	Femelles témoins		Femelles traités	
	Poids corporel	**Gain de poids**	**Poids corporel**	**Gain de poids**
S1	33.58 ± 1.36	0.83 ± 0.2	32.12 ± 2.47 ^{ns}	0.63 ± 1.11 ^{ns}
S2	35.32 ± 1.15	1.73 ± 0.87	32.67 ± 2.95 ^{ns}	0.55 ± 1.79 ^{ns}
S3	34.53 ± 0.84	0.95 ± 0.79	32.26 ± 3.14 ^{ns}	0.14 ± 1.83 ^{ns}
S4	36.31 ± 1.46	2.73 ± 0.83	33.14 ± 3.41^{ns}	1.01 ± 0.75 *

Chaque valeur représente la moyenne ± SD, (n = 8) et les résultats sont exprimés en (g). S1-S4 : semaines de l'étude. ^{ns} $p< 0.05$; * $p> 0.05$, par rapport aux témoins (*t*-test de Student).

Le suivi a montré qu'il y a une diminution modérément significative ($p< 0.05$) dans le gain du poids aux cours des quatre semaines chez les traités dans la dernière semaine comparativement au celui des témoins.

4.2.2. La masse relative des organes

Après le sacrifice des animaux à la fin de l'expérience, un examen macroscopique a été réalisé *in situ* pour les différents organes prélevés. On a observé que les tailles, les formes, la couleur ainsi que les poids des organes vitaux (reins, foie, cerveau, poumons, estomac, rate, et cœur) des souris des deux groupes sont tous à fait normaux. Ceci est bien élucidé après la détermination de la valeur de la masse relative pour chaque organe (**Tableau 12**).

Tableau 12. Les valeurs de la masse relative calculée pour chaque organe.

Organe	Femelles témoins	Femelles traités
Foie	5.33 ± 0.64	5.13 ± 0.49^{ns}
Reins	1.21 ± 0.14	1.39 ± 0.11*
Cœur	0.5 ± 0.04	0.53 ± 0.06^{ns}
Estomac	1.14 ± 0.28	1.09 ± 0.15^{ns}
Rate	0.62 ± 0.07	0.59 ± 0.12^{ns}
Poumons	0.78 ± 0.08	0.82 ± 0.08^{ns}
Cerveau	1.48 ± 0.15	1.52 ± 0.23^{ns}

Chaque valeur représente la moyenne ± SD, (n = 8). * $p < 0.01$; ^{ns} $p > 0.05$, comparant au témoin (*t*-test de Student).

À l'exception d'une augmentation faiblement significative dans la masse relative des reins des souris traitées (14.87%), toutes les autres valeurs sont comparables à celles obtenues chez les témoins.

4.2.3. Effet de l'extrait brut sur les paramètres hématologiques

L'examen hématologique effectué sur le sang des souris traitées quotidiennement par l'extrait brut à la dose de 285.5mg/kg du poids corporel, a montré quelques modifications modérément à faiblement significatives chez ces souris comparativement aux témoins (**Tableau 13)** : une

diminution de 23% et 12% dans le taux des GR et d'Hémoglobine, respectivement, accompagnée d'une augmentation des GB d'environ 144%.

Tableau 13. La formule numérique sanguine déterminée chez les souris traités et témoins.

Paramètres	Femelles témoins	Femelles traités
GR (10^6/mm^3)	9,51 ± 1,17	6,95 ± 1,34 *
GB (10^3/mm^3)	3,15 ± 0,49	7,7 ± 0,98 **
Plaquettes (10^3/mm^3)	1513,5 ± 516,89	1110,8 ± 161,19 ^{ns}
Hématocrite (%)	44,35 ± 2,19	37,33 ± 8,43 ^{ns}
Hémoglobine (g/dL)	14,35 ± 0,35	12,5 ± 0,7 *
CCMH (g/dL)	30,75 ± 1,88	31,3 ± 2,21 ^{ns}
VGM (µm^3)	56,86 ± 9,61	49,96 ± 3,04 ^{ns}
VPM (µm^3)	4,96 ± 0,43	5,07 ± 0,40 ^{ns}

Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n = 8). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; ^{ns} $p> 0.05$, comparativement au témoin (*t*-test de Student). **GR** : globules rouges, **GB** : globules blancs, **CCMH** : concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine, **VGM** : volume globulaire moyen, **VPM** : volume plaquettaire moyen.

4.2.4. Effet sur les paramètres biochimiques

Les résultats, obtenus après l'examen des paramètres sériques des animaux, ont indiqué qu'il n'y a aucun changement significatif dans les valeurs des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT). Cependant, une augmentation très significative dans l'AU ainsi que des variations significatives modérés dans la PAL et la Bilirubine ont été remarqués chez les souris traitées (**Tableau 14**).

Tableau 14. Résultats de l'analyse des paramètres biochimiques sériques.

Paramètre	Femelles témoins	Femelles traités
Glucose (g/L)	1,34 ± 0,31	1,28 ± 0,11 ^{ns}
ALAT (UI/L)	23,33 ± 6,66	27,2 ± 3,83 ^{ns}
ASAT (UI/L)	152,33 ± 18,77	168 ± 28,87 ^{ns}
PAL (UI/L)	42,7 ± 6,67	74,4 ± 8,17 **
Créatinine (mg/L)	4,33 ± 0,57	4,5 ± 1 ^{ns}
AU (mg/L)	12 ± 3,46	42,8 ± 6,83 ***
PT (g/L)	70,15 ± 6,83	70,12 ± 6,97 ^{ns}
Bilirubine (mg/L)	1 ± 0,40	1,4 ± 0,2 *
TG (g/L)	1,07 ± 0,46	0,65 ± 0,10 ^{ns}
Cholestérol (g/L)	1,08 ± 0,37	1,04 ± 0,22 ^{ns}

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 8). *** $p< 0.001$; ** $p< 0.01$; * $p< 0.05$; ^{ns} $p> 0.05$ par rapport au témoin (*t*-test de Student). **ALAT** : alanine amino-transférase, **ASAT** : aspartate amino-transférase, **PAL** : phosphatase alcaline, **AU** : acide urique, **PT** : protéines totaux, **TG** : triglycérides.

4.2.5. Analyses urinaires

Ce qui concerne les analyses urinaires, aucun changement significatif n'a été remarqué dans le pH et la densité. Les résultats obtenus montrent une absence de toute trace de bilirubine, de cétones, de nitrites, des globules rouges ou des leucocytes dans les urines des souris traitées par l'extrait brut de *Peganum harmala* et les témoins. Autrement, une petite différence a été enregistrée dans le taux du glucose (**Tableau 15**).

Tableau 15. Les résultats de l'analyse urinaire chez les souris traitées et témoins.

Paramètre	Femelles témoins	Femelles traités
Glucose (g/dL)	Négative	100 ± 0.0

4.2.6. Examen anatomopathologique

L'examen histologique du foie et du rein des souris traitées et des souris témoins a, clairement, montré que l'architecture cellulaire (lobulaire et tubulaire) du parenchyme des deux organes est bien conservée chez les deux groupes des animaux. Cependant quelques particularités ont été envisagées.

Le parenchyme hépatique est reconnue, microscopiquement, par les veines centro-lobulaires vers lesquelles convergent les travées hépatocytaires et avec des espaces portes réguliers **(Figure 20-A).** Toutefois, une discrète congestion vasculaire et sinusoïdale, une dilatation des capillaires sinusoïdes ainsi qu'une lésion tissulaire ont été notés dans les tissus hépatiques de quelques souris traitées par rapport aux témoins **(Figure 20-B).**

Par ailleurs, l'examen du rein a révélé la présence d'une importante congestion vasculaire dans la lumière des vaisseaux sanguins**.** Un infiltrat inflammatoire et une cytolyse ont été également reportés lors de l'examen microscopique chez quelques souris traitées **(Figure 21).**

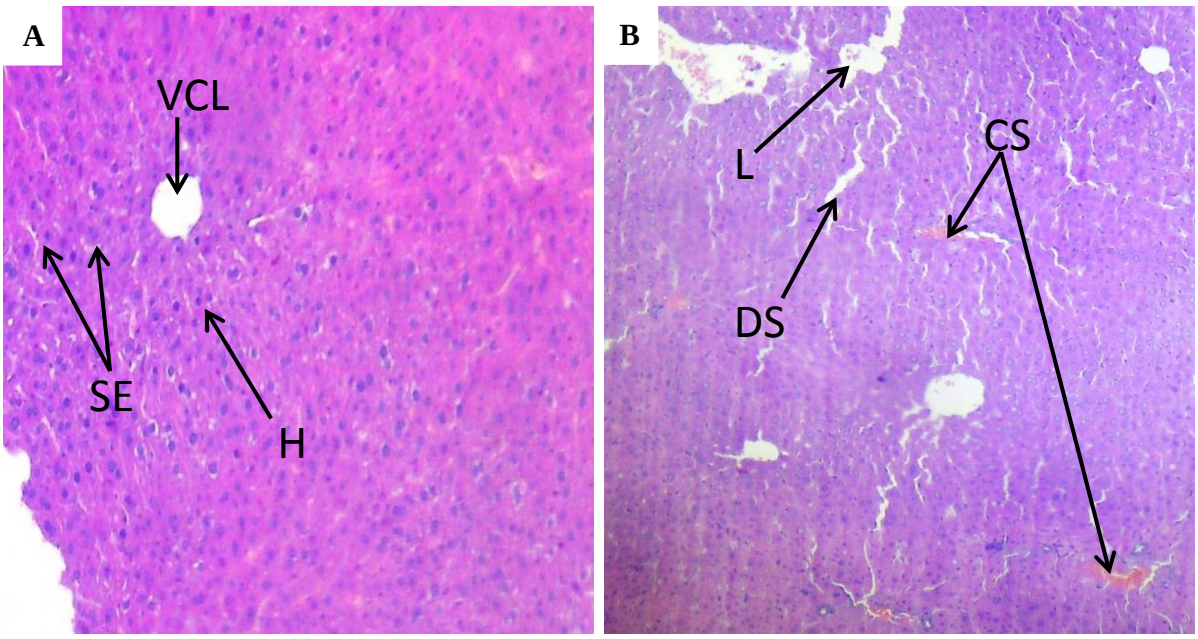

Figure 20. Micrographe des coupes histologiques dans le rein des souris : **A**) Témoin. **B**) Traité. (Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement x40). **G** : glomérule ; **T** : tubule ; **CV** : congestion vasculaire ; **IF** : infiltrat inflammatoire ; **CL** : cytolyse.

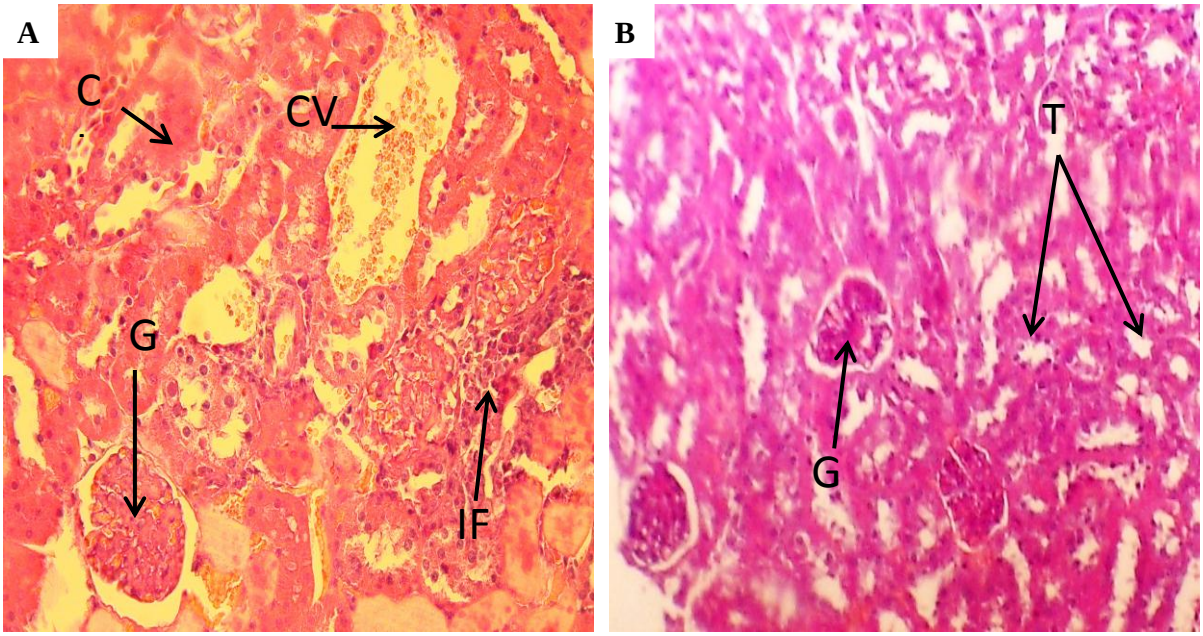

Figure 21. Micrographe des coupes histologiques dans le foie des souris : **A**) Témoin. **B**) Traité. (Coloration éosine-hématoxyline/Grossissement x40). **VCL** : veine centro-lobulaire ; **SE** : sinusoïde étroite ; **H** : hépatocyte ; **L** : lésion tissulaire ; **DS** : dilatation sinusoïdale ; **CS** : congestion sinusoïdale.

Discussions

1. Teneur des extraits des graines de *Peganum harmala* L. en polyphénols et en flavonoïdes

Les résultats obtenus après l'extraction des graines de *Peganum harmala* indiquent que cette plante contient une teneur remarquable de composés extractibles. Ainsi, il est clair que l'utilisation des solvants à polarités différentes a permis de séparer les différentes métabolites trouvés dans les graines selon leur degrés de solubilité dans le solvant d'extraction et leur complexité structurale (Kar, 2007).

Dans cette étude, les rendements des fractions obtenues diminuent dans le sens décroissant de la polarité des solvants (**Tableau 5).** Un tel résultat a été signalé aussi par Mariod et ses collaborateurs (2009), qu'ils ont étudiés les différentes fractions des graines de *Nigella sativa* L. D'un autre part, le rendement de l'EBr (20.18%) est supérieur à 1.65%, 5.08% et 18.62% rapportés dans des études précédentes réalisées par Fathiazed et ses collaborateurs (2006), Singh et ses collaborateurs (2008) et Baghiani et ses collaborateurs (2012), ayant utilisé d'autres méthodes d'extraction. En comparaison avec les résultats de Farouk et ses collaborateurs (2009), ces extraits donnent des rendements légèrement inférieurs, à l'exception de l'EAq* qui est hautement supérieur (16.45%) à celui édité par le même auteur (6.1%). Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps, la température et le solvant utilisé dans l'extraction (Su *et al.*, 2006).

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes indique la présence de ces deux métabolites secondaires dans tous les extraits (**Tableau 5 et 6**). La comparaison de nos résultats avec ceux trouvés par Baghiani et ses collaborateurs (2012) montre que l'ECh est toujours la fraction la plus riche en composés phénoliques, suivie par l'EAe et l'EBr, sachant que ces fractions ont montré une faible teneur (66.29, 58.1, et 27.91mg EAG/g, respectivement) par rapport à celle

trouvée dans la présente étude (164.64, 65.69, et 79.73mg EAG/g). Différemment, les mêmes fractions donnent une teneur en flavonoïdes relativement inférieur à celle rapporté par le même auteur (Baghiani *et al.,* 2012), à l'exception de l'ECh qui est supérieur (38.99mg EQ/g).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres types des graines, tel que les graines de *Nigella sativa* L. (Meziti, 2009). Le dosage des polyphénols totaux dans leurs différents extraits montre que l'ECh est la fraction la plus riche, alors que l'EHx ne contient qu'une faible quantité des polyphénols.

La différence dans le contenue phénolique (y compris les flavonoïdes) décrit dans la littérature peut être attribué à plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction et la méthode de quantification. Par ailleurs, les facteurs climatiques et environnementaux (la zone géographique et la sécheresse), la période de la récolte et le stade de développement de la plante peuvent également influencer l'estimation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes (Locatelli *et al.,* 2010).

Le rapport entre la teneur en polyphénols et celle des composés extractibles indique que, dans tous les extraits, plus de 80% des composés sont des composés non phénoliques. Généralement, les lipides, les protéines, les résines et les cires constituent une partie majoritaire dans les graines (Ismail *et al.,* 2010). Ainsi, plusieurs auteurs ont déjà montré que les métabolites secondaires les plus abandons dans les graines de *Peganum harmala* sont les alcaloïdes β-carboliniques et quinazoliniques avec un pourcentage d'environ 10% (Khashimov, 1969 ; Zharekeev, 1974 ; Kartal *et al.,* 2003 ; Frison *et al.,* 2008).

2. Activité antioxydante des extraits des graines de *Peganum harmala* L.

Plusieurs méthodes ont été utilisées, dans des travaux précédentes, pour déterminer l'activité antioxydante des plantes (Krishnaiah *et al.*, 2010 ; Baghiani *et al.*, 2012). Dans notre présente étude deux méthodes différentes ont été impliquées pour évaluer l'activité antioxydante des graines de *Peganum harmala*. Ces deux méthodes sont basées sur deux mécanismes antioxydants différents : l'effet piégeur des radicaux libres, évalué par le test du DPPH, et l'inhibition d'auto-oxydation des lipides en utilisant le test du blanchissement de β-carotène.

2.1. Effet piégeur envers le radical DPPH

Le DPPH$^{\bullet}$ est un radical libre synthétique de couleur violée foncée. C'est le radical le plus utilisé dans l'analyse de l'activité anti-radicalaire des substances bioactives contenus dans les extraits des plantes médicinales (Kubola et Siriamornpun, 2008) pour deux raisons :

* Leur absorbance maximale à 517nm, ce qui permet donc d'évaluer l'activité anti-radicalaire, spectrophotométriquement, en mesurant toute diminution d'absorbance de DPPH.

* Leur grande stabilité, par rapport aux radicaux naturels (le radical hydroxyle et l'anion superoxide) et *vis-à-vis* d'autres réactions telles que la chélation métallique des ions ainsi que l'inhibition enzymatique (Locatelli *et al.*, 2010).

En présence de composés anti-radicalaires capables de donner un électron ou un atome d'hydrogène, le radical DPPH est réduit (**Figure 22**), conduisant donc à leur neutralisation en un composé non radicalaire (DPPH-H) de couleur jaune pâle. De ce fait, la couleur va se changer du violet au jaune et l'absorbance sera diminuée (Kubola et Siriamornpun, 2008).

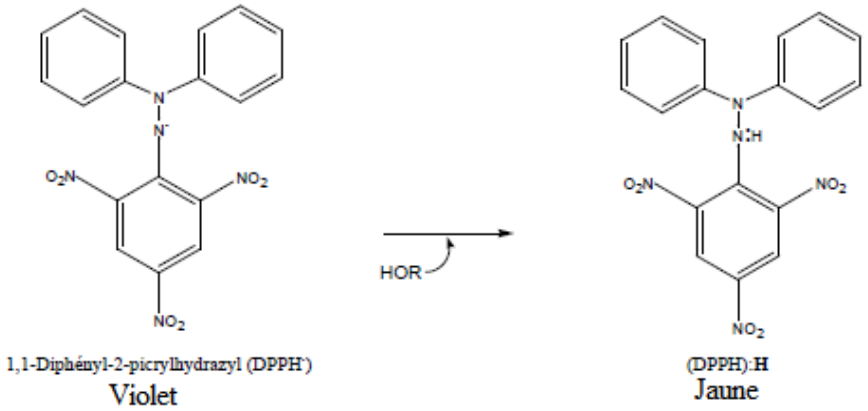

Figure 22. La réduction du radical DPPH (Popovici *et al.*, 2009).

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des différentes extraits de *Peganum harmala* **(Tableau 8, Figure 15)** indique que l'EBr est le plus actif avec une IC_{50}= 181 ± 1.73µg/ml. Tel résultat est supérieur à celui édité par Baghiani et ses collaborateurs en 2012 (100 ± 6.9µg/ml). Cependant, les fractions d'ECh et d'EAe (357µg/ml et 345µg/ml, respectivement) montrent un effet piégeur supérieur à ce qui est obtenu par le même auteur (744µg/ml et 711µg/ml, respectivement). L'activité anti-radicalaire est peut être liée à la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans ces extraits (Ismail *et al.*, 2010). Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Kouri *et al.*, 2007). Ce dernier réagit avec le radical DPPH en réduisant un nombre égal aux groupements hydroxyles portés par la molécule de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997).

Néanmoins, aucune corrélation significative n'a été remarquée entre la teneur des extraits en polyphénols ou en flavonoïdes et leurs activité envers le radical DPPH (R^2 = 0.134 et 0.002, respectivement, $p>0.05$). Cependant, d'autres études montrent que l'activité anti-radicalaire est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (Mariod *et al.*, 2009 ; Locatelli *et al.*, 2010). Ceci mène à suggérer que l'effet antioxydant des différentes extraits de notre plante peut être dû à un synergisme entre les polyphénols et d'autres composants.

D'ailleurs, plusieurs études ont déjà signalés l'activité antioxydante remarquable des alcaloïdes β-carboliniques (Tse *et al.,* 1991 ; Nevin et Vijayammal, 2005 ; Moura *et al.,* 2007). Tse et ses collaborateurs (1991) ont décrivit que les β-carbolines indoliques sont doués d'activité anti-radicalaire, en piégeant les radicaux libres (en particulier le radical $OH^{\bullet}$) et formant des radicaux indolyl stables. Ils ont mentionné aussi que les alcaloïdes, qui contiennent une substitution d'une fonction hydroxyle en présence d'un noyau pyridyl partiellement insaturé, exercent l'effet antioxydant le plus puissant (Tse *et al.,* 1991 ; Moura *et al*., 2007). De ce fait, l'activité anti-radicalaire envers le radical DPPH de nos extraits peut être attribuée à la richesse des graines de *Peganum harmala* en ce type d'alcaloïdes.

2.2. Test du blanchissement de β-carotène

Les radicaux peroxydes, provenant de l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir des groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique, attaquent le β-carotène hautement insaturé entraînant ainsi son oxydation et donc la disparation de leur couleur orange (Amarowicz *et al.,* 2010). Cependant, la présence des antioxydants dans le mélange réactionnel pourrait inhiber relativement l'oxydation de β-carotène. Cette inhibition est due probablement, soit à l'inhibition de l'auto-oxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux peroxydes formés durant leur oxydation (Tepe *et al.,* 2005).

Dans la présente étude, les différents extraits des graines de *Peganum harmala* montrent un effet antioxydant puissant, dont l'EHx est la fraction la plus potentielle suivie par l'EAe, l'ECh, l'EBr, l'EAq* et l'EAq **(Figures 16 et 17)**. Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Baghiani et ses collaborateurs (2012) où les pourcentages d'inhibition de l'oxydation de β-carotène de l'EAe, l'ECh et l'EBr suivent le même ordre décrit dans notre présent travail, mais avec des valeurs relativement supérieurs (94.21%, 86.24%, et 77.35% pour l'EAe, l'EBr, et l'ECh, respectivement).

Notons qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité inhibitrice (R^2 = 0.431 et 0.083, respectivement, p>0.05). Tel résultat concorde avec celui trouvé pour différentes types de graines dont aucune corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir inhibiteur envers l'oxydation lipidique n'a été enregistré (Choi *et al.,* 2007 ; Mariod *et al.,* 2009). La même constatation a été aussi mentionnée par Locatelli et ses collaborateurs (2010), qui suggèrent que l'inhibition de l'oxydation des lipides peut être expliquée par l'effet synergétique entre les polyphénols et d'autres classes des métabolites secondaires dans l'extrait de *Nocciola Piemonte* PGI.

L'EHx est une fraction assez complexe, elle peut contenir une variété de substances (cires, acides gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines) qui peuvent agir indépendamment ou en synergie (Kar, 2007). Cette fraction forme une bonne source d'antioxydants vue leur activité puissante envers l'inhibition de l'oxydation de β-carotène, qui n'est pas loin de celle de BHT (82.31%)**.**

Mariod et ses collaborateurs (2009) ont trouvé une inhibition maximale avec la même fraction, l'EHx des graines de *Nigella sativa* L. Ils ont indiqué qu'en plus de la contribution probable des antioxydants à l'activité de l'EHx, un autre paramètre semble intervenir ; la polarité de ces antioxydants. Au cours du dosage des polyphénols, tous les antioxydants polaires ou apolaires ont réagi. Cependant, dans le test du blanchissement de β-carotène, seuls les antioxydants apolaires sont intervenus, ce qui explique l'absence de la corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante (Mariod *et al.,* 2009).

Etant donné que ce test est basé sur un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer, (2000) ont proposés que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes que les antioxydants polaires. Dans ce système, les antioxydants apolaires sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et, par conséquent, l'oxydation de β-carotène. Cependant,

les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont, donc, moins efficaces (Frankel et Meyer, 2000). Cette proposition explique bien nos résultats dont les extraits apolaires (EHx, EAe, et ECh) ou moyennement polaires (EBr) exercent une activité inhibitrice supérieure à celle des extraits polaires (EAq* et EAq).

3. Effet toxique de l'extrait brut de *Peganum harmala* L.

3.1. Toxicité aiguë

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses qui sont, immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée (LeBlanc, 2010).

En effet, dans notre travail, nous avons remarqué que les animaux qui reçoivent une dose supérieure à 1g/kg montrent des changements de comportements et des signes d'intoxication plus ou moins graves (bradycardie, difficulté de respiration, tremblements, etc.) et entrent dans un état narcotique avec des périodes d'excitation occasionnelles ce qui conduit, finalement, à leur mort.

Mahmoudian et ses collaborateurs (2002) et Frison et ses collaborateurs (2008) décrivent des symptômes d'intoxication humaine et animale, par les graines de *Peganum harmala,* similaires à ceux observés dans notre étude **(Tableau 9)** : une somnolence, une anorexie, des troubles respiratoires, une bradycardie, des convulsions, ainsi un état de narcose avec des excitations occasionnelles. Ils ont rapporté que ces signes viennent suite à une atteinte du SNC et SNP. Une atteinte qui due, probablement, à la présence des alcaloïdes β-carboliniques tels que l'Harmine, l'Harmaline et le THH, ou des dérivés quinazoliniques : Péganine et Desoxypéganine dans les graines de *Peganum harmala* (Kartal *et al.,* 2003 ; Aniszewski, 2007).

L'Harmine et l'Harmaline sont des alcaloïdes capables d'activer certains types de récepteurs notamment ceux de la sérotonine et de la dopamine (Glennon *et al.*, 2000). La sérotonine est une monoamine dérivant de l'acide aminé Tryptophane et ayant un rôle de neurotransmetteur. Elle est présente, surtout, dans le tractus gastro-intestinal, les plaquettes sanguines et au niveau des neurones sérotoninergiques dans le cerveau. La sérotonine, largement distribuée dans le cerveau, est impliquée dans le contrôle de l'humeur et de la vigilance. De plus, elle joue un rôle majeur dans la régulation de la fonction neuroendocrine, et elle régule en outre les rythmes circadiens et saisonniers (Mahé *et al.*, 2004).

Selon Kim et ses collaborateurs (1997), Herraiz et Chaparro, (2005) et Herraiz et ses collaborateurs (2010), l'Harmine et l'Harmaline peuvent agir, également, comme des inhibiteurs sélectifs, compétitifs et réversibles des MAO-A. Ces derniers sont des enzymes préférentiellement responsables de la régulation et de la dégradation de la sérotonine et des catécholamines (noradrénaline et adrénaline) dans les terminaisons pré-synaptiques (Fusciardi et Lebrun, 1998). D'un autre part, le THH peut inhiber la recapture synaptique de la sérotonine (Frison *et al.*, 2008).

Ensemble, ces activités mènent à l'accumulation de la sérotonine et des catécholamines dans les tissus y présentes et, par conséquent, à un phénomène dit Syndrome hypersérotoninergique, dont l'effet antidépressif, l'hypothermie permanente, l'hyperactivité neuromusculaire (tremblements), la bradycardie, les hallucinations et les convulsions, représentent les principaux symptômes (Stahl et Felker, 2008 ; Herraiz *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il convient de souligner la présence des alcaloïdes quinazoliniques, notamment, la Péganine et la Desoxypéganine dans les graines de *Peganum harmala*. Comme le montre Tuliaganov et ses collaborateurs en 1986, ces deux alcaloïdes peuvent provoquer une dépression marquée de l'activité des AChE chez les animaux, dont le mécanisme reste méconnu. L'acétylcholine est un neurotransmetteur très important libéré dans les synapses

cholinergiques, dont leur rôle majeur est la transmission de l'influx nerveux à travers ces synapses situées dans le SNC, SNP et dans les jonctions neuromusculaires (LeBlanc, 2010). A ce niveau, les AChE situés dans la fonte synaptique sont activés. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser immédiatement l'acétylcholine et donc de stopper le flux nerveux. Cependant, une inhibition de l'activité de l'AChE conduit à l'accroissement de la transmission nerveuse cholinergique, qu'il peut se manifester par un renforcement du tonus vagal (bradycardie) et d'autres effets adverses les plus importants parmi lesquels sont les troubles de visions, les convulsions, la faiblesse, les nausées et enfin la mort par un arrêt respiratoire (Timbrell, 2000).

A l'issue du test d'évaluation de la toxicité aiguë, la DL_{50} est estimé par 2.8585g/kg en cas d'administration orale de l'extrait brut (**voir Résultats**). Selon l'échelle de la toxicité des substances chimiques par voie orale pour les rongeurs d'après Hodge et Sterner (Frank, 1992), la valeur de la DL_{50} (2.8585g/kg) permet de classer cet extrait comme une substance légèrement toxique. En tenant compte du rendement de l'extrait brut (20.18%), il apparait que la DL_{50} de la plante est supérieure à 14.16g des graines de *Peganum harmala* par kilogramme du poids corporel, ce qui donne une bonne marge de sécurité pour l'utilisation traditionnel ce cette plante.

En comparant ces résultats avec d'autres travaux, la valeur de DL_{50} estimée dans la présente étude est très proche de celle édité par Lamchouri et ses collaborateurs en 2002, qu'ils ont trouvé une DL_{50} égale à 2.7g/kg chez les rats traités oralement par l'extrait aqueux. Différemment, Muhi-eldeen et ses collaborateurs (2008) ont déterminé la DL_{50} de l'extrait des alcaloïdes totaux, en utilisant 200, 300, 350, 400, 450, 500, et 550mg/kg par voie intramusculaire. Elle a été égale à 420mg/kg. Cette valeur est nettement inférieure à celle trouvée dans notre expérience. Toutefois, il faut noter que pour ces auteurs, la technique de d'extraction diffère totalement de la nôtre, le type d'animaux choisi (rat), la méthode de

détermination de la DL_{50} (*Litchifield* et *Wilcoxon*), ainsi que la variabilité génétique des graines entre la Jordanie et l'Algérie.

3.2. Toxicité subaiguë

Le traitement subaigu, pendant quatre semaines et à la dose de 285.8mg/kg, n'a induit aucun effet toxique immédiat. Autrement, les animaux traités sont très calmes et présentent une remarquable anorexie et somnolence par rapport aux témoins. Ceci peut être dû aux conditions de manipulation qui soumettent les animaux en état de stress. Toutefois, après une période de stabulation, ils recommencent leur vie habituelle (Muibat *et al.*, 2007).

Le suivi de l'évolution pondérale, le long de la période d'étude, a montré la présence d'une perte faiblement significative en poids ($p<0.05$) chez les animaux traités dans la dernière semaine comparativement aux témoins (**Tableau 12**). Pareillement, d'autres auteurs ont montré aussi l'effet de l'administration orale des extraits des plantes médicinales sur le poids corporel des animaux (Rhiouani *et al.,* 2008 ; Lakmichi *et al.,* 2011). Le changement du poids est utilisé comme un indicateur général des effets indésirables des composés chimiques (El-Hilaly *et al.,* 2004). Ainsi, la perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal et peut être expliquée, non seulement par l'anorexie (Betti *et al.,* 2012), mais aussi par l'altération du métabolisme des animaux (Mukinda et Syce, 2007).

Le changement du poids des organes est un bon indice de toxicité après l'exposition à une substance chimique (Raza *et al.,* 2002 ; Teo *et al.,* 2002). Dans le présent travail, l'examen macroscopique des organes vitaux *in situ* et le calcul de la masse relative pour chaque organe, n'a montré aucun changement significatif dans le poids des organes ($p<0.05$), à l'exception d'une faible augmentation significative (14.87%) dans la masse relative des reins (**Tableau 13).** Cette élévation peut être liée à une congestion par la réservation du sang dans le tissu rénal (Rasekh *et al.,* 2008), ou par la présence d'un infiltrat inflammatoire (Betti *et al.,* 2012).

Ceci a été bien confirmé par l'analyse histologique dont laquelle une importante congestion vasculaire rénale associé à des infiltrats inflammatoires ont été enregistrés (**Figure 21**).

Le système hématopoïétique est l'un des cibles les plus sensibles aux substances toxiques. Il représente un marqueur important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007 ; Li *et al.,* 2010). C'est pour cela, que tout changement dans les paramètres hématologiques a une valeur prédictive pour l'intoxication humaine, lorsque les données sont traduites à partir des études réalisées sur des animaux (Olson *et al.,* 2000 ; Rhiouani *et al.,* 2008).

Dans la présente étude, une diminution dans les taux des GR et d'Hémoglobine accompagnée d'une élévation des GB ont été aperçus **(Tableau 14)**. Ces résultats ne rassemblent pas à ceux édités par Muhi-eldeen et ses collaborateurs (2002), dont aucune perturbation des valeurs hématologiques n'a été rapportée chez les rats traités pendant 6 semaines par l'extrait des alcaloïdes des graines de *Peganum harmala*, à l'exception de l'augmentation du nombre des leucocytes suite à l'inflammation causée par l'injection intramusculaire.

La réduction du nombre des GR, associée à la diminution d'Hémoglobine, indique la présence d'une anémie. Celle-ci peut être expliquée par la diminution dans l'érythropoïèse (synthèse des cellules sanguines), la diminution dans la synthèse de l'hémoglobine et/ou par l'hémolyse des globules rouges (Hariri *et al.,* 2011). Ainsi, de nombreuses études ont rapporté l'activité hémolytique des saponines, lorsqu'ils sont additionnés à une suspension des hématies, *in vitro* (Khalil et El-Adawy, 1994 ; Arias *et al.,* 2010). Par conséquent, n'importe quel extrait contient des saponines est capable de provoquer une anémie hémolytique (Qin *et al*., 2009). En fait, El Allagui et ses collaborateurs (2006) ont été déjà décrivit la présence des saponines dans les différents extraits de *Peganum harmala*, néanmoins, les effets et les structures de ces saponines restent méconnus. En outre, l'élévation du taux des GB chez les souris traitées indique directement un renforcement du système immunitaire (Hariri *et al.,* 2011). Ceci

suggère que l'extrait brut de *Peganum harmala* renferme des substances bioactives qui ont un pouvoir amplificateur de la réponse immunitaire en augmentant le taux des globules blancs : le premier niveau défensif dans l'organisme (Atsamo *et al.*, 2011).

La plus grande partie de composés toxiques, y compris les métabolites secondaires des plantes médicinales, s'accumulent dans le foie où ils sont détoxifiés (Reichl, 2004). De ce fait**,** une étude de la fonction hépatique peut donc s'avérer utile dans l'évaluation des effets toxiques des plantes médicinales sur le foie. L'ALAT, l'ASAT et la PAL sont les principaux enzymes utilisés dans le but d'évaluer l'état de la fonction hépatique (Wallace et Meyer, 2010). En général, l'ASAT et l'ALAT sont des enzymes d'origine mitochondriale et cytoplasmique. Ainsi, tout nécrose cellulaire, destruction du parenchyme hépatique ou une augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes peut mener à l'écoulement de ces enzymes dans la circulation sanguine et donc à l'augmentation de leurs taux sériques (Adeneye *et al.*, 2006 ; Jodynis-Liebert *et al.*, 2010). D'un autre part, la PAL est une enzyme ubiquitaire, en particulier dans le foie, les voies biliaires, les reins, l'os et le placenta, où elle est très concentrée. Leur augmentation dans la circulation indique généralement la présence d'une obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques, d'une cirrhose biliaire primitive ou d'une désorganisation de l'architecture hépatique (Akhtar *et al.*, 2012). Un autre indicateur semble intervenir dans l'évaluation des fonctions hépatiques, la bilirubine, produit de la dégradation de l'hémoglobine. L'hyper-bilirubinémie peut être un signe des dommages des tissus hépatiques, d'une obstruction des voies biliaires ou d'une anémie hémolytique (Atsamo *et al.*, 2011 ; Hor *et al.*, 2011).

Le traitement subaigu pendant quatre semaines par l'extrait brut de *Peganum harmala* n'a pas influencé le taux sériques des transaminases (ASAT et ALAT) **(Tableau 14**). Le contraire a été rapporté par Lamchouri et ses collaborateurs (2002), selon lequel le traitement chronique (12 semaines) par l'extrait des alcaloïdes augmente significativement le taux de ces enzymes

chez les rats traités. Ceci peut être attribué à la différence de la dose administrée (2000mg/kg et 285.5mg/kg) ainsi que la durée de traitement (12 et 4 semaines).

De plus, aucune modification significative dans la concentration du Glucose, des TG et du Cholestérol n'a été constatée. Ces derniers paramètres donnent des informations sur l'état du métabolisme hépatique glucidique et lipidique (Li *et al.*, 2010). Différemment, d'autre auteurs ont prouvé l'effet hypoglycémiant des graines de *Peganum harmala* (Singh *et al.*, 2008), où ils ont montré que l'extrait éthanolique est capable de réduire le taux du glucose sérique chez les deux types des rats : normaux et rendu-diabétiques, dont le mécanisme reste mal élucidé.

Globalement, l'absence de tout changement dans ces paramètres (ASAT, ALAT, Glucose, TG, Cholestérol) indique que l'extrait brut de *Peganum harmala* n'a pas d'effet sur la perméabilité membranaire cellulaire et le métabolisme hépatique lipidique et glucidique, et par conséquent, sur les hépatocytes (Jodynis-Liebert *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2010).

Par contre, la présente étude a montré une élévation significative dans le taux sérique de la PAL et de la Bilirubine chez les souris traitées comparativement aux témoins **(Tableau 14).** Ceci mène à suggérer que cette plante est capable de provoquer des effets indésirables directs sur le parenchyme hépatiques et plus précisément sur les voies ou les canalicules biliaires chez les animaux (Atsamo *et al.*, 2011 ; Akhtar *et al.*, 2012). Un résultat qui est en accordance avec l'examen du tissue hépatique, dont une lésion tissulaire, une discrète congestion et dilatation sinusoïdale avec des hépatocytes intacts, ont été aperçus (**Figure 20**).

Le bilan rénal sert à dépister un éventuel dysfonctionnement du rein. Il comprend en première approche quelques examens biochimiques nécessaires qui seront complétés par des analyses des urines et des examens morphologiques (Timbrell, 2000).

Le traitement subaigu dans ce travail, pendant quatre semaines, n'a pas influencé la concentration sérique en Créatinine. Par contre, une élévation significative a été produite dans

le niveau de l'AU **(Tableau 14).** La créatinine représente le marqueur biologique majeur de l'altération rénal (Jodynis-Liebert *et al.,* 2010**)**. C'est un produit de la dégradation non-enzymatique de la créatine, un composé protéique contenu dans le tissu musculaire, et elle est strictement éliminé par les reins. Ainsi, le changement dans leur niveau sérique est un indicateur fiable des troubles concernant la filtration glomérulaire et le dysfonctionnement rénal (Mukinda et Eagles, 2010). De ce fait, l'absence du changement dans le taux sérique de la créatinine mène à suggérer que l'extrait brut n'a pas d'effet direct dur la filtration glomérulaire. Toutefois, l'augmentation de la concentration sérique d'acide urique pourrait être expliquée par une élévation de la dégradation des composés protéiques, mais aussi par une atteinte de la fonction rénale (Lùllmann *et al.,* 1998).

De plus, les résultats des analyses urinaires sont tout à fait normaux, à l'exception d'une faible augmentation dans le glucose urinaire (100mg/dL). Dans le rein, le glucose, présent dans le filtrat glomérulaire, est totalement réabsorbé dans les tubules, donc, toute augmentation du taux de glucose dans les urines, en absence d'hyperglycémie, indique une déficience tubulaire (Marchall et Bangert, 2004). En effet, le tissu rénal est nettement endommagé et son aspect histologique indique la présence d'une atteinte cellulaire tubulaire avancée (**Figure 21**).

Histologiquement, l'examen a révélé une conservation générale du parenchyme hépatique et rénal. Cependant, des anomalies tissulaires rénales (cytolyse, infiltrat inflammatoire et une importante congestion vasculaire) et hépatiques (lésions tissulaires, congestions vasculaires et sinusoïdales) ont été envisagés (**Figure 21 et 22**).

Ces résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par Muhi-eldeen et ses collaborateurs (2002), dont aucune anomalie structurale n'a été signalée dans tous les tissus, y compris le foie et le rein, chez les rats traités par l'extrait des alcaloïdes. Cela peut être expliqué par la différence dans la méthode d'administration utilisée (Intramusculaire et orale), le choix de l'animal (Rat et souris) ou l'extrait utilisé (brut et d'alcaloïdes).

Bien que le mécanisme exact de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité induites par l'extrait brut de *Peganum harmala* ne soient pas bien élucidé, il est possible que les anomalies observées dans ces deux organes cibles soient due à la présence des composés toxiques, en particulier, les alcaloïdes β-caroboliniques, dont la cytotoxicité est bien investigué *in vitro*.

Lamchouri et ses collaborateurs (2000) ont déjà montré que l'extrait des graines de *Peganum harmala* inhibe la prolifération des cellules tumorales dans les premiers 24 heures après leur traitement. Au-delà de cette période, l'extrait commence à provoquer une cytolyse en inhibant la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Ces résultats ont été confirmés par la suite dans les travaux de Nafisi et ses collaborateurs (2010), qui démontrent que l'Harmine, l'Harman et l'Harmaline sont doués du pouvoir cytotoxique puisqu'ils sont capables d'intercaler entre les bases azotés d'ADN et d'aboutir à la mort cellulaire. En plus, cette particularité a été utilisée pour interpréter l'activité inhibitrice de l'ADN Topo-isomérase I par l'extrait des graines de *Peganum harmala* (Sobhani *et al.*, 2002).

Conclusion et perspectives

Peganum harmala L., est une plante administrée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle. Malgré son utilisation dans la région méditerranéenne et le Moyen-Orient comme un agent abortif, emménagogue, vermifuge, antidépressif et anticancéreux, *Peganum harmala* reste mal employée dans la phytothérapie moderne car elle présente des risques de toxicité.

Dans la présente étude, l'extraction brute et le fractionnement par les différents solvants suivis d'une étude phytochimique préliminaire indique la richesse des graines de *Peganum harmala* en composés phénoliques avec une teneur importante en flavonoïdes, qui sont dotées d'un pouvoir antioxydant remarquable.

L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé que les extraits EBr, EAq* et EHx sont les plus actifs comme des piégeurs du radical DPPH, comparativement à l'acide gallique et BHT. En revanche, les extraits EHx et EBr ont montrés une activité inhibitrice remarquable de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle de β-carotène, cependant aucune corrélation n'a été constatée entre l'activité antioxydante des extraits et leur richesse en polyphénols et flavonoïdes. Cela suggère la participation d'autres molécules qui pouvant être des alcaloïdes.

Par ailleurs, la DL_{50} déterminée graphiquement a permis de classer les graines de *Peganum harmala* dans la catégorie des substances légèrement toxiques selon l'échelle de Hodge et Sterner. Toutefois, le traitement subaigu des souris femelles pendant quatre semaines perturbent quelques paramètres hématologiques, biochimiques et urinaires. L'examen anatomopathologique indique la présence des plusieurs anomalies au niveau du parenchyme hépatique et rénale allant des petites congestions vasculaires à la cytolyse et la lésion tissulaires.

De plus, on arrive à conclure que malgré la potentielle activité antioxydante observée avec les différents extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala*, l'usage prolongé de cette plante pourrait manifester un ensemble de troubles fonctionnelles rénales et hépatiques.

Néanmoins, ce travail reste préliminaire et plus superficiel, et il nécessite, donc, d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. La contribution à la recherche de propriétés antioxydants à partir des graines de cette plante est introductive. Celle-ci constitue une estimation d'une éventuelle activité antioxydante *in vivo* qui pourrait, également, prévenir contre plusieurs maladies et altérations tissulaires.

De même, des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés des graines de *Peganum harmala* L. (notamment ce qui concerne l'identification et la purification des composés phénoliques et des flavonoïdes) qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs effets antioxydants et cytotoxiques.

Références bibliographiques

1. Ababsa Z (2009). Caracterisation Pharmacotoxicologique et Etude Phytochimique De *Centaurea Dimorpha*. Thèse de Magistère. *Université Mentouri* (Constantine, Algérie).

2. Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, & Bello SO (2006). Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **105:** 374-379.

3. Agedilova M, Turmukhambetov A, Schultz E, Shakirov M, & Adekenov S (2006). Components of the aerial part of *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42:** 226-227.

4. Akhtar A, Deshmukh AA, Raut CG, Somkuwar AP, & Bhagat SS (2012). Prallethrin induced serum biochemical changes in Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **102:** 160-168.

5. Alexandrova ML & Bochev PG (2007). Oxidative Stress in Stroke. **In:** Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **1st ed**. *Elsevier BV.* (Amesterdam), 313-368.

6. Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Robredo S, TEROzynska A, Kosinska A, & Pegg RB (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, **121:** 705-711.

7. Aniszewski T (2007). Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. **In:** Alkaloids - Secrets of Life. *Elsevier* (Amsterdam), 1-59.

8. Arias M, Quijano JC, Haridas V, Gutterman JU, & Lemeshko VV (2010). Red blood cell permeabilization by hypotonic treatments, saponin, and anticancer avicins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798:** 1189-1196.

9. Arshad N, Neubauer C, Hasnain S, & Hess M (2008). *Peganum harmala* can minimize *Escherichia coli* infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poultery Science*, **87:** 240-249.

10. Asilbekova D (2006). Lipids from the aerial part of *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42:** 223-225.

11. Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F, & Özkan H (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharmacological Biology*, **44:** 247-252.

12. Atsamo AD, Nguelefack TB, Datté JY, & Kamanyi A (2011). Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **134:** 697-702.

13. Baghiani A, Djarmouni M, Boumerfeg S, Trabsa H, Charef N, Khennouf S, & Arrar L (2012). Xanthine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of *Peganum harmala* Seed Extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, **1:** 42-56.

14. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, & Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Drug Research*, 1-6.

15. Baynes RE & Hodgson E (2010). Absorption and Distribution of Toxicants. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 79-114.

16. Bensalem-bendjelloul M (1998). Techniques histologiques théorie et pratique. *Office des publications universitaires*, 6-41.

17. Berrougui H, Martin-Cordero C, Khalil A, Hmamouchi M, Ettaib A, Marhuenda E, & Herrera MD (2006). Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seeds in isolated rat aorta. *Pharmacological Research*, **54:** 150-157.

18. Betti HA, Betti HA, Stein AC, Dallegrave E, Barth Wouters AT, Negrão Watanabe TT, Driemeier D, Buffon A, & Kuze Rates MS (2012). Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. *Food and Chemical Toxicology* (In press).

19. Bhadauria D & Agrawal N (2012). Toxic acute kidney injury . *Clinical Queries: Nephrology*, **101:** 29-33.

20. Bondet V, Williams WB, & Berset C (1997). Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **30:** 609-615.

21. Brielmann HL, Setzer WN, Kaufman PB, Kirakosyan A, & Cseke LJ (2006). Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. **In:** Natural Products From Plants. **2nd ed**. *CRC Tylor & Francis* (Boca Raton, Florida), 1-49.

22. Burits M & Bucar F (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14:** 323-328.

23. Choi Y, Jeong HS, & Lee J (2007). Antioxidant activity of methanolic extracts from some graines consumed in Korea. *Food Chemistry*, **103:** 130-138.

24. Crespo A, Turjanski AG, & Estrin DA (2002). Electronic spectra of indolyl radicals: a time-dependent DFT study. *Chemical Physics Letters*, **365:** 15-21.

25. Darabpour E, Bavi AP, Motamedi H, & Seyyed Nejad SM (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* l. Growing in iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI Journal*, **10:** 252-263.

26. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, & Vidal N (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97:** 654-660.

27. Drögue W (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, **82:** 47-95.

28. Duke AJ (2002). Handbook of Medicinal Plants. **2nd ed**. *CRC Press* (Boca Raton, Florida), 717.

29. El Allagui N, Bourijate M, Tahrouch S, & Hatimi A (2006). Effet de cinq extraits végétaux sur *meloidogyne* spp de la tomate. *Congrés Internationel de Biochimie* (Agadir), 357-360.

30. El Allaoui A, Rhazi Filali F, Oumokhtar B, & Ibijbijen J (2011). Evaluation De La Toxicité Aigue Du Colorant (Rhodamine B) Utilisé Dans La Fabrication Des Saucisses Traditionnelles Dans La Ville De Meknès Au Maroc. *Science Lib*, **3:** 1-15.

31. El Hilaly J, Israili ZH, & Lyoussi B (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, **91:** 43-50.

32. Farouk L, Laroubi A, Ouachrif A, Aboufatima R, Benharref A, & Chait A (2009). Study on Antinociceptive Activity of Different Extracts of *Peganum Harmala* and Possible Mechanism of Action. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, **8:** 29-35.

33. Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, & Chait A (2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology*, **115:** 449-454.

34. Fathiazed F, Azarmi Y, & Khodaie L (2006). Pharmacological Effects of *Peganum harmala* Seeds Extract on Isolated Rat Uterus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2:** 81-86.

35. Favier A (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

36. Frank CLU (1992). Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. (Paris), 73-202.

37. Frankel EN & Meyer AS (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80:** 1925-1940.

38. Frison G, Favretto D, Zancanaro F, Fazzin G, & Ferrara SD (2008). A case of ß-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Science International*, **179:** e37-e43.

39. Fusciardi J & Leburn F (1998). Anesthésie et maladie de Parkinson. *MAPAR*, 93-105.

40. Georgé S, Brat P, Alter P, & Amiot JM (2005). Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53:** 1370-1373.

41. Gérolani R (2005). Manifestations de l'action des toxiques au niveau hépatique. **In:** Toxicologie. **2nd ed**. *Lavoisier* (Paris), 167-172.

42. Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, Smith C, Egan C, Davis K, & Mattson MV (2000). Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, **60:** 121-132.

43. Hariri AT , Moallem SA, Mahmoudi M, & Hosseinzadeh H (2011). The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. *Phytomedicine*, **18:** 499-504.

44. Herraiz T, González D, Ancìn-Azpilicueta C, Arán VJ, & Guillén H (2010). ß-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, **48:** 839-845.

45. Herraiz T & Chaparro C (2005). Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysics Researchs Communuty*, **326:** 378-386.

46. Hodgson E & Cunny H (2010). Toxicity Testing. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 409-456.

47. Hodgson E & EROe RL (2010). Metabolism of Toxicants. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 115-167.

48. Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Lim CP, Asmawi MZ, & Yam MF (2011). Acute and subchronic oral toxicity of Coriolus versicolor standardized water extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **137:** 1067-1076.

49. Hsu Y, Tsai CF, Chen WK, Huang CF, & Yen CC (2011). A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. *Food and Chemical Toxicology*, **49:** 2624-2630.

50. Ismail HI, Chan KW, Mariod AA, & Ismail M (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, **119:** 643-647.

51. Jodynis-Liebert J, Nowicki M, Murias M, Adamska T, Ewertowska M, Kujawska M, Piotrowska H, Konwerska A, Ostalska-Nowicka D, & Pernak J (2010). Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethylammonium saccharinate, in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **57:** 266-273.

52. Kalam S, Singh R, Mani A, Patel J, Naem KF, & Pandey A (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, **1:** 18-34.

53. Kar A (2007). Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. **2nd ed**. *New Age International (P) Limited* (Daryaganj, New Delhi), 122-777.

54. Kartal M, Altun ML, & Kurucu S (2003). HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *Journal of Pharmcological and Biomedical Analysis*, **31:** 263-269.

55. Khalil AH & El-Adawy TA (1994). Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. *Food Chemistry*, **50:** 197-201.

56. Khashimov K, Telezhenetskaya M, & Yunusov S (1969). Desoxypeganine: A new alkaloid from *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **5:** 381-382.

57. Khattabi A, Rhalem N, Chabat A, Skali S, & Soulaymani-Bencheich R (2010). Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc*, **2:** 3-4.

58. Kiani SJ, Shamsi Shahrabadi M, Ataei A, & Sajjadi N (2008). *Peganum harmala* seed extract can prevent HSV-1 replication *in vitro*. *Iranian Journal of Virology*, **4:** 11-16.

59. Kim H, Sablin SO, & Ramsay RR (1997). Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Archives of Biochemistery and Biophysics*, **337:** 137-142.

60. Kouri G, Tsimogiannis D, Haido Bardouki H, & Oreopoulou V (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative of Food Science and Emerging Technolgy*, **8:** 155-168.

61. Krishnaiah D, Sarbatly R, & Nithyanandam R (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* (In press).

62. Kubola J & Siriamornpum S (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, **110:** 881-890.

63. Kurachko K, Umarov A, & Markman A (1969). The oil of the seeds of *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **5:** 358-359.

64. Lacarelle B & Viala A (2005). Manifestations de l'action des toxiques au niveau rénal. **In:** Toxicologie. **2nd ed**. *Lavoisier* (Paris), 173-177.

65. Lakmichi H, Bakhtaoui FZ, Gadhi CA, Ezoubeiri A, El-Jahiri Y, El-Mansouri A, Zrara I, & Loutfi K (2011). Toxicity Profile of the Aqueous Ethanol Root Extract of *Corrigiola telephiifolia* Pourr. (Caryophyllaceae) in Rodents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.

66. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, El Hamidi M, Tligui NS, Lyoussi B, & Hassar M (2002). Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds (Abstract). *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **60:** 123-129.

67. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Hassar M, Zemzami M, Atif N, Nadori EB, Zaid A, & Lyoussi B (2000). *In vitro* cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*, **71:** 50-54.

68. Lapointe G (2004). Notions de Toxicologie. **2nd ed**. *Commission de la santé et de la sécurité du travail* (Québec, Canada), 16-20.

69. LeBlanc GA (2010). Acute toxicity. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 125-236.

70. Lev N, Gilgun-Sherki Y, Offen D, & Melamed E (2007). The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple ScleEROis: Current State. **In:** Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **1st ed**. *Elsevier BV.* (Amsterdam), 283-295.

71. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, & Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102:** 771-776.

72. Li X, Luo Y, Wang L, Li Y, Shi Y, Cui Y, & Xue M (2010). Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalski*i Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **131:** 110-115.

73. Locatelli M, Travaglia F, Coisson JD, Martelli A, Stevigny C, & Arlorio M (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte* PGI) : Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*, **119:** 1647-1655.

74. Lùllmann H, Mohr K, & Ziegler A (1998). Atlas de poche de pharmacologie. **2nd ed**. *Médecine-Sciences, Flammarion* (Paris), 32-42

75. Mahé C, Bernhard M, Bobirnac I, Keser C, Loetscher E, Feuerbach D, Dev KK, & Schoeffter P (2004). Functional expression of the serotonin 5-HT7 receptor in human glioblastoma cell lines. *British Journal of Pharmacology*, **143:** 404-410.

76. Mahmoudian M, Jalilpour H, & Salehian P (2002). Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a Case Report . *Iranian Journal of Pharmacology*, **1:** 1-4.

77. Marchall WJ & Bangert SK (2004). Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic. **5th ed**. *Elsevier* (France), 59-87.

78. Marfak A (2003). Radiolyse gamma des flavonoides: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools (Formation des depsides). Thèse de Doctorat. *Faculté de Pharmacie, Université de Limoges* (France).

79. Markham KR (1982). Chapter.1 and 2. Techniques of flavonoid identification. *Academic press*, (London), 1-113.

80. Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, & Ismail N (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, **116:** 306-312.

81. Matés JM (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, **38:** 595-603.

82. Mbiantcha M, Kamanyi A, Teponno RB, Tapondjou LA, Watcho P, & Nguelefack TB (2011). Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Extracts from the Bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* (Dioscoreaceae) in Mice and Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.

83. Meziti A (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. : étude *in vitro* et *in vivo*. Thèse de Magistère. *Département des sciences biologiques-Université Ferhat Abbes* (Sétif, Algérie).

84. Miller HE (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **48:** 91.

85. Moghadam MS, Maleki S, Darabpour E, Motamedi H, & Seyyed Nejad SM (2010). Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime restistant *Staphylococcous aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3:** 262-265.

86. Monsef HR, Ghobadi A, Iranshahi M, & Abdollahi M (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, **7:** 65-69.

87. Moura DJ, Richter MF, Boeira JM, Pegas Henriques JA, & Saffi J (2007). Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, **22:** 293-302.

88. Muhi-eldeen Z, Al-Shamma KJ, Al- Hussainy TM, Al- Kaissi EN, Al-Daraji AM, & Ibrahim H (2008). Acute Toxicological Studies on the Extract of Iraqi *Peganum Harmala* in Rats. *European Journal of Scientific Research*, **22:** 494-500.

89. Muibat BA, Omoniyi K, Yemitan O, & Adeyemi O (2007). Toxicological assessment of the aqueous root extract of *Sanseviera liberica* gerome and Labroy (Agavaceae). *Journal of Ethnopahrmacology*, **113:** 171-175.

90. Mukinda JT & Syce JA (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **112:** 138-144.

91. Mukinda TJ & Eagles FKP (2010). Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **128:** 236-240.

92. Nafisi S, Bonsaii M, Maali P, Khalilzadeh MA, & Manouchehri F (2010). Beta-carboline alkaloids bind DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **100:** 84-91.

93. Nenaah G (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, **81:** 779-782.

94. Nevin KG & Vijayammal PL (2005). Effect of *Aerva lanata* against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **20:** 471-477.

95. Niki E (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, **49:** 503-515.

96. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, & Heller A (2000). Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **32:** 56-67.

97. Pandey KB & Rizvi SI (2011). Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical paper of medicine faculty- University Palacky Olomouc-Czech Republic*, **155:** 131-136.

98. Pham-Huy LA, He H, & Pham-Huy C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Medecine*, **4:** 89-96.

99. Popovici C, Saykova I, & Tylkowski B (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue du Génie Industriel*, **4:** 26-39.

100. Qin Y, Wu X, Huang W, Gong G, Li D, He Y, & Zhao Y (2009). Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **126:** 543-550.

101. Rahimi-Moghaddam P, Ebrahimi SA, Ourmazdi H, Selseleh M, Karjalian M, Haj-Hassani G, Alimohammadian MH, Mahmoudian M, & Shafiei M (2011). *In vitro* and in vivo activities of *Peganum harmala* extract against *Leishmania major*. *Journal of Research and Medical Science*, **16:** 1032-1039.

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

103. Randhawa MA (2009). Calculation Of LD50 Values From The Method Of Miller And Tainter, 1944 (Letter To Editor). *Journal of Ayub Medical College AbbottAbad*, **21:** 184-185.

104. Rasekh HR, Nazari P, Kamli-Nejad M, & Hosseinzadeh L (2008). Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **116:** 21-26.

105. Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, & Al-Majed AA (2002). Effects of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, **70:** 135-145.

106. Reichl FX (2004). Guide pratique de toxicologie. **2nd ed**. *DeBoeck & Larcier* (Bruxelles), 4-16.

107. Rhalem N, Khattabi A, Soulaymani A, Ouammi L, & Soulaymani-Bencheich R (2010). Etude rétEROpective des intoxications par les plantes au Maroc : Expérience du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (1980-2008). *Toxicologie Maroc*, 5-8.

108. Rhiouani H, El-Hilaly J, Israili ZH, & Lyoussi B (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **118:** 378-386.

109. Shi CC, Liao JF, & Chen CF (2001). Comparative study on the vasorelaxant effects of three harmala alkaloids *in vitro*. *Japenease Journal of Pharmacology*, **85:** 299-305.

110. Singh BA, Chaturvedi JP, Narender T, & Srivastava KA (2008). Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* l. Seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **23:** 391-393.

111. Sobhani AM, Ebrahimi SA, & Mahmoudian M (2002). An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, **5:** 19-23.

112. Stahl SM & Felker A (2008). Monoamine Oxidase Inhibitors: A Modern Guide to an Unrequited Class of Antidepressants. *Trends in Psychopharmacology*, **13:** 1-15.

113. Su X, Duan J, Jian Y, Shi J, & Kakuda Y (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potenials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19:** 348-353.

114. Tahraoui A, Israili ZH, & Lyoussi B (2010). Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea i*n rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **132:** 48-55.

115. Tarloff JB & Wallace AD (2010). Nephrotoxicity. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 291-302.

116. Teo S, Strlig D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, & Khetani V (2002). A 90 days oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, **79:** 183-196.

117. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, & Polissiou M (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, **90:** 333-340.

118. The Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161:** 105-121.

119. Timbrell J (2000). Principles of biochemical toxicology. **3rd ed**. *Taylor & Francis. Inc* (London), 1-390.

120. Tse SY, Mak IT, & Dickens BF (1991). Antioxidative properties of harmane and beta-carboline alkaloids. *Biochemical Pharmacology*, **42:** 459-464.

121. Tuliaganov N, Sadritdinov FS, & Suleimanova GA (1986). Pharmacological characteristics of desoxypeganine hydrochloride (Abstract). *Farmakol Toksikol*, **49:** 37-40.

122. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, & Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39:** 44-84.

123. Viala A (2005). Notions sur la toxicologie. **In:** Toxicologie. **2nd ed**. *Lavoisier* (Paris), 3-10.

124. Wallace AD & Meyer SA (2010). Hepatotoxicity. **In:** A Textbook of Modern Toxicology. **4th ed**. *John Wiley & Sons. Inc* (Hoboken, New Jersey), 277-290.

125. Wu D & Cederbaum A (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alchol Research and Health*, **27:** 277-284.

126. Yousefi R, Ghaffarifar F, & Dalimi AA (2009). The Effect of *Alkanna tincturia* and *Peganum harmala* Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. *Iranian Journal of Parasitology*, **4:** 40-47.

127. Zharekeev B, Khashimov K, Telezhenetskaya M, & Yunusov S (1974). New alkaloids from *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **10:** 282-283.

128. http://healthyhomegardening.com/images/gardengeek/syrian_rue.jpg

129. http://faculty.ksu.edu.sa/Al-Rowaily/ Pictures%20 Library/Rangeland%20 Flora%20 %d9%86%d8%a8%d8%a7%d8%aa%d8%a7%d8%aa%20%d8%a7%d9%84%d9%85 %d8%b1%d8%a7%d8%b9%d9%8a/Peganum%20harmala.bmp

Résumé

Peganum harmala L. (Nitrariacées), connue également par Harmel, est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter une variété de troubles. La présente étude visait à évaluer l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L. (EBr, EAq, EHx, ECh, EAe, EAq*), ainsi que l'effet toxique, aigu et subaigu, exercé par l'administration orale de l'extrait brut à des souris *Albinos* de la souche *NMRI* des deux sexes. Les résultats ont montré la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans les graines. Un effet piégeur significatif du radical DPPH et une inhibition de l'oxydation couplée de β-carotène/acide linoléique élevée ($p<0.001$), ont été également signalé, comparativement aux antioxydants standards (acide gallique et BHT). L'étude de la toxicité aiguë a montré que cette plante est faiblement toxique avec une DL_{50} égale à 2.8585g/kg du poids corporel. Cependant, le traitement subaigu pendant quatre semaines avec la dose de 285.8mg/kg a permis d'établir une diminution significative des GR et d'Hémoglobine accompagnée par une augmentation des GB ($p<0.05$). Concernant les paramètres biochimiques, une élévation significative des taux sériques de PAL, de Bilirubine et d'AU a été enregistrée. Les paramètres urinaires ne sont pas influencés par le traitement, à l'exception d'une faible augmentation en glucose urinaire. En outre, l'examen histologique a confirmé les analyses biochimiques, par l'observation de plusieurs anomalies tissulaires au niveau du parenchyme hépatique et rénal. Ensemble, ces résultats suggèrent que, malgré l'effet antioxydant important des graines de *Peganum harmala* L., l'usage prolongé de la plante pourrait être à l'origine de différents anomalies hépatotoxiques et néphrotoxiques.

Mots clés : *Peganum harmala* L., antioxydant, DPPH, β-carotène, alcaloïdes, toxicité aigüe, toxicité subaiguë, DL_{50}, paramètres hématologiques, biochimiques, urinaires et histologiques.

ملخّص

تعتبر نبتة الحرمل (*Peganum harmala* L.) إحدى أهمّ النباتات المستعملـــة في الطب التقليـــدي الجزائري نظرا لفعاليتها في علاج العديد من الأمراض. تهدف هذه الدراســة إلى تقدير النشاطية المضادّة للأكسدة لمختلف مستخلصات بذور الحرمل (EBr, EAq, EHx, ECh, EAe, EAq*)، إضافة إلى معرفة الأثر السّمي الحادّ و شبه الحادّ النّاجم عن معالجة فئران مخبرية بيضاء من كلا الجنسين بالمستخلص الخام. أظهرت النتـــائج احتواء مختلف المستخلصـــات على كميات معتبرة من المركبـــات الفينـــــــــولية و الفلافنويـدات. علاوة على هذا فقد وضح لنا التقدير الكمي للنشاطية الإزاحية تجاه جذر DPPH و تثبيط الأكسدة المزدوجة للبيتا-كاروتين و حمض اللينولييك نشاطية مضادة للأكســـــــدة معتبرة ($p<0.001$) مقارنة مع مضادات الأكسدة النموذجية (حمض الغاليك وBHT). من جهة أخرى بينت دراسة السمية الحادة للمستخلص الخام أن نبتة الحرمل تندرج في خانة المواد منخفضة السمية، حيث قدرت الجرعة القاتلة ل 50% من الحيوانات المخبرية ب 2.8585غ/كغ. في حين أن المعالجة شبه الحادة بجرعة 285.8مغ/كغ عن طريق الفم و لمدة أربعة أسابيع قد أدت إلى انخفاض في بعض المؤشرات الدموية (الهيموغلوبين و كريات الدم الحمراء) مرفوقا بارتفاع في عدد كريات الدم البيضاء ($p<0.05$). فيما يخص المؤشرات البيوكيميائية، فقد لوحظ ارتفاع محسوس في معدلات أنزيم الفوسفتاز ألكلين، البيلروبين و حمض البولة، في حين لم تظهر نتائج تحليل البول أي اختلاف في المؤشرات المدروسة ما عدا تغير طفيف في نسبة السكر. أما على المستوى النسيجي، فقد لوحظ حدوث تغيرات كثيرة على مستوى كل من أنسجة الكبد و الكلى مما يؤكد النتائج البيوكيميائية المحصل عليها. استنادا إلى كل هذه النتائج، فأنه و رغم النشاطية المضادة للأكسدة المعتبرة التي أظهرتها مستخلصات بذور الحرمل، فان استعمال هذه النبتة لفترة طويلة يؤدي إلى العديد من الاختلالات الوظيفية الكبدية أو الكلوية.

الكلمات المفتاح: *Peganum harmala* L.، مضاد للأكسدة، DPPH، بيتا-كاروتين، القلويدات، سمية حادة، شبه حادة، DL_{50}، مؤشرات دموية، بيوكيميائية، بولية و نسيجية.

Summary

Peganum harmala L. (Nitrariacae), commonly known as Harmel, is one of the most important plants used in Algerian phytotherapy to cure a lot of disorders. The present study aimed to evaluate the antioxidant activity of *Peganum harmala* L. seed extracts (BrE, AqE, HxE, ChE, AeE, Aq*E) and the potential acute and sub-acute toxicity of the crud extract orally administered in *Albinos' NMRI* mice of both sexes. Our results showed that the different seed extracts contains high amounts of polyphenols and flavonoids. Moreover, the evaluation of DPPH scavenger effect and the inhibition of the coupled oxidation of β-carotene/linoleic acid showed a potential antioxidant activity ($p<0.001$) when compared to control (gallic acid and BHT). On the other hand, the assessment of the acute toxicity in mice demonstrated that this plant is lowly toxic with a LD_{50} of 2.8585g/kg of body weight. In the sub-acute study, daily oral administration of crude extract at the dose of 285.8mg/kg for four weeks resulted in a significant decrease in the RBC, and Hemoglobin, which is associated with an increase in the WBC ($p<0.05$). The biochemical analysis showed a significant increase in serum PAL, UA and Bilirubin in treated animals. However, urinary parameters, except a low change in the level of urinary glucose, were not affected by the treatment. Histological analysis confirmed the biochemical analysis by the presence of numerous liver and kidney tissular alterations. Taken together, these results suggest that, in spite the potential antioxidant activity exhibited by *Peganum harmala* L. seeds, the chronic use of this plant may cause several hepatotoxic and nephrotoxic effects.

Key words: *Peganum harmala* L., antioxidant, DPPH, β-carotene, acute toxicity, sub-acute, alkaloids, LD_{50}, hematological, biochemical, urinary and histological parameters.