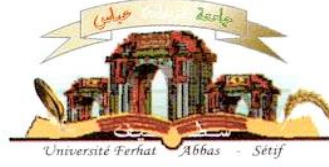


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2018

THÈSE

Présentée par

GUERGOUR Hassina

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmaco-
toxicologiques de la plante *Peganum harmala***

Soutenue publiquement le/...../2018

DEVANT LE JURY

Président

Houcher Bakhouche

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

Bouzidi Abdelouahab

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

Grara Nedjoud

Pr. Univ Guelma

Khaldi Fadila

Dr. Univ Souk Ahras

Bettache Azzedine

Dr. Univ Bejaia

Année Universitaire 2017/2018

Remerciements

A Dieu le Tout Puissant, Maître du temps et des circonstances, plein d'amour, de tendresse et de bonté.

La présente étude n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de certaines personnes. Et je ne suis pas non plus capable de dire dans les mots qui conviennent, le rôle qu'elles ont pu jouer à mes côtés pour en arriver là. Cependant, je voudrais les prier d'accueillir ici tous mes sentiments de gratitude qui viennent du fond de mon cœur, en acceptant mes remerciements.

*Mes premiers remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse, le professeur **BOUZIDI ABDELOUAHAB**, qui m'a accompagné tout au long de ma formation. Sa disponibilité et ses généreux secours au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande qualité, et d'un immense réconfort; merci infiniment Monsieur.*

*Ma vive reconnaissance va au Pr. **HOUCHER BAKHOUCHE** de l'université de Sétif 1 d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'aux Pr. **GRARA NEDJOU** de l'université de Guelma, Dr. **KHALDI FADILA** de l'université de Souk Ahras et Dr. **BETTACHE AZZEDINE** de l'université de Bejaia d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie Dr. **BENBACHA F**, ainsi que tous les techniciens et stagiaires du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de BBA pour leur aide précieuse dans la réalisation des coupes histologiques.*

*Je remercie Mr. **MAKHOUKH**. N responsable des laboratoires pédagogiques (SNV) université BBA. Mes sincères remerciements vont également à tout le personnel de laboratoire pédagogique de Biochimie pour leurs diverses contributions.*

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail et que je ne l'ai pas mentionné par son nom, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Dédicaces

A la mémoire de mon père pour m'avoir donné la vie et la joie de vivre. Vos conseils et bénédictions n'ont jamais fait défaut, que Dieu le tout puissant vous accorde son paradis éternel (amin).

Maman qui m'accompagne partout par ses prières que Dieu me la garde,

A mes deux frères Djamel Eddine et Faouzi que j'aime énormément.

A mes sœurs, de leur soutien, aide, encouragement et de leurs conseils.

A mon cher mari qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'encourage toujours à aller plus loin, quoique cela nous coûte. Ta patience ma toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivée jusque là,

A mes très chères petits enfants, MOHAMED, ADEM qui m'ont porté bonheur.

Je leur dis que sur la terre. Ils sont mon paradis, Je les aime.

Que Allah vous bénisse et vous protège.

الملخص

Peganum harmala (الحرمل) نبتة تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في مختلف البلدان، وخصوصا في الجزائر. تم في هذه الدراسة إجراء الفحص الفيتو كيميائي الأولي وتقييم النشاط المضاد للأوكسدة باختباري (DPPH;FRAP) والنشاط الهضاد للبكتيريا و الفطريات لكل من مستخلص الأوراق (EBF) ، مستخلص البذور (EBG) و مستخلص قلويدات البذور (EAT) وتأثير السمية الحادة و الشبه الحادة، للقلويدات المستخلصة من البذور تحت الصفاق على الفئران لكلا الجنسين .كشف التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة للمستخلصات الخامة وجود العديد من ال بقع المقابلة لمختلف المستقبلات الثانوية ، كما سمح هذا الأخير بفصل المستخلص القلويدي و اظهر احتمال وجود القلويدات من نوع (Bcarboline). وأشار الفحص الفيتو كيميائي وجود القلويدات و الكومارين و الانثوسيانين والصابونين .أظهرت جميع المستخلصات نشاطية معتبرة مضادة للأوكسدة لاختبار DPPH ولوحظ أكبر تأثير إزاحي لمستخلص البذور EBG (35.83µg/ml). كما أظهرت جميع المستخلصات القدرة على إرجاع الحديد ، لكن في كلتا الحالتين هذه النشاطية كانت أقل من حمض الاسكوربيك . أظهرت النشاطية الهضادة للبكتيريا والفطريات فعالية جميع المستخلصات ضد جميع السلالات البكتيرية والفطرية التي تم اختبارها .سمحت DL₅₀ لقلويدات بذور الحرمل على الفئران الذكور والإناث (363.07mg/kg و377.57 mg/kg) في تصنيف هذه النبتة ضمن فئة النباتات معتدلة السمية . كما كشفت دراسة السمية الحادة وتحت الحادة تغيرات في الوزن النسبي لبعض الأعضاء، كما أظهرت التحاليل حدوث خلل في بعض المؤشرات الدموية (MCHC,MCH) و المؤشرات البيوكيميائية (AST، ALP، Urea، ALT)، وكذا بعض التغيرات الكبدية (احتقان للأوعية الدموية) والكلى (احتقان للأوعية الدموية خاصة عند الفئران الإناث .في الختام يمكن القول أن للنبتة قوة علاجية جيدة فعالة وهذا راجع إلي غناها بالمستقلبات الثانوية. ولكن استخدامها لأغراض علاجية لا يخلو من خطر الجرعة الزائدة والتسمم.

الكلمات المفتاح: حرمل، الدراسة الفيتو كيميائية ، قلويدات، النشاط المضادة للأوكسدة، النشاط الهضاد للجراثيم، السمية الحادة،السمية شبه الحادة.

Résumé

Peganum harmala L. est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans divers pays et en particulier en Algérie. La présente étude visait à réaliser un screening phytochimique préliminaire et d'évaluer l'activité antioxydante (par DPPH et FRAP tests), activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut des feuilles (EBF), extrait brut des graines (EBG) et l'extrait des alcaloïdes totaux des graines (EAT), ainsi que l'effet toxique, aigu et subaigu, exercé par l'administration intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines sur des souris blanches *Mus musculus* de deux sexes. L'analyse qualitative des extraits bruts par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de plusieurs spots correspond aux différents métabolites, de plus la CCM des alcaloïdes totaux nous permis de séparer plusieurs spots correspond probablement aux alcaloïdes β carbolines. Le screening phytochimique a indiqué la présence des alcaloïdes, des tannins, des stérols et stéroïdes, des coumarines, des anthocyanines et les saponines. Le test de DPPH révèle des activités antioxydantes significatives des extraits (brut et alcaloïdique). Un fort pouvoir de piégeage a été observé avec l'EBG IC_{50} ($35.83\mu /ml \pm 0.13$). La capacité de réduction de fer est remarquable pour tous les extraits. Cependant ces activités sont faibles en comparaison avec l'acide ascorbique. L'activité antibactérienne et antifongique montre l'efficacité de tous les extraits contre toutes les souches bactériennes et mycéliennes testées. La DL_{50} (363,07 et 377,57 mg/kg) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* sur des souris mâles et femelles a permis de classer cette plante comme modérément toxique. L'étude de la toxicité aiguë et subaiguë a révélée la perturbation de la masse relative des organes des souris traitées avec une altération de quelques paramètres hématologiques (CCMH, MCH) et biochimiques (PAL, AST, ALT, Urée), ainsi que des altérations rénales (congestion sanguine) et hépatiques (surcharge hépatocytaires, congestion sanguine) surtout chez les souris femelles. En conclusion, cette plante possède un fort pouvoir pharmacologique due à sa richesse en métabolites secondaires. Cependant son utilisation à des fins thérapeutiques n'est pas dépourvue de danger et expose au risque de surdosage et d'intoxication.

Mots clés: *Peganum harmala* L, étude phytochimique, alcaloïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, toxicité aiguë et subaiguë.

Abstract

Peganum harmala L. is a plant widely used in traditional medicine in various countries especially in Algeria. The aim of this study was to carry out a preliminary phytochemical screening and to evaluate the antioxidant activity (by DPPH and FRAP assays), the antibacterial and antifungal activities of the crude leaf extract (CLE), crude seeds extract (CSE) and alkaloid seeds extract (ASE), as well as the acute and subacute toxic effect exerted by the intraperitoneal administration of alkaloids in mice (*Mus Musculus*) of both sexes. The qualitative analysis of the crude extracts by thin-layer chromatography (TLC) revealed the presence of several spots corresponding to different metabolites, in addition the TLC of total alkaloid extract allowed us to separate several spots corresponding probably to β -carbolines alkaloids. Phytochemical screening indicated the presence of alkaloids, tannins, sterols and steroids, coumarins, anthocyanins and saponins. The studied extracts (crude and alkaloid) showed good antioxidant activity in DPPH assay. The CSE revealed highest scavenging activity (IC_{50} ($35.83\mu / ml \pm 0.13$)). The capacity of reducing power is remarkable for all extracts. However these activities are lowers in comparaison with ascorbic acid. The antibacterial and antifungal activities showed the efficiency of all extracts for all bacterial and mycelia tested. LD_{50} (363.07 and 377.57 mg / kg) of total alkaloids seeds of *Peganum harmala* in male and female mice classified this plant as moderately toxic. The study of acute and subacute toxicity revealed disruption in the relative weight of few organs with alterations of hematological (HCM, MCH) and biochemical parameters (PAL, AST, ALT, Urea), as well as renal (blood congestion) and liver (ground glass appearance of hepatocyte and blood congestion) alterations especially in female mice. In conclusion, this plant has a strong pharmacological power due its secondary metabolite. However its use for therapeutic purposes is not without danger and exposes the risk of overdose and intoxication.

Key words: *Peganum harmala* L., phytochemical study, alkaloids, antioxidant activity, antibacterial activity, acute and subacute toxicity.

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Analyse de variance
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EBF	Extrait brut des feuilles
EBG	Extrait brut des graines
EAT	Extrait des alcaloïdes totaux
ERO	Espèce réactive d'oxygène
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
ALAT	Alanine Aminotransferase
ASAT	Aspartate Aminotransferase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
DL ₅₀	Dose létale 50
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
HCT	Hématocrite
HGB	Hémoglobine
MCH	Teneur Corpusculaire en Hémoglobine
MCHC	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
MCV	Volume Globulaire Moyen
MPV	Volume Plaquettaire Moyen
PLT	Plaquettes
RBC	Red Blood Cells (Globules Rouges)
UI	Unité Internationale
WBC	Wight Blood Cells (Globules Blancs)
SEM	Erreur Standard de la moyenne
SD	Standard déviation

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

I .1.Présentation de la plante <i>Peganum harmala</i>	4
I.1.1 Généralités.....	4
I. 1.2 Caractéristiques botaniques.....	4
I.1.3 Classification botanique.....	6
I.1.4 Nomenclature et appellation	6
I.1.5 Répartition géographique.....	6
I.1.6 Utilisations traditionnelles.....	7
I.1.7 Utilisations pharmacologiques	8
I.1 .7.1 Effets cardiovasculaires.....	7
I.1 .7.2 Effets sur le système nerveux.....	9
I.1 .7.3 Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire.....	9
I.1 .7.4 Effets anticancéreux et antioxydants.....	9
I.1 .7.5 Effets sur le système immunitaire.....	10
I.1 .7.6 Effets antidiabétiques.....	10
I.2. Aspect phytochimique (Caractéristiques phytochimiques)	10
I.2.1 Les alcaloïdes.....	11
I.2.1.1 Les bêta-carbolines (β carbolines	11
1.2.1.1 .1 La biosynthèse des β -carbolines.....	11
I.2.1.2 Les alcaloïdes quinazolines.....	15
1.2.3 Toxicité des alcaloïdes.....	16
I.2.1.3.1 Circonstance(s) de l'intoxication.....	16
I.2.1.3.2 Toxicococinétique des alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i>	17
I.2.1.3.3 Toxicodynamique des alcaloïdes.....	17
I.2.1.3.3.1 Effets et symptômes.....	17
I.2.1.3.3.3 Mécanisme et site d'action.....	17
I.2.1.3.3.4 Traitement.....	20
I.2.2 Les composés phénoliques.....	20

I.2.2.1 Les flavonoïdes.....	20
I.2.3 Les terpènes ou terpénoïdes.....	21
I.2.4. Anthraquinones.....	22
I. 3. Aspects pharmaco-toxicologiques.....	22
I.3.1 L'activité antioxydante.....	22
I.3.1.1 Stress oxydant: Généralités.....	22
I.3.1.2 Les radicaux libres.....	22
I.3.1.2.1 Principales ERO de l'organisme et mécanismes de leur production.....	22
I.3.1.2.2 Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées.....	23
I.3.1.3 Les antioxydants.....	24
I.3.1.3.1 Systèmes enzymatiques.....	25
I.3.1.3.2 Systèmes non enzymatiques.....	26
I.3.1.4 Quelques méthodes d'étude de l'activité antioxydante des plantes médicinales	28
I.3.2 Acticité antibactérienne.....	28
I.3.3 Activité antifongique	28
I.3.4 Les méthodes d'étude des antibiotiques et des antifongiques.....	29
I.3.5 Etude de la toxicité des plantes.....	29
I.3.6 Les principaux organes cibles aux produits toxiques	30
I.3.6.1 Le foie.....	30
I.3.6.1.1 Hépatotoxicité.....	32
I.3.6.1. 2 Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique	32
I.3.6.2 Les reins.....	33
I.3.4.2.1 Néphrotoxicité.....	34
I.3.6.2. 2 Marqueurs biochimiques de la fonction rénale.....	35

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel.....	38
II.1.1 Matériel végétal.....	38
II.1.2 Les souches microbiennes utilisées.....	39
II.1.3 Matériel animal.....	39
II.2 Méthodes.....	40
II.2.1 Préparation des extraits.....	40

II.2.1.1 Extraits bruts méthanoliques.....	30
II.2.1.2 Extraction des alcaloïdes totaux de <i>Peganum harmala</i>	41
II.2.2 Analyse qualitative des extraits bruts et des alcaloïdes totaux par chromatographie sur couche mince (CCM).....	44
II.2.3 Screening phytochimique.....	44
II.2.4 Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante	44
II.2.4.1 Effet scavenger du radical DPPH.....	44
II.2.4.2 Test de réduction du fer: FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	45
II.2.5 Etude de l'activité antibactérienne.....	46
II.2.6 Test de l'activité antifongique des extraits	48
II.2.6.1 Test d'inhibition de la croissance.....	48
II.2.6.2 Test de mesure de la croissance radiale.....	48
II.2.7 Etude de la toxicité aigüe chez les souris <i>Mus musculus</i>	49
II.2.7.1 Détermination de la DL ₅₀ chez les souris.....	49
II.2.7.2 La toxicité aigüe chez les souris (Dose forte non létale).....	49
II.2.7.3 Evaluation de la toxicité subaigüe chez les souris	50
II.2.7.4 Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques sériques.....	50
II.2.7.5 Technique histologique.....	51
II.2.8 Analyses statistiques.....	51

Chapitre III. Résultats

III. Résultats	53
III .1 Rendements des extractions.....	53
III.2 Analyse qualitative.....	53
III.2.1 Chromatographie sur couche mince CCM des extraits	53
III.2.2 Chromatographie sur couche mince CCM des alcaloïdes totaux.....	54
III.3 Screening phytochimique.....	55
III.4 Activité antioxydante des extraits de <i>Peganum harmala</i>	56
III.4.1 Effet piègeur envers le radical DPPH.....	56
III.4.2 Réduction du fer: FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	59
III.5 Activité antibactérienne des extraits de <i>Peganum harmala</i>	60

III.5.1 Test de toxicité de DMSO.....	60
III.5.2 Sensibilité des bactéries aux extraits bruts et alcaloïdique de <i>Peganum harmala</i>	61
III.6 Activité antifongique des extraits de <i>Peganum harmala</i>	63
III.6 .1 Effet des extraits sur la croissance des champignons	63
III.6 .2 Effet des extraits sur la croissance radiale des champignons.....	64
III.7 Détermination de la DL ₅₀ chez les souris.....	67
III.7.1 Détermination de la DL ₅₀ chez les souris femelles.....	67
III.7.1.1 Observation du comportement et tableau clinique des animaux.....	67
III.7.1.2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Lichfield et Wilcoxon (1949).....	67
III.7.1.3 Estimation de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris femelles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés.....	69
III.7.2 Détermination de la DL ₅₀ chez les souris mâles.....	70
III.7.2.1 Observation du comportement et tableau clinique des animaux.....	70
III.7.2.2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Lichfield et Wilcoxon (1949).....	70
III.7.2.3 Estimation de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés.....	72
III.7.3 Etude de la sensibilité de sexe (souris femelles et mâles) aux alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i>	74
III.8 Toxicité aiguë des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris femelles.....	75
III.8.1 Le poids corporel et la masse relative des principaux organes des souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë.....	75
III.8.2 Etude des paramètres hématologiques.....	77
III.8.3 Etude paramètres biochimiques sériques.....	77
III.8.4 Etude histologique.....	79
III.9 Toxicité subaiguë des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris femelles.....	81
III.9.1 Les signes généraux et la variation du poids.....	81

III.9.2 Masse relative des différents organes des souris femelles dans les conditions de la toxicité subaiguë	82
III.9.3 Etude des paramètres hématologiques.....	82
III.9.4 Etude des paramètres biochimiques sériques	83
III.9.5 Etude histologique	85
III.10 Toxicité aiguë des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles.....	86
III.10.1 Le poids corporel et masse relative des différents organes des souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë.....	86
III.10.2 Etude des paramètres hématologique.....	87
III.10.3 Etude des paramètres biochimiques sériques	88
III.10.4 Etude histologiques.....	89
III.11 Toxicité subaiguë des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles.....	91
III.11.1 Les signes généraux et la variation du poids.....	91
III.11.2 Masse relative des différents organes des souris mâles dans les conditions de la toxicité subaiguë	91
III.11.3 Etude des paramètres hématologique.....	92
III.11.4 Etude des paramètres biochimiques sériques	93
III.11.5 Etude histologique.....	94

Chapitre IV. Discussion

IV. Discussion.....	96
Conclusion et perspective.....	108

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1: Les fleurs et feuilles de la plante <i>Peganum harmala</i>	05
Figure 2: Les fruits et les graines de la plante <i>Peganum harmala</i>	05
Figure 3: Biosynthèse des alcaloïdes β carbolines.....	12
Figure 4: La biosynthèse des alcaloïdes de la plante <i>Peganum harmala</i>	13
Figure 5: Structure de Harmaline.....	13
Figure 6: Structure chimique de Harmine.....	14
Figure 7: Structure chimique de harmalol et harmol.....	14
Figure 8: Structure chimique de harman.....	14
Figure 9: Structure chimiques de harmalicydine (a) et tétrahydroamine.....	15
Figure 10: Biosynthèse des alcaloïdes quinazolines de <i>Peganum harmala</i>	15
Figure 11: Structure chimique de Vascinone (a) Peganine (b) Déoxyvasicinone (c) Dipeganine(d) Dipeganol(e).....	16
Figure 12: Structure de base des flavonoïdes.....	20
Figure 13: Les flavonoïdes isolés de <i>Peganum harmala</i> L.....	21
Figure 14: Anion superoxyde et ses dérivés.....	23
Figure 15: Conséquences pathogènes du stress oxydant.....	24
Figure 16: Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant.....	25
Figure 17: Aspect macroscopique du foie.....	31
Figure 18: Structure de lobule hépatique.....	31
Figure 19: Coupe du rein.....	33
Figure 20: Structure de néphron.....	34
Figure 21: La plante de <i>Peganum harmala</i> en période de floraison.....	38
Figure 22: Les graines et les feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.....	39
Figure 23: Préparation des extraits bruts (feuilles, graines) par macération.....	41
Figure 24: Extraction des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i>	43
Figure 25: La réduction du radical DPPH.....	45

Figure 26: Chromatographie sur couche mince des extraits bruts des graines de <i>Peganum harmala</i> L.....	54
Figure 27: chromatographie sur couche mince des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> L.....	55
Figure 28: L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	56
Figure 29: L''inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	57
Figure 30: L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des alcaloïdes du <i>Peganum harmala</i>	57
Figure 31: L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut des graines de <i>Peganum harmala</i>	58
Figure 32: Valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Peganum harmala</i> et d'acide ascorbique.....	58
Figure 33: Pouvoir réducteur d'EAT et acide ascorbique.....	59
Figure 34: Pouvoir réducteur d'EBG et acide ascorbique.....	59
Figure 35: Pouvoir réducteur d'EBF et acide ascorbique.....	60
Figure 36: Effet de différentes concentrations d'EAT sur la croissance radiale d' <i>Aspergillus niger</i>	64
Figure 37: Effet de différentes concentrations d'EBF sur la croissance radiale d' <i>Aspergillus niger</i>	64
Figure 38: Effet de différentes concentrations d'EBG sur la croissance radiale d' <i>Aspergillus niger</i>	65
Figure 39: Effet de différentes concentrations d'EAT sur la croissance radiale de <i>Fusarium Oxysporum</i>	65
Figure 40: Effet de différentes concentrations d'EBF sur la croissance radiale de <i>Fusarium oxysporum</i>	66
Figure 41: Effet de différentes concentrations d'EBG sur la croissance radiale de <i>Fusarium Oxysporum</i>	66

- Figure 42:** Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponses » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris femelles.....**68**
- Figure 43:** Courbe « dose - réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris femelles.....**70**
- Figure 44:** Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponses » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris mâles.....**72**
- Figure 45:** Courbe « dose - réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris mâles.....**73**
- Figure 46:** Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris des deux sexes.....**74**
- Figure 47:** Effet aiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, ALP) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$**78**
- Figure 48:** Effet aiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (118mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (Urée, créatinine) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$**79**
- Figure 49:** Coupes histologiques des tissus des reins des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (G : glomérules). (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème}. Coloration éosine hématoxyline. X40.....**80**
- Figure 50:** Coupes histologiques des tissus du cerveau des souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins. (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème} jour : montrent la présence des œdèmes :(O œdème). Coloration éosine hématoxyline. X40.....**80**
- Figure 51:** Coupes histologiques des tissus du foie des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (VC : veine

centrale. Groupes traités (B) :1^{er} jour, (C) 5^{ème} jour : montrent une surcharge hépatocytaire (SA), CN : Congestion. Coloration éosine hématoxyline. X40.....80

Figure 52: L'effet des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* sur l'évolution du poids des souris traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë, valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.....81

Figure 53: Effet subaiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques (AST, ALT, PAL) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$84

Figure 54: Effet subaiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$...84

Figure 55: Coupes histologiques des tissus : (A) des reins, (B) du foie, (C) du cerveau dans des souris femelles traitées les conditions de la toxicité subaiguë avec la dose de 18 mg/kg. CN : Congestion Coloration éosine hématoxyline. X40.....85

Figure 56: Effet aiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, PAL) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$88

Figure 57: Effet aiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$89

Figure 58 : Coupes histologiques des tissus du foie dans les conditions de la toxicité aigue chez les souris mâles avec la dose de 120 mg/kg. (A) Groupe témoins (VC : veine centrale, SI : sinusöide, NH : hépatocytes normaux). (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème} jour .CN : congestion hépatique. Coloration éosine hématoxyline. X40.....90

Figure 59: Coupes histologiques des tissus des reins dans les conditions de la toxicité aigue chez des souris mâles avec la dose de 120 mg/kg. (A) Groupe témoins (G : glomérules). (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème}. CN : Congestion Coloration éosine hématoxyline. X40.....90

Figure 60: Coupes histologiques des tissus du cerveau dans les conditions de la toxicité subaiguë avec la dose de 18 mg/kg. Coloration éosine hématoxyline. X40.....90

Figure 61: L'effet des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* sur le poids absolu des souris mâles dans les conditions de la toxicité subaiguë, valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM..91

Figure 62: Effet subaiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, PAL) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$93

Figure 63: Effet subaiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$94

Figure 64: (A) Coupes histologiques des tissus : (A) des reins (B) du foie, (C) du cerveau des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë avec la dose de 18 mg/kg chez des souris mâles. CN : congestion. Coloration éosine hématoxyline. X40.....95

Liste des tableaux

Tableau 1: Les doses toxiques des alcaloïdes β carbolines sur différentes espèces.....	17
Tableau 2: Rendement et couleurs des extraits.....	53
Tableau 3: Screening phytochimique des graines et des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	56
Tableau 4: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EBF (mg/ml). Moyenne \pm SD.....	61
Tableau 5: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EAT (mg/ml). Moyenne \pm SD.....	61
Tableau 6: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EBG (mg/ml)/. Moyenne \pm SD.....	62
Tableau 7: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations des antibiotiques standards.....	62
Tableau 8: CMI et CMB (mg/ml) de différents extraits.....	63
Tableau 9: Les effets toxiques des extraits sur la croissance des souches fongiques testées <i>A.</i> <i>Niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	63
Tableau 10: Tableau caractérisant «Dose - Réponse »par dose unique après une injection intrapéritonéal des alcaloïdes totaux de <i>Peganum harmala</i> chez les souris femelles (n=10).....	67
Tableau 11: Les résultats d'analyse obtenus par probits-Méthode des moindres carrés exprimés en pourcentage et en probits après une injection intrapéritonéale des alcaloïdes totaux de <i>Peganum harmala</i> chez les souris femelles.....	69
Tableau 12: Tableau caractérisant « «Dose - Réponse »par dose unique après une injection intrapéritonéale des alcaloïdes totaux de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles (n=10)...	71
Tableau 13: Les résultats d'analyse obtenus par probits-Méthode des moindres carrés exprimés en pourcentage et en probits après une injection intrapéritonéale des alcaloïdes totaux de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles.....	73

Tableau 14: Paramètres de comparaison « dose-réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> chez les souris mâles et femelles.....	75
Tableau 15: L'effet des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> sur le poids corporel (g) des souris femelles traitées par la dose de 118 mg/kg dans les conditions de la toxicité aiguë. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	76
Tableau 16: Masse relative des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	76
Tableau 17: Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	77
Tableau 18: Masse relative des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.....	82
Tableau 19: Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.....	83
Tableau 20: L'effet des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> sur le poids corporel (g) des souris mâles traitées par la dose de 118 mg/kg dans les conditions de la toxicité aiguë. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	86
Tableau 21: Masse relative des organes des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	87
Tableau 22: Paramètres hématologiques des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de <i>Peganum harmala</i> . Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....	87

Tableau 23: Masse relative des organes des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.....**92**

Tableau 24: Paramètres hématologiques des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.....**92**

Introduction générale

Depuis longtemps, l'homme s'est soigné avec les plantes qu'il avait à sa disposition. A travers les siècles, les traditions humaines ont développé la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour améliorer la santé humaine (Iserin, 2001).

L'Afrique du Nord possède l'une des plus anciennes et plus riches traditions associées à l'usage des plantes médicinales où elles sont très importantes pour les habitants dans beaucoup d'endroits. L'Algérie est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules ayant des propriétés pharmacologiques originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

Un regain d'intérêt envers la phytothérapie durant ces dernières années a permis d'approfondir l'analyse de son efficacité thérapeutique et surtout de son aspect toxicologique (De Smet, 1993). Ce dernier aspect reste en retrait par rapport à l'avancement de la phytothérapie. En effet, plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels à base de plantes ont fait état de problème de toxicité ou d'interaction pouvant causer des échecs thérapeutiques ou des accidents (Hmamouchi, 1998).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés de faire une étude sur la plante *Peganum harmala* L, appartenant à la famille des Zygophyllaceae généralement connu sous le nom de harmel est considérée parmi l'une des plantes médicinales les plus célèbres dans la médecine traditionnelle (Boullard, 2001). Ses effets thérapeutiques sont due à la richesse de cette plante en des composés pharmacologiquement actifs surtout les alcaloïdes de type β carbolines (Harmaline, Harmine, harmalol, Harmol) .Bien qu'ils possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes, il est noter que ces molécules provoquent des d'intoxications graves chez l'homme et l'animale.

L'objectif de notre travail est de démontrer la richesse de notre plante en métabolites secondaires et à déterminer leurs propriétés pharmacologiques et toxiques. Pour cela, dans cette étude nous allons en premier temps présenter quelques connaissances dans la partie bibliographique sur: Les caractéristiques botaniques de la plante étudiée, leurs compositions chimiques, le stress oxydatif, les antibiotiques, antifongiques.

La partie expérimentale englobe trois aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur la caractérisation par screening phytochimique des différents métabolites

secondaires. Il porte également sur le diagnostic et la séparation des principaux alcaloïdes par l'utilisation de la technique chromatographique.

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des différents types des extraits de la plante en utilisant deux méthodes différentes qui sont le test de DPPH et le pouvoir réducteur FRAP. Des tests antibactérien et antifongique sont également réalisés afin de déterminer l'efficacité de ces extraits contre quelques souches bactériennes et fongiques.

Le troisième aspect consiste à étudier la toxicité des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* sur des souris blanches *Mus musculus* de deux sexes et d'évaluer ses effets sur quelques paramètres hématologiques et biochimiques liés à la structure et la fonction rénale et hépatique dans les conditions de la toxicité aiguë et subaiguë.

I. Synthèse Bibliographique

I.1. Présentation de la plante *Peganum harmala*

I.1.1 Généralités

Peganum harmala L., plante de la famille des *Zygophyllaceae*, les plantes appartenant à cette famille, sont très reconnaissables à l'aspect de ses herbes, arbustes, ou arbres. Dans la classification de Sheahan et Chase, (1996) constituent une famille avec environ 285 espèces, qui se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres. Elles sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques (Tahrouch *et al.*, 1998 ; Asgarpanah et Ramezanloo, 2012). Le genre *Peganum* tient son nom du grec et est attribué aux espèces de la rue, alors que le nom de l'espèce *harmala* dérive de celui de la ville Libanaise Hermel (Mars, 2009).

I.1.2 Caractéristiques botaniques

Plante herbacée vivace, à tiges ordinairement peu rameuses, de 30 à 90 cm de haut, à entrenœuds assez courts, densément feuillés.

- ✚ **Les tiges** dressées, très rameuses, qui disparaissent à l'hiver, portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. A leur extrémité, s'épanouissent les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm) (Figure1).
- ✚ **Les feuilles** : sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines pouvant atteindre 5x5 cm. Les feuilles supérieures ne dépassent pas 1,5 mm de largeur (Figure1).
- ✚ **Les fleurs** : La plante présente des fleurs assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert avec cinq sépales inégaux persistants qui dépassent la corolle et des pétales crème lavés de rose-orangé à nervures jaunes, oblongs et subsymétriques (Figure1). Elles sont monoïques dotées de dix à quinze étamines à anthères longues de 8 mm à filets très élargis et plat dans leur partie inférieure, et à gynécée de 8-9 mm de longueur; des ovaires globuleux de trois à quatre loges et des stigmates à 3 carènes insensiblement atténués en style (Chopra *et al.*, 1960 ; Maire, 1933; Ozanda, 1991).



Figure 1 : Les fleurs et feuilles de la plante *Peganum harmala* (Weckesser, 2013).

- ✚ **Les fruits** sont des petites capsules sphériques avec trois chambres de 6 à 10 millimètres de diamètre qui se tient droit sur sa tige et déprimées au sommet. (Yousefi *et al.*, 2009). Les capsules contiennent plus de 50 petites graines triangulaires (Asghari *et al.*, 2004 ; Moloudizargari *et al.*, 2013) (Figure 2).
- ✚ **Les graines** nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère (Figure2) (Chopra *et al.*, 1960).



Figure 2 : Les fruits et les graines de la plante *Peganum harmala* (Weckesser, 2013).

- ✚ **La racine** est oblongue, dure et garnie de fibres. Elle peut atteindre plus de 3m de profondeur (Quézel et Santa, 1963). De nouvelles pousses peuvent se développer à partir des racines latérales (Roche, 1991 ; Parsons et Cuthbertson, 1992).

I.1.3 Classification botanique

Bien qu'il appartienne à la famille des Zygophyllaceae mais sa position taxonomique est encore discutable et on a proposé une famille séparée Nitrariaceae pour ce genre (Shehan et chasse, 1996).

Embranchement Spermatophytes

Sous embranchement Angiospermes

Classe Dicotylédones

Sous classe Rosidae

Ordre Sapindales

Famille Zygophyllaceae

Genre *Peganum*

Espèce *Peganum harmala* L (Ozenda, 1991)

I.1.4 Nomenclature et appellation

Nom latin: *Peganum harmala*

Nom commun: Rue sauvage; Rue verte; Pégane (Lamchouri *et al.*, 2000).

Nom vernaculaire :

- Harmel; Armel; L'harmel (L'Afrique du Nord) (Mahmoudian *et al.* , 2002).
- Pégane et Rue sauvage (en France) (Asgarpanah et Ramezanloo, 2012)
- Harmel Sahari (en Algérie)
- Bender tiffin (en Maroc) (Achour *et al.*, 2012).
- Bizr el harmel (en Egypte) (Arab, 2000)
- Espand, Espand (Iran) (Mina *et al.*, 2015).
- African Rue, Mexican Rue ou Turkish Rue (Etats-Unis) (Mahmoudian *et al.*, 2002).
- yüzerlik or üzerli (en Turquie) (Frison *et al.* , 2008).

I.1.5 Répartition géographique

Cette plante est largement distribuée à travers le monde. Elle est particulièrement répandue dans les zones arides et sèches méditerranéennes dans les sols sableux et légèrement nitrés (Iserin, 2001).

- ✓ En Europe, elle est très commune dans les zones sèches, de l'Espagne à la Hongrie jusqu'aux steppes de la Russie méridionale.
- ✓ En Asie, elle est répandue dans les steppes de l'Iran et du Turkestan jusqu'au Tibet.
- ✓ Aux Etats-Unis, on la trouve en Arizona et au Texas où on la nomme « Mexican rue ».
- ✓ En Afrique, elle est, particulièrement, abondante dans les zones arides méditerranéennes du Moyen-Orient au Nord de l'Afrique (Tunisie, Sahara septentrional et central en altitude, Hauts-Plateaux algériens et Oranie, Maroc oriental) (Hammiche *et al.*, 2013).
- ✓ En Algérie, *Peganum harmala* L est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional, et aux montagnes du Sahara central. Il est réputé pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (Ozenda, 1991).

I.1.6 Utilisation traditionnelle

La plante présente un intérêt en médecine traditionnelle où les graines sont depuis longtemps utilisées : elles sont narcotiques, antihelminthiques, antispasmodiques et utilisées dans certains cas contre les rhumatismes et l'asthme (Siddiqui *et al.*, 1988 ; Bellakhdar, 1997).

La plante est proverbiale dans la médecine traditionnelle depuis les périodes les plus courtes comme remède pour un éventail de plaintes (Shi *et al.*, 2000). Un colorant rouge obtenu à partir de ses graines est largement répandu en Turquie et en Iran pour la coloration des tapis (Baytop, 1999). L'harmal a été traditionnellement employé pour traiter le diabète dans la médecine folklorique de quelques régions du monde (Bnouham *et al.*, 2002). *Peganum harmala* a été employé par certaines populations pour traiter certains désordres de système nerveux tels que la maladie de Parkinson (Leporatti, 2009), en conditions psychiatriques comme la nervosité (González *et al.*, 2010).

En médecine traditionnelle du Nord d'Afrique, harmel est une véritable panacée réputée traitée la plupart des troubles. Quelques « recettes » recueillies au Maghreb pour illustrer cette diversité d'emplois, sont rapportées (Hammiche *et al.*, 2013).

- Suc de plante fraîche: en liniment à base de graisse de mouton, contre les douleurs articulaires.
- Cataplasmes de feuilles hachées, appliquées *in situ* et maintenues par un foulard, contre les rhumatismes, les céphalées, la fièvre, la toux et les affections pulmonaires, les morsures de serpents; appliques sur la plante des pieds comme emménagogue et abortif.
- Fumigations a base de plante sèche ou de graines pour le tétanos néonatal, les rhumatismes, les affections génitales féminines, les maladies mentales et nerveuses, les insomnies de l'adulte et de l'enfant (Hammiche *et al.*, 2013).

I.1.7 Utilisation pharmacologiques

I.1 .7.1 Effets cardiovasculaires

Peganum harmala est l'une des plantes médicinales les plus utilisées pour traiter l'hypertension et les maladies cardiaques dans le monde entier. Des expériences *in vivo* ont montré que différents extraits de *Peganum harmala* où ses principaux alcaloïdes actifs, harmine, harmaline, harman et harmalol, ont des effets cardiovasculaires différents, tels que la bradycardie, la diminution de la pression artérielle, le débit aortique de pointe et la force contractile cardiaque et vasodilatatrice (Aarons *et al.*, 1977) et des effets inhibiteurs antigéniques (Hamsa et Kuttan ,2010).

▪ ***Vasodilatatrices et effets antihypertenseurs***

L'extrait aqueux des graines de *Peganum harmala* est antispasmodique, anticholinergique, antihistaminique et a des effets anti-adrénergiques (Aqel et Hadidi, 1991). Une étude sur les effets cardiovasculaires de harmine, harmaline et harmalol a indiqué que ces trois alcaloïdes ont des effets vasorelaxants (Shi *et al.*, 2001). Dans la même étude, l'activité vasorelaxante de harman, un autre alcaloïde actif de *Peganum harmala*, a été montré avec un mécanisme d'interaction avec le type L canaux Ca^{2+} et l'augmentation de la libération de NO à partir des cellules endothéliales de façon dépendant de la présence externe de Ca^{2+} . Ces effets peuvent être impliqués dans son activité hypotensive. Il a été montré que harmaline, harmine et harmalol en diminuant aussi la pression artérielle systémique (Shi *et al.*, 2000).

▪ ***Effets sur le cœur***

Il y a eu quelques études menées sur les effets directs de l'extrait de *Peganum harmala* et ses alcaloïdes sur le muscle cardiaque. Dans une étude, il a été montré que les alcaloïdes isolés

(harmine, harmaline et harmalol) ont également diminué l'effet et la fréquence cardiaque normale chez des chiens anesthésiés (Aarons *et al.*, 1977).

▪ **Effet inhibiteur angiogénique**

Il a été révélé dans une étude que l'harmine est un inhibiteur angiogénique puissant. Cette substance peut réduire considérablement la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et l'expression de différents facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire, NO et les cytokines pro-inflammatoires. En outre, l'harmine diminue la production des cellules tumorales par d'autres facteurs, qui jouent un rôle important dans l'angiogénèse comme la cyclooxygénase (COX-2) (Hamsa et Kuttan, 2010).

▪ **Effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire**

Les alcaloïdes de *Peganum harmala* ont également semblent avoir des effets antiagrégants plaquettaires (Saeed *et al.*, 1991).

I.1 .7.2 Effets sur le système nerveux

Diverses études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué une large gamme d'effets produits par des alcaloïdes de *Peganum harmala* à la fois sur le système nerveux central et périphérique y compris, l'analgésie, l'hallucination, excitation et l'effet antidépresseur (Moloudizargari *et al.*, 2013). En outre, il a été prouvé que les β carbolines de *Peganum harmala* interagissent avec la dopamine, GABA, 5-hydroxytryptamine, benzodiazépine, et imidazoline au niveau de leurs récepteurs présents dans le système nerveux et de cette façon induisant leurs nombreux effets pharmacologiques (Moloudizargari *et al.*, 2013).

I.1 .7.3 Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire

Diverses études ont montré différents effets pharmacologiques comme antiparasitaires (Akhtar *et al.*, 2000; Astulla *et al.*, 2008), antifongiques, antibactériennes (Saadabi, 2006 ; Nenaah, 2010) et insecticides (Rharrabe *et al.*, 2007) des alcaloïdes dérivés des graines de *Peganum harmala*.

I.1 .7.4 Effets anticancéreux et antioxydants

Depuis longtemps, diverses préparations de *Peganum harmala* ont été utilisées dans le traitement de cancers et des tumeurs. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence la diminution de viabilité cellulaire de cellules cancéreuses provenant de divers tissus incluant le cerveau, le colon, le sein, le poumon, le foie, l'oesophage et les tissus gastriques, après un traitement par l'harmine. Plusieurs chercheurs ont montré la cytotoxicité de différents extraits

de *Peganum harmala* sur des lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* (Chen *et al.*, 2005). De nombreuses études pharmacologiques suggèrent un effet antioxydant de *Peganum harmala* (Hamden *et al.*, 2009).

I.1 .7.5 Effets sur le système immunitaire

Les β Carbolines de *Peganum harmala* sont montrés des effets immunomodulateurs dans plusieurs études (Wang *et al.*, 1996 ; Farzin et Mansouri, 2006). Des extraits de cette plante ont un effet anti-inflammatoire significatif via l'inhibition de certains médiateurs de l'inflammation prostaglandine.

I.1 .7.6 Effets antidiabétiques

Harmine est le principal alcaloïde de *Peganum harmala* qui est impliqué dans l'effet antidiabétique. Une étude a montré que ce composé régule l'expression du récepteur Peroxysomes Gamma Proliferator-Activated (PPAR γ), le principal régulateur de l'adipogénèse et la cible moléculaire des médicaments antidiabétiques, par inhibition de la voie de signalisation (Waki *et al.*, 2007). Des études récentes ont indiqué clairement que l'extrait éthanolique des graines de harmel, réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des rats normaux et diabétiques à des doses variables (150 et 250 mg/kg). Cependant, il a été rapporté que l'extrait de harmel n'a aucune activité sur la sécrétion d'insuline, puisque cette activité hypoglycémique est liée au pancréas. En effet, il affecte l'utilisation et/ou l'absorption du glucose (Jinous et Fereshteh, 2012).

I.2. Aspect phytochimique (Caractéristiques phytochimiques)

Le terme «métabolite secondaire» est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour des propriétés antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Epifano *et al.*, 2007).

Des études phytochimiques réalisées sur la plante *Peganum harmala* ont permis d'isoler plusieurs types de composés chimiques tels que les alcaloïdes, stéroïdes, flavonoïdes,

anthraquinones, acides aminés et les polysaccharides à partir des graines, feuilles, fleurs, tiges et des racines (Hua *et al.* , 2013).

I.2.1 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Ils sont synthétisés à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (Bhat *et al.*, 2005). Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (Hesse, 2002).

La plupart de ces alcaloïdes sont des alcaloïdes indoliques simples à **β carbolines** tels que, harmine, harmaline, harmalol, harmol, harman, tétrahydroharmine et harmalidine et des alcaloïdes **Quinazolines** comme : Peganine (vasicine), vasicinone (Mahmoudian *et al.*, 2002 ; Lamchouri *et al.*, 2013) et déoxyvasicinone.

I.2.1.1 Les bêta-carbolines (β carbolines)

L'harmaline, l'harmine, l'harmalol, l'harmol et le tétrahydroharmine sont identifiés et quantifiés comme étant les principaux alcaloïdes bêta-carbolines de *Peganum harmala*. Les graines et les racines contiennent un taux plus élevé des alcaloïdes avec un taux faible dans les tiges et les feuilles, et sont absent dans les fleurs. L'harmine et l'harmaline s'accumulent dans les graines sèches à **4,3** et **5,6%**, respectivement, d'harmalol à **0,6%** et de tétrahydroharmine à **0,1%**. Les racines contiennent l'harmine et l'harmol avec **2** et **1,4%** respectivement (Herraiz *et al.*, 2010).

I.2.1.1.1 La biosynthèse des alcaloïdes β carboline

Les β carbolines sont dérivés du tryptophane. Elles constituent un ensemble de composés hétérocycliques avec une structure pyrido indolique. En effet, le noyau de base comporte un indole accolé à un noyau pyridine. Le tryptophane, un acide aminé aromatique est un précurseur des β carbolines. La décarboxylation du L-tryptophane par la L-aminoacide décarboxylase aromatique (AADC) produit de la tryptamine. La synthèse commence par la

formation d'une base Schiff à partir de la tryptamine et un aldéhyde ou cétoacide par la réaction de Pictet-Spengler (Figure 3). Le composé obtenu va se réorganiser par une réaction de type Mannich-Like où le carbone C-2 du cycle indole agit comme un centre nucléophile aboutissant à la formation de tétrahydro-β-carbolines qui est progressivement s'oxyder en dihydro-β-carbolines et β-carbolines (Dewick, 2002). (Figure 3).

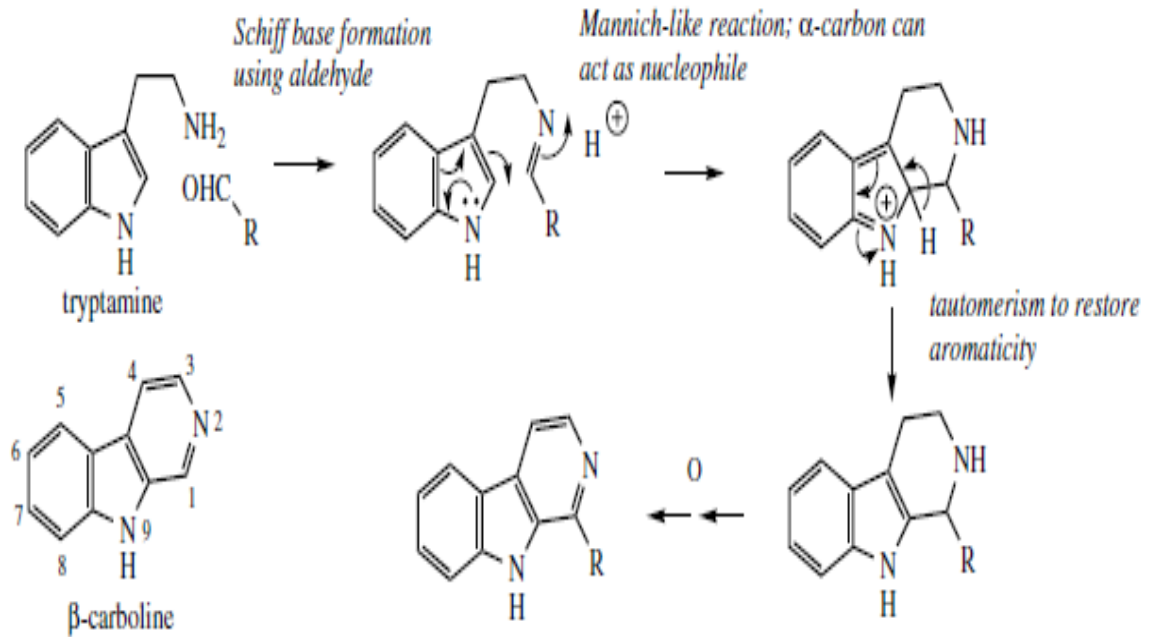


Figure 3 : Schéma général de biosynthèse des alcaloïdes β-carbolines (Dewick, 2002).

La formation de harmine, tétrahydroharmine, harman, harmaline est réalisée par des réactions successives d'oxydation et de méthylation (Qurat, 2013). Une décarboxylation oxydative donne le méthyle-1 β-carboline. L'oxydation de ce dernier génère une molécule d'harmane, tandis que son hydroxylation suivi d'une méthylation donne de l'harmaline. L'harmine est le résultat de l'oxydation de l'harmaline, par la perte d'une molécule d'eau provenant du groupe pyridine à six liaisons dans les positions C-3 et C-4 (Figure 4) (Dewick, 2002).

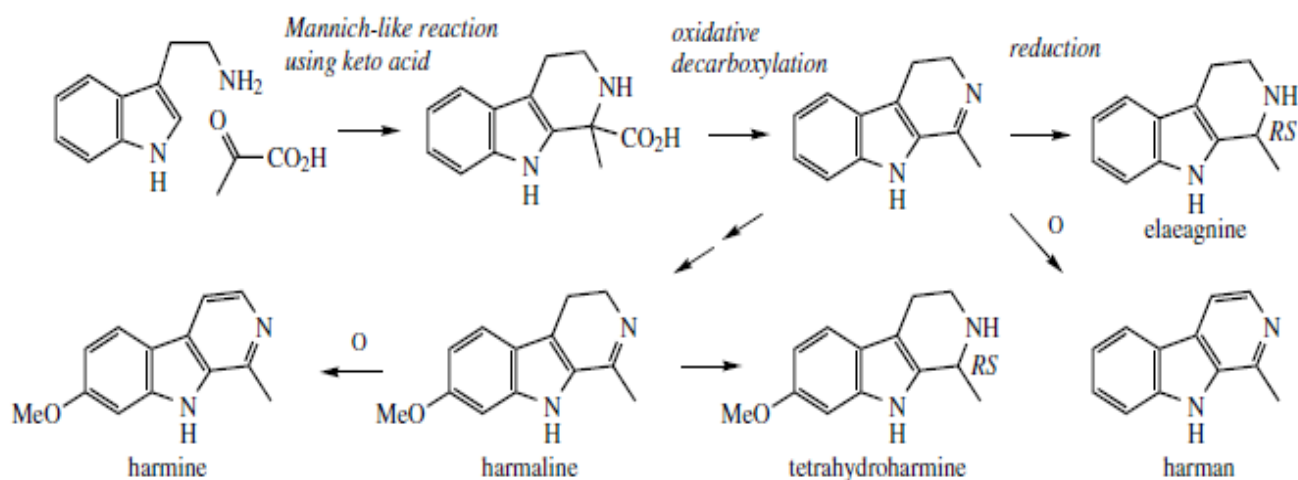


Figure 4: Schéma général de biosynthèse des alcaloïdes de la plante *Peganum harmala* (Dewick, 2002).

- **Harmaline (Harmidine):** C₁₃H₁₅ON₂ ou 7-méthoxy-1-méthyl-2,3,4,9-tétrahydro-1H-β-carboline. Il est le principal alcaloïde de *Peganum harmala* et le premier qui a été isolé par Göbel à partir des graines et des racines. Ce composé est légèrement soluble dans l'eau, l'alcool, tout à fait soluble dans l'alcool chaud et acides dilués. Harmaline est presque deux fois plus toxique que harmine. La dose létale entraîne des convulsions, qui sont bientôt suivis par la paralysie due à l'action dépressive marquée sur le système nerveux central (Figure 5) (Mahmoudian *et al.*, 2002).

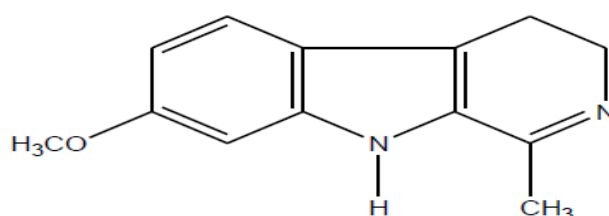


Figure 5: Structure de harmaline (El Gendy *et al.*, 2013).

- **Harmine (Banisterine)** C₁₃H₁₂ON₂, 1-méthyl-7-méthoxy-β-carboline. L'harmine est une molécule naturelle initialement isolée à partir de plantes telles que *Peganum harmala*. Cette molécule était, à l'origine, utilisée par les indigènes d'Amérique du Sud en tant qu'ingrédient principal de l'ayahuasca, une décoction de plantes consommée, notamment, pour ses effets hallucinogènes (Figure 6) (McKenna *et al.*, 1984). Il est légèrement soluble dans l'eau, l'alcool ou l'éther. Ses solutions de sels montrent une fluorescence bleu profond.

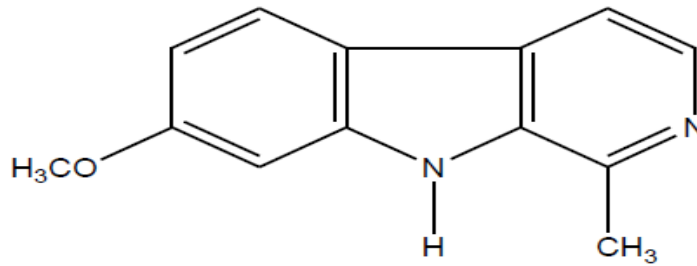


Figure 6 : Structure chimique de harmine (Asgarpanah et Ramezanloo, 2012).

- **Harmalol :** $C_{12}H_{12}ON_2$ - (1-Methyl-4,9-dihydro-3H-pyrido [3,4-b]indole-7-ol) est un alcaloïde instable lorsqu'il est exposé à l'air. Il est cristallisé dans l'eau sous forme de tri- hydrate. Soluble dans l'eau chaude, l'acétone ou le chloroforme, mais peu soluble dans le benzène (Figure 7) (Mahmoudian *et al.*, 2002).

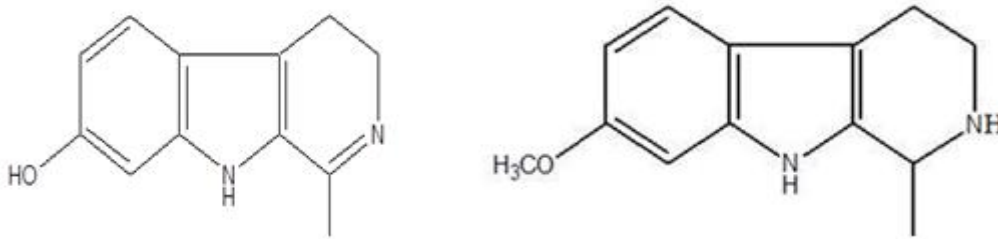


Figure7 : Structure chimique de harmalol et harmol (El Gendy *et al.*, 2013).

- **Harman :** $C_{12}H_{10}N_2$ il est d'abord isolé de l'écorce d'*Arariba rubra*, originaire du Brésil. Cet alcaloïde est cristallisé dans plusieurs solvants organiques sous forme de prismes incolores. Il est facilement soluble dans le méthanol, l'acétone, le chloroforme ou l'éther, mais modérément soluble dans l'eau chaude. Il se dissout dans les acides minéraux et présente une fluorescence bleu-violet (Figure 8) (Mahmoudian *et al.*, 2002).

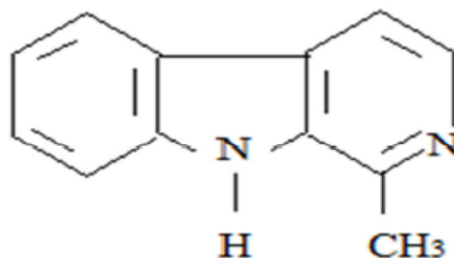


Figure 8 : Structure chimique de harman (Nenaah, 2010).

➤ **Autres β carbolines isolés de la plante *Peganum harmala***

Harmalicydine et tétrahydroharmine, d'autres β carbolines qui ont été isolés de la plante *Peganum harmala* (Figure 9).

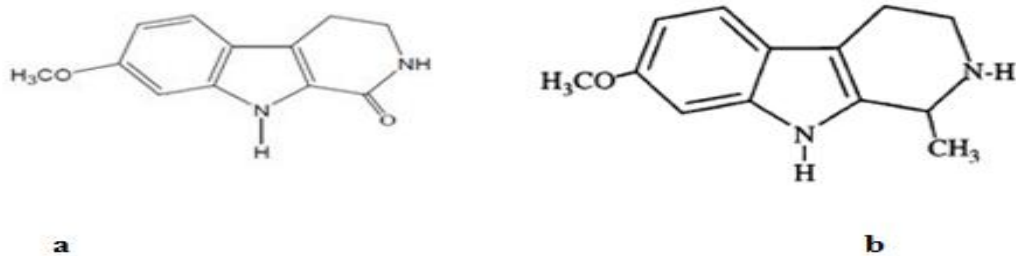


Figure 9 : Structure chimiques de harmalicydine (a) et tétrahydroharmine (b) (Frison *et al.*, 2008 ; Qurat ,2013).

I.2.1.2 Les alcaloïdes Quinazolines

Les graines de *Peganum harmala* contiennent également une autre classe des alcaloïdes, les quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique (Figure 10) (Qurat ,2013).

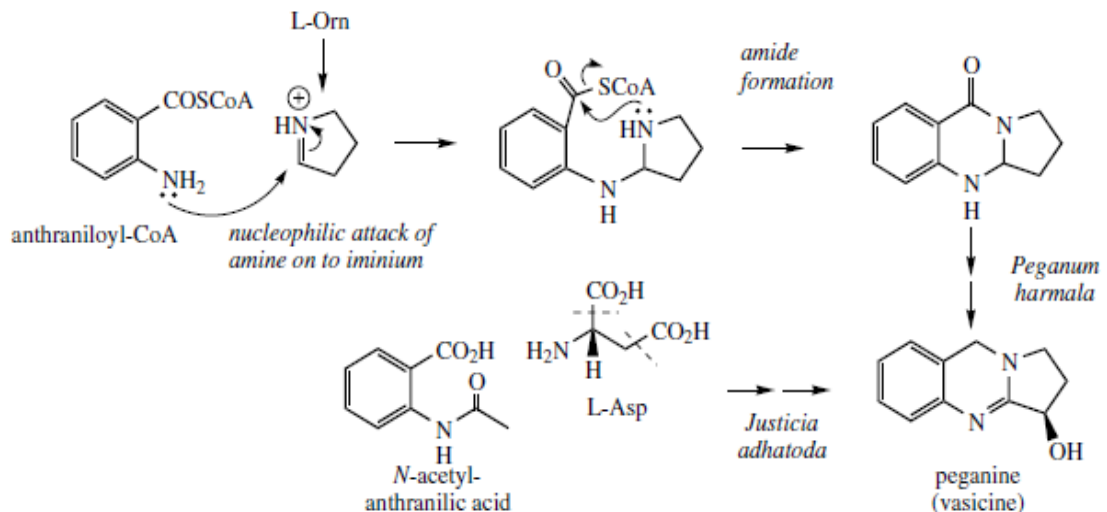


Figure 10 : Schéma général de biosynthèse des alcaloïdes quinazolines de *Peganum harmala* (Dewick, 2002).

Les alcaloïdes quinazolines isolés à partir des différentes parties de la plante *Peganum harmala* sont représentés par la Péganine, le Vascinone (Zharekeev *et al.*, 1974) (Figure11) et la Déoxyvasicinone . Astullah *et al.*, 2008 ont isolés deux autres alcaloïdes Dipeganine et Dipeganol à partir de l'extrait méthanolique des graines de *Peganum harmala* (Figure11).

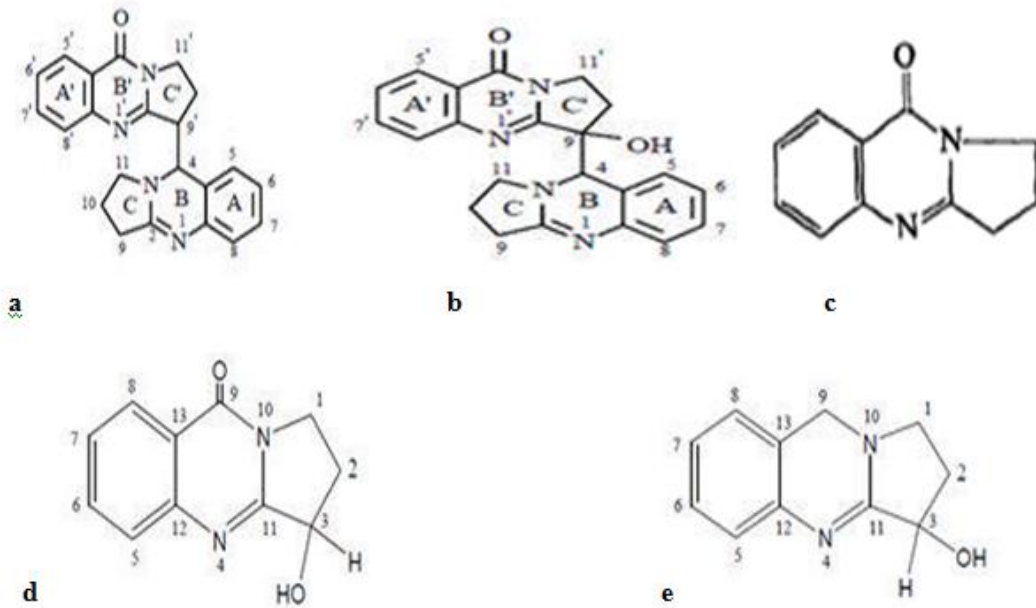


Figure 11: Structure chimique de (a)Vascinone (b) Péganine (c) Déoxyvasicinone (d) Dipeganine (e) Dipeganol (e) (Qurat, 2013).

I.2.1.3 Toxicité des alcaloïdes

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).

Toute la plante est toxique due à la présence des alcaloïdes dont le taux est plus élevé dans les graines (3 à 4%). La teneur en alcaloïdes augmente en été, durant la phase de mûrissement du fruit, au moment de la récolte de la graine (Salah *et al.*, 1986).

I.2.1.3.1 Circonstance(s) de l'intoxication

Une étude épidémiologique d'intoxication par la plante *Peganum harmala* L. au Maroc sur 200 cas a montré que la circonstance **thérapeutique** occupait la première place avec 32,5 %, suivie par **le suicide** (28,5 %) et **l'avortement** (13,5 %). La répartition des circonstances selon le sexe a montré que le sexe féminin était prédominant dans toutes les circonstances, en effet, presque la moitié des cas colligés ont concerné des femmes utilisant la plante dans un but thérapeutique (25 %) ou suicidaire (24,5 %) (Achour *et al.*, 2012).

I.2.1.3.2 Toxicococinétiqne des alcaloïdes de *Peganum harmala*

- Les principales voies d'exposition aux alcaloïdes

L'ingestion : est la principale voie d'administration et d'intoxication connue (Tahri *et al.*, 2004).

L'inhalation par fumigation est une pratique courante soit dans un but thérapeutique soit en prophylaxie magique. La plante fraîche est également utilisée par **voie cutanée** sous forme de cataplasmes et onguents (Hammiche et Merad, 1997 ; Tahri *et al.*, 2004).

- L'absorption dépend de la voie d'exposition: après ingestion des graines, les alcaloïdes sont absorbés en quelques minutes par le tractus gastro-intestinal, atteignant en 15 à 30 minutes, les organes cibles (SNC et cœur). En fumigation ces organes sont touchés en 5 à 10 mm (Tahri *et al.*, 2004).
- La distribution des β carbolines se fait dans tout l'organisme, et, il est reconnu qu'elles passent la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Gilbert *et al.*, 2017). Par la suite, l'harmine et l'harmaline sont métabolisées par le cytochrome P450 2D6. Elles subissent une O-déméthylation pour donner respectivement l'harmol et l'harmalol (Zhao *et al.*, 2011).
- Le catabolisme hépatique par sulfo et glycuco-conjugaison a été mis en évidence chez le rat et confirmé sur le foie humain.

I.2.1.3.3 Toxicodynamique des alcaloïdes

I.2.1.3.3.1 Effets et symptômes

Chez l'homme

Les signes neuropsychiques restent les symptômes les plus fréquents. Ils sont représentés essentiellement par les hallucinations visuelles, l'obnubilation, les vertiges, les convulsions pouvant aller jusqu'au coma profond (Achour *et al.* , 2012).

L'ingestion de β carbolines entraîne plusieurs effets indésirables. On retrouve notamment des manifestations non spécifiques telles que des troubles digestifs comme des nausées et des vomissements. Au niveau musculaire, de manière plus marquée, une faiblesse est ressentie, et est accompagnée de tremblements de tous les membres et d'engourdissements. Il a même été décrit des cas de paralysie des membres postérieurs puis antérieurs, chez des animaux, après injections de β carbolines. Ces paralysies ont été accompagnées de convulsions (Aude, 2017).

De plus, des sueurs et des étourdissements peuvent survenir. Après cette première phase symptomatique, le sujet est détendu et semble ne plus avoir d'intérêt pour ce qui l'entoure.

Les effets cardiovasculaires apparaissent par la suite et se manifestent par une bradycardie, une arythmie et une hypotension (Aude, 2017).

- **Doses toxiques**

Les β -carbolines peuvent être utilisées par voie orale ou par voie injectable. Les doses entraînant des effets chez l'homme sont référencées pour l'harmine et l'harmaline. Par voie orale, les effets seraient ressentis entre 150 et 400 mg d'harmaline, et, entre 300 et 800 mg d'harmine. En fonction de la dose ingérée, ces manifestations perdureraient entre 5 et 8 heures. Par voie intraveineuse, les doses entraînant un effet seraient comprises entre 70 à 100 mg d'harmaline, et entre 140 et 200 mg d'harmine (Amar et Louis , 2002).

- ✚ **Chez l'animal**

L'intoxication chez l'animal se traduit par une excitabilité, des tremblements, une rigidité musculaire, une démarche chancelante et une respiration saccadée. L'animal est dans un état narcotique interrompu d'une courte période d'excitation. Après quelques heures, Il y a apparition d'une dyspnée et d'une mydriase, d'une hypothermie, de troubles urinaires avec avortement en cas de gestation (Tahri *et al.*, 2004).

- **Doses toxiques**

Les doses toxiques de divers alcaloïdes dans différentes espèces sont montrées dans le (tableau 1) (Mahmoudian *et al.*, 2002).

Tableau1 : Les doses toxiques des alcaloïdes β carbolines sur différentes espèces.

Alcaloïdes	Réponse	Animale	Dose mg/kg
Harmaline	DL-sc	rats	120
Harman	DL-sc	Lapins	200
Harmine	DL ₅₀ -iv	Souris	38
Harmine	DL-sc	rats	200

I.2.1.3.3.3 Mécanisme et site d'action

- ✓ L'harmine est un inhibiteur de la monoamine oxydase (MAO), enzyme catalysant la désamination de neurotransmetteurs tels que la dopamine et la sérotonine. Les inhibiteurs de cette enzyme sont notamment étudiés pour le traitement de la dépression et de la maladie de Parkinson. Bien que l'harmine possède des propriétés pharmacologiques intéressantes, il est à noter que cette molécule présente un caractère neurotoxique *in vivo*. En effet, il a été montré que son injection s'accompagne de tétanie, de mouvements de convulsion ou encore de tremblements, ces effets

s'estompant plusieurs minutes après injection (Meinguet et Wouters, 2015). Ces alcaloïdes ont tous en commun un noyau indole présentant une analogie structurelle avec la molécule de sérotonine connue pour son rôle important dans le fonctionnement du système nerveux central. Il est probable que l'activité hallucinogène, trémogène et modificatrice du comportement de ces substances soit en rapport avec cette structure indolique (Aaronse *et al.*, 1977).

- ✓ La harmaline et la harmine sont des antagonistes de la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué dans le mode d'action des hallucinogènes indoliques. La harmaline et la harmine prennent la place de la sérotonine dans les mécanismes enzymatiques en raison de la ressemblance des structures. Ceci serait à la base de l'effet stimulant du système nerveux central (Tahri *et al.*, 2004).
- ✓ L'harmine et l'harmaline exerceraient une action anti-cholinergique centrale mais à forte dose peuvent provoquer des crises d'agitations et des manifestations digestives, alors que l'harmane exerce une action inhibitrice du système dopaminergique central, induisant à dose élevée une sédation et des perturbations du sommeil paradoxal (Achour *et al.*, 2012).
- ✓ L'utilisation de cette plante à des fins abortives ou pour activer le travail à terme est connue. L'avortement a été également décrit chez l'animal, certains ingérant cette plante dans un contexte d'année sèche (El-Bahri et Chemli, 1991). Les progrès de la chimie et de la pharmacologie ont pu démontrer que l'activité abortive du harmel est due à ces dérivés de la quinazoline, qui provoquent une contraction du muscle utérin via une induction de la sécrétion des prostaglandines (Zutshi *et al.*, 1980 ; Shapira *et al.*, 1989).
- ✓ Cependant, il est signalé que la Péganine et la Désoxypégamine qui ont été détectés pour la première fois dans l'urine d'un patientes 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, avec la désoxypégamine montrant une activité anticholinestérase 10 fois supérieure à celle de la Péganine chez des chats anesthésiés (Tuliaganov *et al.*, 1986).

I.2.1.3.3.4 Traitement

Il n'existe **pas de traitement antidotique**. La prise en charge du malade consiste à préciser, d'abord le **mode d'administration et la quantité ingérée**.

L'administration du charbon activé et/ou de laxatifs pourrait être utile en fin de lavage. Il serait recommandé d'effectuer une accélération de l'épuration rénale par une diurèse aqueuse isotonique (diurèse > à 3 L/24 heures), tout en surveillant la diurèse horaire et le monitoring cardiaque. Par défaut d'antidote, le traitement reste essentiellement symptomatique, reposant sur la correction des troubles digestifs, cardiaques et neurologiques, surtout (Tahri *et al.*, 2004).

I.2.2 Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (Lebham, 2005). L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylque, ester, sucre) (Bruneton, 1993).

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Adrian et Frangne, 1991 ; Milane, 2004).

I.2.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Figure 12) (Tapas *et al.*, 2008).

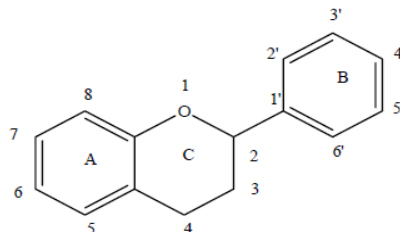


Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (Sadasivam et Thayumanavan, 2003).

L'analyse de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Peganum harmala* a permis d'isoler quatre flavonoïdes glycosides, acacétin 7-O - rhamnoside, 7-O -6"-O-glucosyl-2"-O-(3"-O-glucoside d'acetylramnosyl), 7-O-(2"-O-rhamnosyl-2"-O-glucosylglucoside) et glycoflavone 2"-O rhamnosyl-2"-O-glucosylcytoside. (Figure 13) (Sharef *et al.*, 1997).

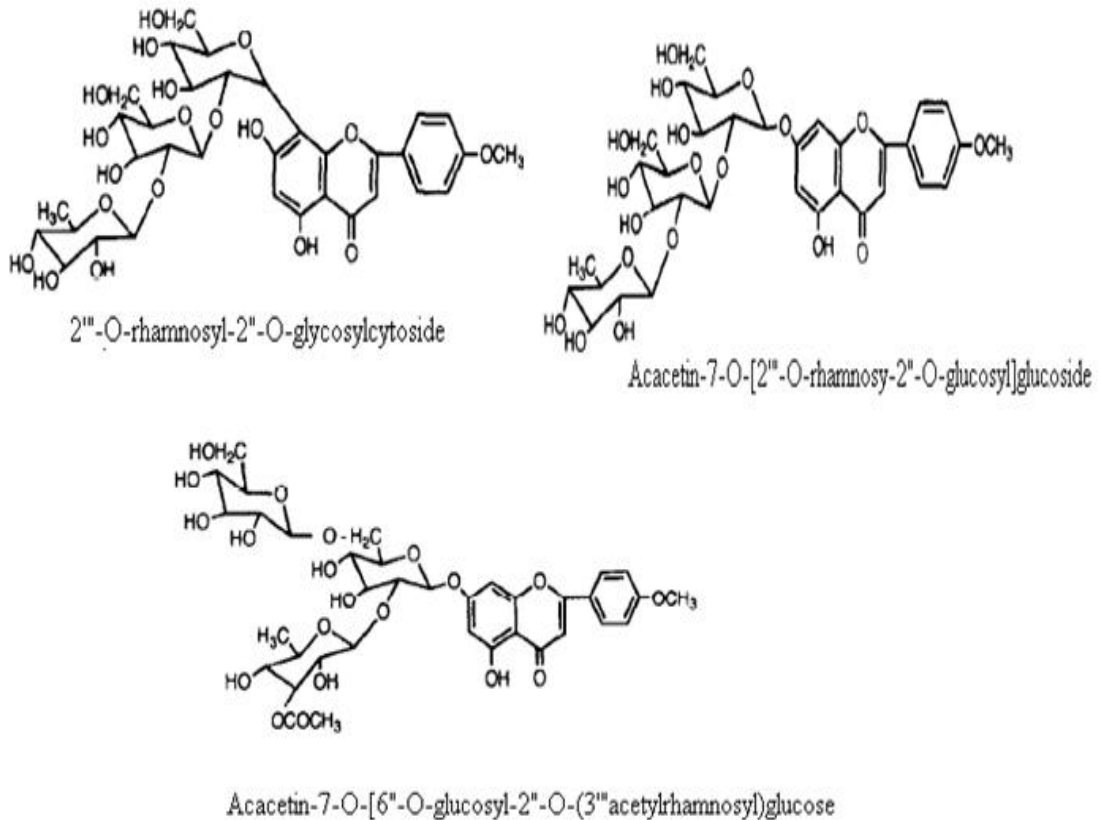


Figure 13: Les flavonoïdes isolés de *Peganum harmala* (Sharef *et al.*, 1997).

I.2.3 Les terpènes ou terpénoïdes

Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés pré-nologiques, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique. Le terme de terpénoïdes est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Jusqu'à présent, dix triterpénoïdes ont été identifiés à partir du genre *Peganum*. Quatre triterpénoïdes : l'ester méthylique de l'acide 3, 27-dihydroxyl-20 (29) -en-28-oïque, ester méthylique de l'acide 3 -acétoxy-27-hydroxylup-20 (29) -en-28-oïque et acide 3 -acétoxyolean-12-ène-27,28-dioïque 28-méthylester ont été isolés de l'extrait éthanolique des racines de *Peganum nigellastrum* (Ma *et al.*.,2007).

I.2.4. Anthraquinones

Une étude réalisée sur les graines de *Peganum harmala* a permis d'isoler trois anthraquinones, la peganone I, la peganone II et l'anthraquinone glucoside. Les structures ont été déterminées par comparaison de leurs RMN, SM, données physiques avec ceux décrits dans les littératures (Fan et Yao, 1992, Li, 2005).

I.3. Aspects pharmaco-toxicologiques

I.3.1 L'activité antioxydante

I.3.1.1 Stress oxydant : Généralités

Les Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Le stress oxydant est la résultante d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les systèmes de défenses antioxydants (Fendri *et al.*, 2006). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008).

I.3.1.2 Les radicaux libres

L'oxygène est indispensable à la plupart des espèces vivantes ; il donne, en effet, un énorme avantage métabolique pour la production d'énergie. Cependant, en raison de sa conformation chimique, la molécule d'oxygène peut, dans certaines circonstances, s'avérer toxique. Cette toxicité est induite par des éléments réactifs, instables et pro-oxydants : les espèces oxygénées activées ou encore les formes réactives de l'oxygène (ERO, FRO) (Moffarts *et al.*, 2005).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. L'appellation ROS inclut **les radicaux libres de l'oxygène** : anion superoxyde (**O₂•-**), radical hydroxyle (**OH•**) mais aussi certains dérivés **oxygénés non radicalaires** dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (**H₂O₂**). A côté des ROS, il existe des ERN (**espèces réactives nitrogénées**) dont le représentant majeur le **NO•** (Finaud *et al.*, 2006).

I.3.1.2.1 Principales ERO de l'organisme et mécanismes de leur production

Les origines du stress oxydant sont multiples et mènent à la formation de FRO au sein de l'organisme. Les FRO comprennent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques possédant un électron célibataire, ainsi que des molécules non-radicalaires mais chimiquement instables. Ainsi, les FRO possèdent un pouvoir prooxydant vis-à-vis des

éléments qui les entourent. La (Figure 14) présente les origines d'un stress oxydant en fonction du mode de production des FRO. Trois voies de génération endogène des FRO sont généralement décrites (Cheeseman et Salter, 1993), à savoir : **la chaîne de transfert des électrons située au niveau des mitochondries** (Sohal *et al.*, 2002) ; **la flambée respiratoire des cellules phagocytaires**, ces dernières étant indispensables à la défense immunitaire (Moslen, 1994 ; Rahman *et al.*, 1996) ; ainsi que **l'activité des enzymes de type oxydase** (Becker *et al.*, 1991).

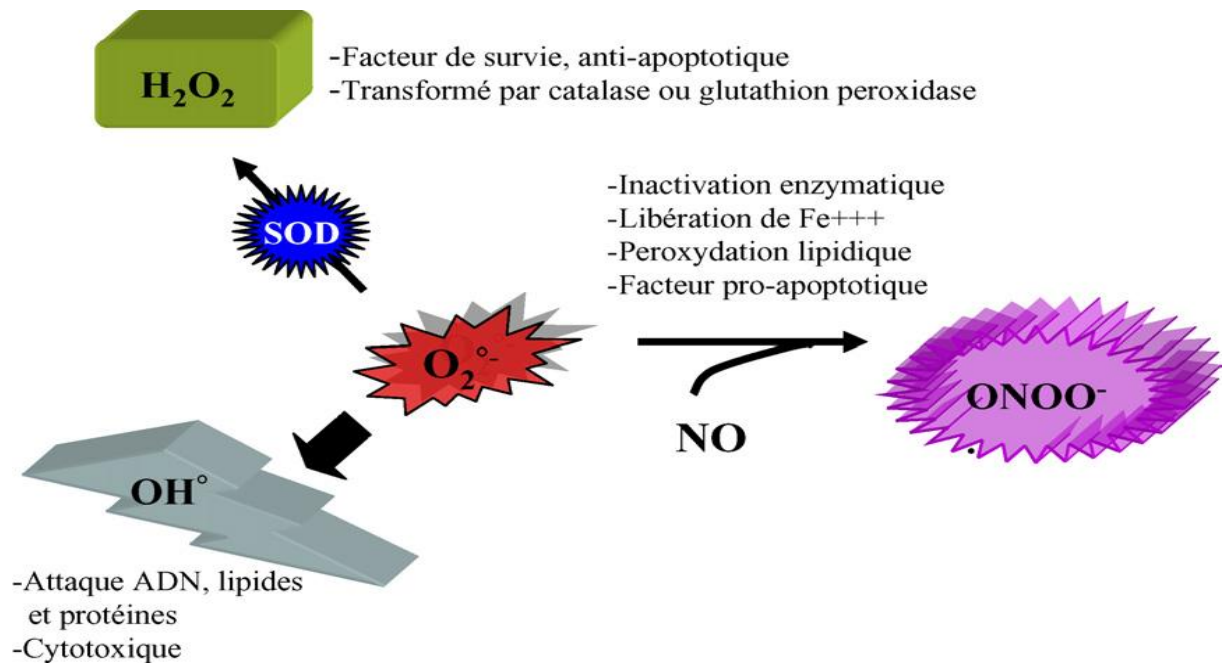


Figure 14 : Anion superoxyde et ses dérivés (Valéry *et al.* , 2007).

L3.1.2.2 Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information . La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical OH[•] s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'ADN (ADN), qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Les radicaux O₂^{•-} et OH[•] provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des

altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Hartmann *et al.*, 2000) (Figure 15).

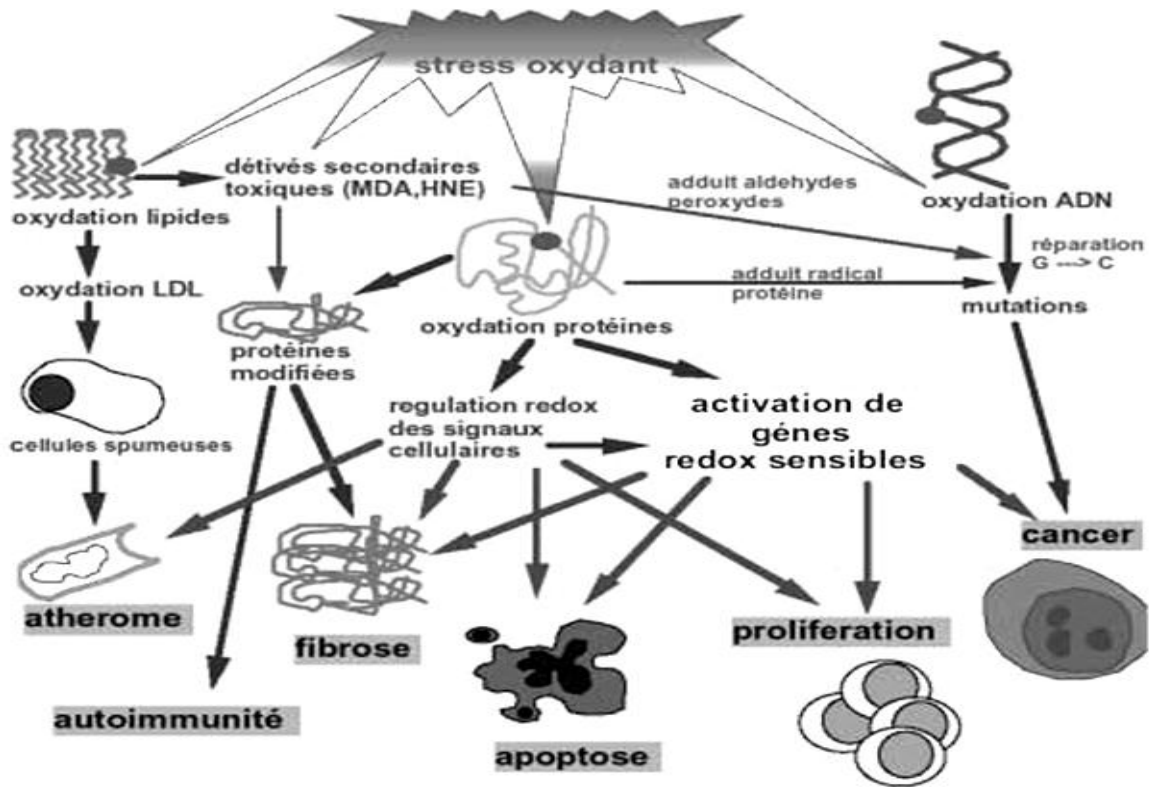


Figure 15 : Conséquences pathogènes du stress oxydant (Favier, 2006)

Le système oxydant attaque et endommage par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines, l'ADN.

Les attaques des EOR sur les protéines induisent l'apparition de groupements carbonyles, de cystéines oxydées, de fragments peptidiques (détachements d'acides aminés) ou d'agrégats protéiques (Figure 15). Ces protéines dénaturées par le stress oxydant sont particulièrement susceptibles à la protéolyse afin d'éviter leur accumulation dans le noyau, le cytoplasme ou le réticulum (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.3.1.3 Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les antioxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (Behera *et al.*, 2006). Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (Figure 16)

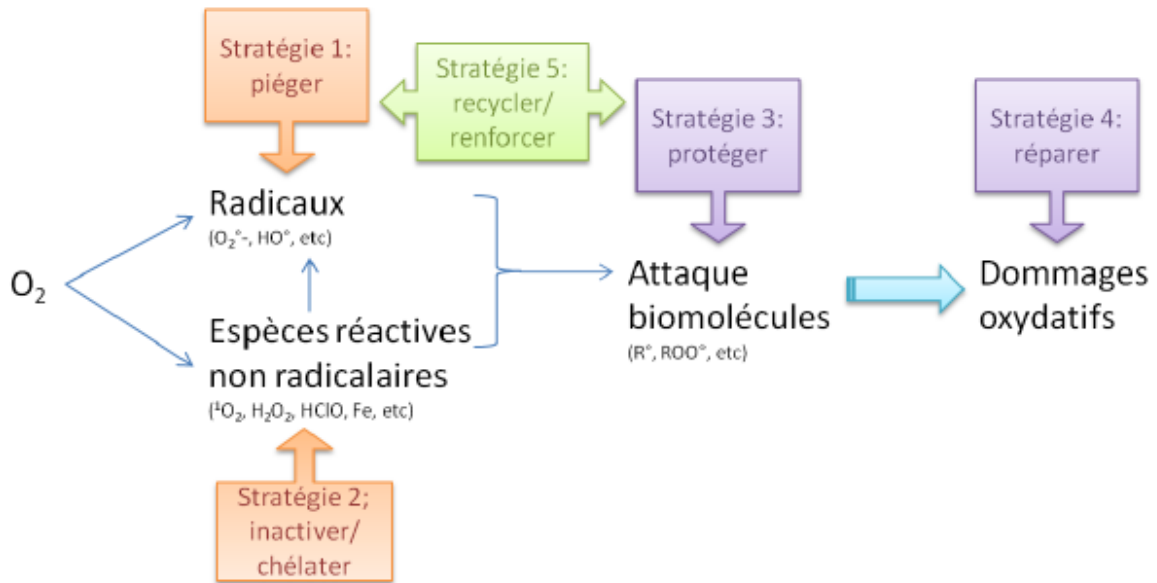


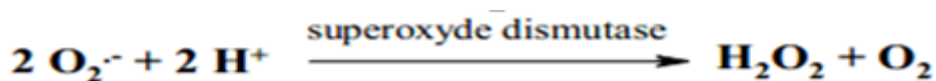
Figure 16 : Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant (Vetagro, 2011).

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique. On distingue classiquement 2 catégories d'antioxydants : les systèmes enzymatiques et les systèmes non-enzymatiques

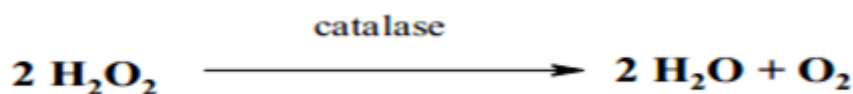
I.3.1.3.1 Systèmes enzymatiques

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :

- **Super oxyde dismutase (SOD) :** Chez l'être humain, il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (Landis et Tower, 2005).

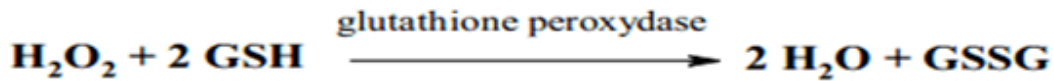


- **Catalase :** Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (Valko *et al.*, 2006). Elle permet de convertir deux molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂.



- **Glutathion peroxydase (GPx):** Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des

peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Valko *et al.*, 2006).



I.3.1.3.2 Systèmes non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols (Kanoun, 2011).

- **Le glutathion et les protéines-thiols**

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire (Haleng *et al.*, 2007).

- **Vitamine C**

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA (HO• ou O₂•-). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng *et al.*, 2007 ; Fisher-Wellman et Bloomer, 2009).

- **Vitamine E**

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes

(ROO•) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Si l'α-tocophérol est le plus abondant, il semble que le γ-tocophérol soit le plus efficace à ce niveau (Haleng *et al.*, 2007).

- **Les caroténoïdes**

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation des plusieurs substrats dont l'acide gras poly insaturée (Pelmont, 2005), elles agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (koechlin–ramonatxo, 2006).

- **L'acide urique**

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH•, ROO•, NOO•). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (Vasconcelos *et al.* ; 2007). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EOA, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant (Haleng *et al.*, 2007).

- **Les oligoéléments**

- **Le sélénium**

Le sélénium n'est pas un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx (Glutathion peroxydases). Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail (Deepali *et al.*, 2013).

- **Le cuivre**

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) (Laliberte *et al.*., 2008).

➤ **Le zinc**

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires. L'activité antioxydant du zinc pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (Delattre *et al*, 2005).

I.3.1.4 Quelques méthodes d'étude de l'activité antioxydante des plantes médicinales

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant. Nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : **FRAP** (Ferric reducing antioxidant power), **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity), **TEAC** (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou **ABTS** (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6- sulphonate) et **DPPH+** (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl). Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva *et al.*, 2010).

I.3.2 Activité antibactérienne

▪ **Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances naturelle ou synthétique, qui agissent à faible concentration sur les microorganismes en bloquant des étapes métaboliques indispensables à leur survie ou à leur croissance. Les antibiotiques ont longtemps été considérés comme des armes efficaces pouvant éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, l'utilisation abusive de ces composés dans le domaine médical a eu pour conséquence l'apparition progressive d'une multitude de résistances chez les microorganismes.

Des espèces bactériennes développent des mécanismes de défense de chaque antibiotique par plusieurs mécanismes (Lemaoui *et al.*, 2017). Il s'agit de la production des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques, la modification dans la structure des cibles d'action des antibiotiques, la substitution de la cible, la modification de la perméabilité vis-à-vis les antibiotiques, la formation d'un biofilm et l'activation du processus de l'efflux actif.

I.3.3 Activité antifongique

▪ **Les antifongiques**

Les antifongiques (ou antifungiques) tirent leur nom du latin *fungus* qui signifie champignons. Ce sont donc des composés capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

I.3.4 Les méthodes d'étude des antibiotiques et des antifongiques

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des différents extraits des plantes. Les techniques utilisées ont une grande influence sur les résultats.

- **La méthode de dilution**

Une série de milieux de culture (liquides ou solides) est réalisée avec une concentration croissante des solutions à tester. On ensemence ensuite chaque milieu avec une quantité connue de microorganismes, puis on incube 18 à 24 h à 37 °C.

Après incubation la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le milieu qui contient la plus faible concentration des solutions à tester et où aucune croissance n'est visible (Bertholle, 2010).

- **La méthode de diffusion**

La méthode de diffusion ou antibiogramme standard sont les plus utilisés en bactériologie médicale, appelée encore méthode de disques. Cette technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés de l'antibiotique à étudier, déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture des microorganismes à étudier.

Après incubation, des disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (Delignette_Muller, 1992).

- **La méthode bioautographique**

C'est une technique qui permet la détection de composés antimicrobiens au sein d'un extrait de plante. En effet, la bioautographie est une technique de laboratoire visant à découvrir les substances qui affectent les taux de croissance des organismes d'essai dans des mélanges complexes et des matrices. La méthode est basée sur l'activité biologique de l'analyte qui peut être antibactérienne, antifongique, anti-tumorale, antiprotozoaire (Rahalison *et al.*, 1991).

I.3.5 Etude de la toxicité des plantes

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités. L'Homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique (Bismuth *et al.*, 1987).

- **Toxicité aiguë**

Les essais de la toxicité aiguë sont généralement les premiers essais effectués. C'est un test dans lequel une dose élevée unique de la substance testée est utilisée sur l'animal dont le but est de déterminer les comportements et DL₅₀ (représente la dose estimée qui provoque la mort de 50% d'une population des espèces exposées). La détermination de la DL₅₀ est

habituellement une première étape d'évaluation des caractéristiques toxiques d'une substance. (LeBlanc, 2010).

➤ **Toxicité subaiguë**

Elle consiste à étudier les conséquences néfastes de l'administration répétée de la dose étudiée. Le produit est administré quotidiennement, une ou deux fois par jour, pendant une durée de 1 à 3 mois en général (Frank, 1992).

Ces épreuves ont pour objet :

- De mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives à l'administration répétée des substances actives examinées.
- D'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie.
- De mettre en évidence les organes cibles.

➤ **Toxicité chronique**

Elle permet de caractériser le profil toxicologique d'une substance chez les animaux, à la suite d'une exposition répétée et prolongée au-delà de 90 jours.

Contrairement aux études de la toxicité aiguë, les objectifs des études de la toxicité subaiguë et les études chroniques sont :

1. Déterminer les effets toxicologiques de l'administration répétée d'un produit chimique testé sur des organes cibles.
2. Établir des relations dose-réponse (concentration-effets) en utilisant divers indicateurs sur les gammes de dosage et les durées d'exposition choisies.
3. Vérifier expérimentalement le niveau maximal de la dose qui ne favorise pas une toxicité apparente avec exposition répétée.
4. Proposer un mécanisme de la toxicité du produit chimique (Frank, 1992).
5. De mettre en évidence les organes cibles

I.3.6 Les principaux organes cibles aux produits toxiques

I.3.6.1 Le foie

Le foie murin, à la différence du foie humain est anatomiquement plurilobé: celui d'une souris adulte pèse environ 3 à 5g (Koniaris *et al.* , 2003). Il est constitué de 5 lobes (Figure 17): le lobe gauche, le lobe médian, le lobe droit et les deux lobes caudaux (ou de Spiegel). Comme chez l'homme la souris présente aussi une vésicule biliaire. Il remplit de nombreuses fonctions métaboliques et a été désigné avec raison comme le laboratoire central de l'organisme. D'une part, il participe au processus de la digestion par la sécrétion biliaire et d'autre part, il transforme l'apport discontinu des substances absorbées par le tube digestif en

un flux continu de substances nutritives qui assurent une fourniture suffisante de principes nutritifs à l'organisme. Le foie se trouve de ce fait exposé à diverses agressions qui ont parfois de graves répercussions sur tout l'organisme (Guillouzo *et al.*, 2007).

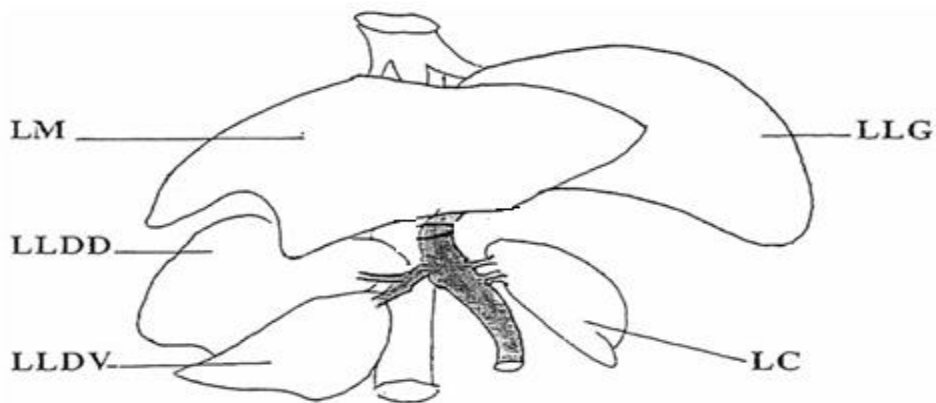


Figure 17 : Aspect macroscopique du foie. LM : lobe médian ; LLG : lobe latéral gauche ; LLDD : lobe latéral droit dorsal ; LLDV : lobe latéral droit ventral ; LC : lobe caudé (Lorand *et al.*, 2000).

Sur le plan histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules (Lamers *et al.*, 1997). Les lobules hépatiques sont organisés autour d'une veine centrale, et séparés entre eux par des espaces portes contenant des canaux biliaires, des petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Les lobules ont une forme hexagonale et sont constitués de travées cellulaires de 20 à 25 hépatocytes, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur desquelles cheminent les sinusoides hépatiques.

Les hépatocytes sont séparées par des fines sinusoides vasculaires a travers lesquels circule le sang. Le foie présente donc la particularité d'être irrigué a la fois par du sang artériel et veineux et d'être draine par un système veineux distinct (Horn *et al.*, 2005 ; Young *et al.*, 2008).

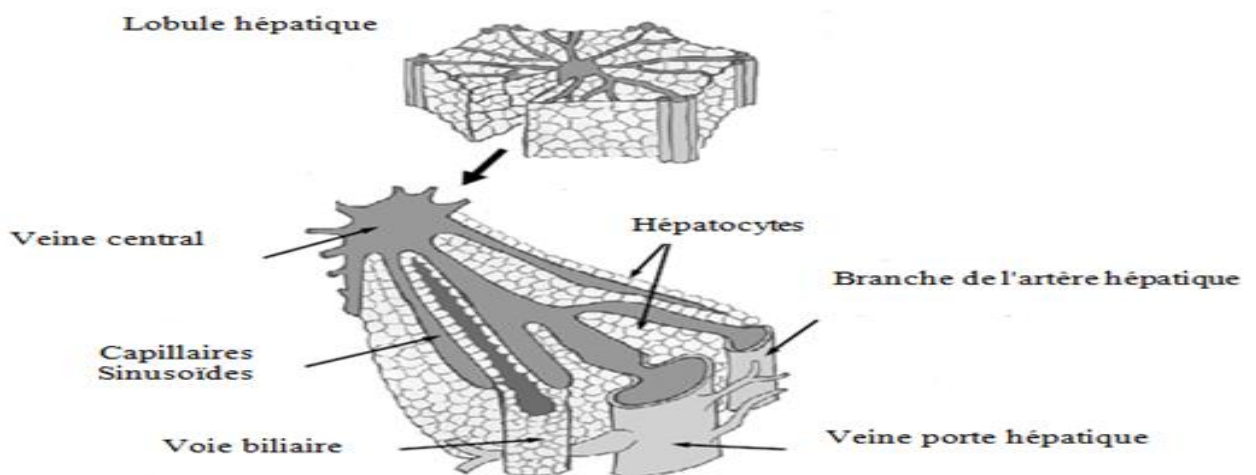


Figure 18: Structure de lobule hépatique (Butura ,2008).

I.3.6.1.1 Hépatotoxicité

Le foie est le site principal des biotransformations des xénobiotiques ; toute affection hépatique, en modifie le métabolisme et par conséquent, la toxicité (Viala, 2007). Hépatotoxicité est définie comme le pouvoir qu'a une substance (comme les médicaments ou des composés d'une plante) et quelque soient les mécanismes mis en jeu, provoquer des dommages au foie.

La toxicité se manifeste sous forme d'inflammation (on parlera d'hépatite) ou encore de nécrose (mort des cellules du foie), dans les cas plus sévères. La stéatose hépatique survient lorsqu'il y a accumulation de gras dans le foie.

I.3.6.1.2 Marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

Un bilan hépatique consiste à doser certaines enzymes ou certaines substances transformées ou fabriquées par le foie afin d'apprécier le bon fonctionnement et le métabolisme de l'organe. Les principaux tests biologiques hépatiques réalisés couramment sont les dosages des transaminases, des gamma-glutamyl transpeptidases (γ GT), des phosphatases alcalines et de la bilirubine. (Berthélémy, 2015).

- **Les transaminases (ou aminotransférases)**

Alanine aminotransférase (ALAT ou TGP) et l'Aspartate aminotransférase (ASAT ou TGO), sont des enzymes libérées dans la circulation en cas de lésions cellulaires, donnant une bonne indication du fonctionnement du foie. Elles sont abondantes dans le foie et les muscles.

L'ALAT se trouve majoritairement dans le foie. Une augmentation de sa concentration sérique signe une atteinte hépatocellulaire. Ce test est donc beaucoup plus spécifique d'une lésion hépatique que l'ASAT. Les ALAT sont dosées lors de tout don du sang.

L'ASAT se trouve non seulement dans le foie mais également dans le muscle cardiaque, les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, le pancréas, les poumons, les leucocytes et les érythrocytes. (Berthélémy, 2015).

- **Les γ GT**

Sont produites par les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires. Ce sont des marqueurs de la cholestase hépatique mais elles sont peu spécifiques et peuvent être augmentées, non seulement en cas de diabète, de consommation d'alcool et de cholestase, mais aussi lors d'une maladie pancréatique, d'un infarctus, d'une insuffisance rénale, d'une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et de la prise de certains médicaments (Beaudeau et Durand, 2011).

- **La phosphatase alcaline (PA)**

Présente dans le foie, l'intestin, l'os, le placenta et les reins. Comme les γ GT, c'est un marqueur de la cholestase (Baudin, 2017).

- **La bilirubine**

Un pigment jaune synthétisée par le système réticulo-endothélial des cellules hépatiques, transportée dans le sérum, conjuguée dans le foie et excrétée dans la bile et le tractus intestinal, elle est aussi transformée en pigments biliaires qui sont, dans un second temps, réabsorbés ou éliminés dans les selles. La bilirubine conjuguée est normalement absente du sérum. La bilirubine totale est constituée de la bilirubine libre et conjuguée (Beaudeau et Durand, 2011).

I.3.6.2 Les reins

Le rôle le plus connu des reins est l'épuration de l'organisme par formation de l'urine grâce à un système de filtration et d'excrétion. Ils possèdent toutefois bien d'autres fonctions toutes aussi importantes comme la régulation de l'équilibre hydrique, électrolytique et acido-basique (pH), ou encore des fonctions endocrines telles que la synthèse d'érythropoïétine et de vitamine D. Il possède également des fonctions endocriniennes primaires, en tant que le site de synthèse d'hormones et secondaire en étant le site d'action d'hormones synthétisées ou activées ailleurs (Aldostérone, angiotensine II, vasopressine) (Newman *et al.*, 1999).

La coupe frontale d'un rein permet de distinguer, sous une capsule fibreuse lisse, le parenchyme rénal, composé d'une partie corticale externe et d'une partie médullaire interne (Figure19).

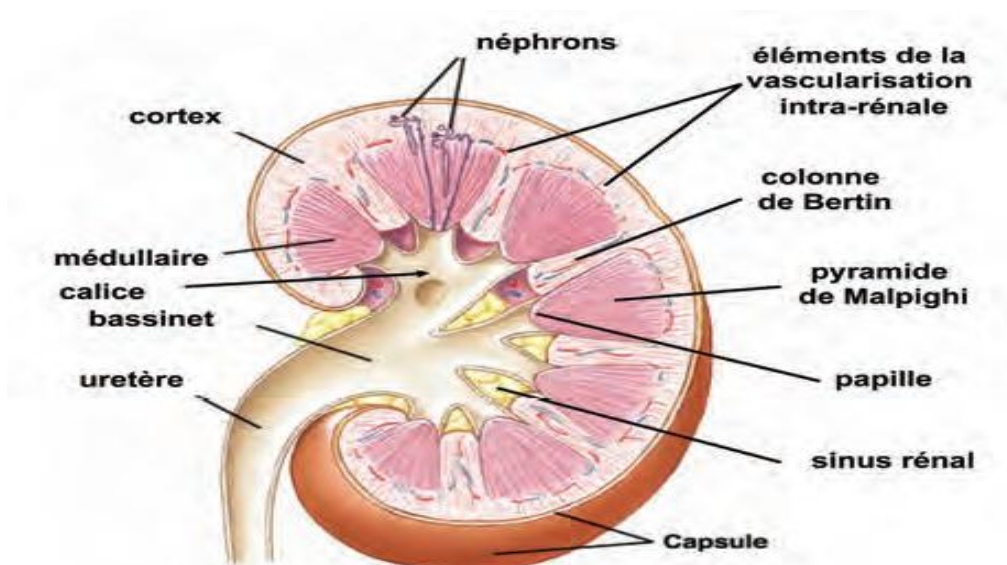


Figure 19 : Coupe du rein (Bernard, 2013)

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein, il se compose d'un glomérule, un tubule proximal, une boucle de Henle, un tubule distal, un tubule collecteur (Figure 20) (Volker, 2003).

Les néphrons permettent de réabsorber les substances nécessaires à l'organisme dans les bonnes proportions tout en excréant les déchets métaboliques et les ions en excès. Ceci produit l'urine, un liquide hautement concentré et spécialisé, dont la formation est obtenue suite à l'entrée en jeu de trois mécanismes : la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire.

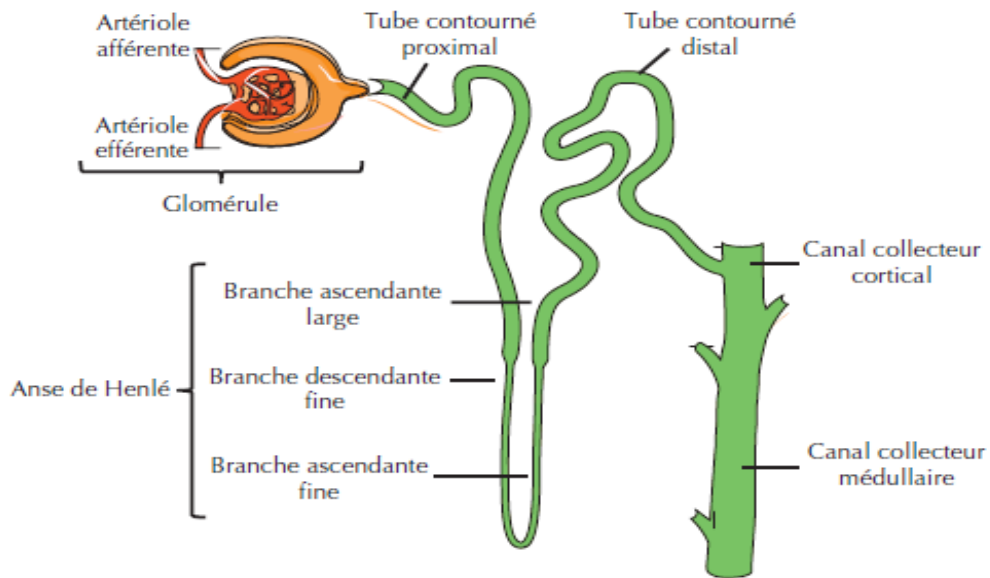


Figure 20: Structure de néphron (Gueutin *et al.*, 2012).

I.3.6.2.1 Néphrotoxicité

Le rein est particulièrement vulnérable à plusieurs substances toxiques qui sont susceptibles de lui causer des dommages à différents sites et de perturber ainsi certaines de ses fonctions (Cronin et Henrich, 2005).

Toutes les zones du néphron sont potentiellement sujettes aux effets néfastes des toxiques de légères altérations biochimiques responsables de dysfonctionnements mineurs de la fonction rénale jusqu'à la mort cellulaire conduisent à l'insuffisance rénale (Frank, 1992).

- **Nécrose des cellules épithéliales**

Dans la nécrose des cellules épithéliales peuvent être atteintes tout au long du système tubulaire, ou avec une prédominance au niveau de la partie distale du tube contourné.

- **Vacuolisation épithéliale**

Les cellules épithéliales tubulaires peuvent apparaître gonflées, comblant plus ou moins complètement la lumière du tube. Leur cytoplasme clarifié contient de nombreuses petites vacuoles, notamment au niveau des tubes proximaux (Richet, 1988).

I.3.6.2. 2 Marqueurs biochimiques de la fonction rénale

La mesure de la fonction rénale est importante car elle a des implications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques. La fonction rénale correspond au débit de filtration glomérulaire (DFG) qui s'exprime en millilitre par minute.

Il existe de nombreux moyens pour évaluer la fonction rénale :

- **Les dosages sanguins** (urémie, créatininémie, ionogramme) sont effectués par prélèvement d'un échantillon sanguin par ponction veineuse au pli du coude.

- **L'urée**

L'urée est la principale forme d'élimination des déchets azotés à partir des protéines et des acides aminés. Elle est synthétisée dans le foie (qui peut augmenter et souvent diminuer la synthèse) lors de la dégradation d'acides aminés. Elle est ensuite secrétée dans le sang pour être excrétée par les reins dans l'urine. La concentration d'urée urinaire est le témoin des apports protidiques et le reflet de la fonction rénale lorsqu'elle est couplée au taux d'urée sanguine. Toutefois, l'urémie peut être influencée par l'apport alimentaire en protéines. C'est pourquoi, le dosage de la créatinine sanguine est privilégié afin d'évaluer la fonction rénale (Kubab *et al.*, 2006).

- **La créatinine**

La créatinine sérique a été longtemps la référence pour évaluer la fonction rénale. Il s'agit d'une petite molécule issue du catabolisme musculaire qui circule librement dans le sérum et qui est librement filtrée par le glomérule (Dussol, 2011). La créatinine peut être dosée dans le plasma (créatininémie) ou dans les urines prélevées sur 24 heures (créatininurie). Les méthodes de dosage au laboratoire peuvent être colorimétriques (méthode de Jaffé) mais sont de plus en plus enzymatiques (Leriverend *et al.*, 2016). **La créatininémie** ne dépend pas de l'alimentation, ni de l'hydratation. Elle est le reflet de la masse musculaire maigre, et est donc plus faible chez l'enfant et la femme. Son dosage est très utilisé dans le suivi des insuffisances rénales et dans la recherche de toxicités rénales médicamenteuses (Leriverend *et al.*, 2016).

- **L'ionogramme sanguin**

Permet d'évaluer les fonctions du tubule rénal. Il mesure le taux dans le sang de certains ions : natrémie (Na^+), kaliémie (K^+), chlorémie (Cl^-), bicarbonatémie (HCO_3^-). En cas

d'insuffisance rénale (IR), la kaliémie est augmentée. Les bicarbonates sont diminués dans les insuffisances rénales chroniques.

- **Les dosages urinaires** sont pratiqués sur un échantillon d'urines des 24 heures, notamment pour la recherche de la protéinurie
- **La protéinurie** : permet d'évaluer l'intégrité du glomérule rénal. Les protéines sont normalement non détectables dans les urines, mais leur recherche peut être effectuée et prescrite par le médecin (Berthélémy, 2015).

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Les graines et les feuilles de *Peganum harmala* sont récoltées au mois de Juillet- Aout, période de maturation, dans la région de Touama (Commune d'Elaach) de Wilaya de Bordj Bou Arreridj, située au Nord-est de l'Algérie qui se caractérise par un climat semi- arride sec. L'identification botanique de l'espèce a été faite sur la base de la description des caractéristiques morphologiques de la plante. (Chopra *et al.*, 1960 ; Maire, 1933 ; Ozanda, 1991 ; Bruneton, 1999) (Figure 21).



Figure 21 : La plante de *Peganum harmala* en période de fluorisation.

Les graines et les feuilles récoltés après maturation sont débarrassées de toutes les impuretés, séchées à l'ombre et à la température ambiante (Figure 22).



Figure 22: Les graines et les feuilles de *Peganum harmala*.

II.1.2. Les souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC) conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée.

- **Les bactéries à Gram⁻**

Salmonella typhimurium ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

- **Les Bactéries à Gram⁺**

Bacillus cereus ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- **Les champignons :** Deux souches sont utilisées : *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*.

II.1.3 Matériel animal

Des souris blanches (*Mus musculus*) des deux sexes mâles et femelles sont utilisées pour cette étude, pesant entre 20 et 40 g provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ils sont hébergés dans des cages en plastique transparent d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm. Les animaux ont disposé d'eau du robinet et de nourriture *ad libitum*, la litière est renouvelée trois fois par semaine. Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie – Université de Sétif pendant une quinzaine de jours avant l'expérimentation.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des extraits

Deux méthodes d'extraction ont été requises pour l'extraction des principes actifs à partir de *Peganum harmala*; macération dans le méthanol (extrait brut EB) pour les feuilles (EBF) et les graines (EBG), et une extraction liquide-liquide par soxhlet pour les alcaloïdes totaux des graines (EAT).

II.2.1.1 Extraits bruts méthanoliques

L'extrait méthanolique a été préparé à partir de 50 g de broyat, qui a été mis à macérer dans 250 ml de méthanol à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 48 heures. Ensuite le mélange est filtré sur la gaze et une deuxième fois sur papier Whatman (n°3). Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 30 °C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation (Figure 23).

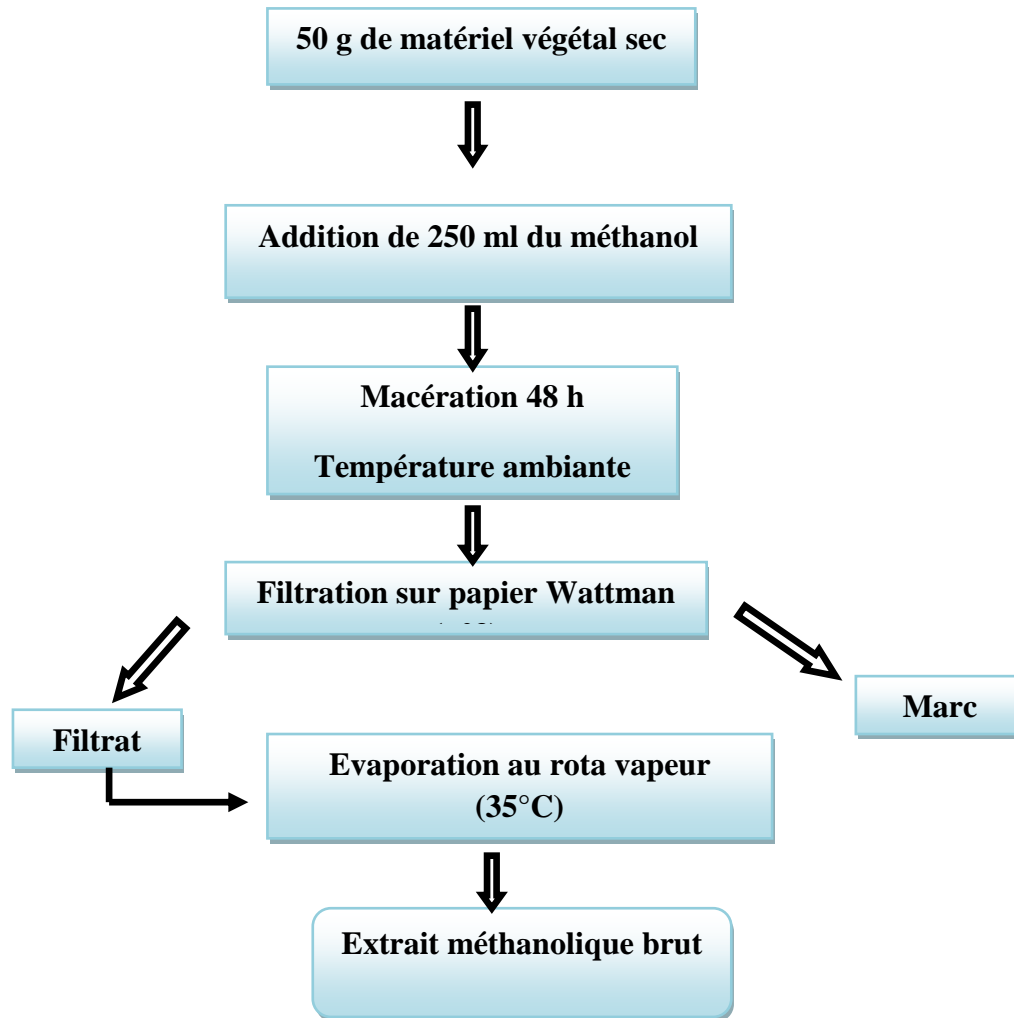


Figure 23: Préparation des extraits bruts (EBF, EBG) par macération

II.2.1.2 Extraction des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala*

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir des graines du *Peganum harmala* est obtenue par une extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin selon Bruneton, (1999).

100g des graines de la plante sont finement broyées. La poudre obtenue est dégraissée par 250 ml d'éther de pétrole par macération et sous agitation à température ambiante pendant 3 à 4 heures.

Après filtration, le marc (graines moulues débarrassées de la matière grasse) est alcalinisé par une solution 40 ml d'ammoniaque (0.5N) pendant au moins 8 heures à température ambiante permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique. Les alcaloïdes totaux sont extraits par l'extracteur de Soxhlet en utilisant un solvant non miscible avec l'eau.

La poudre des graines alcalisée est placée dans le Soxhlet fixée sur un ballon contenant 500 ml de dichlorométhane et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté. Au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des graines.

A l'issue de cette opération, l'extrait brut est lavé trois fois successives par une solution de 150 ml d'acide sulfurique (0.5N) pour chaque volume, les trois fractions sont reprises dans une ampoule à décantation, alcalinisées jusqu'à pH 9 par ajout d'ammoniaque (0.5N). Nous épuisons ensuite trois fois la solution par 150 ml d'éther d'éthylique, en agitant doucement l'ampoule à décantation.

Nous récupérons les trois fractions organiques dans un Erlenmeyer, qui seront déshydratées par filtration sur papier filtre contenant du sulfate de sodium anhydre.

L'extrait recueilli dans un bêcher taré est évaporé à sec sur plaque chauffante. Après refroidissement, nous pesons à nouveau le bêcher. Le résidu sec représente les alcaloïdes totaux récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 24)

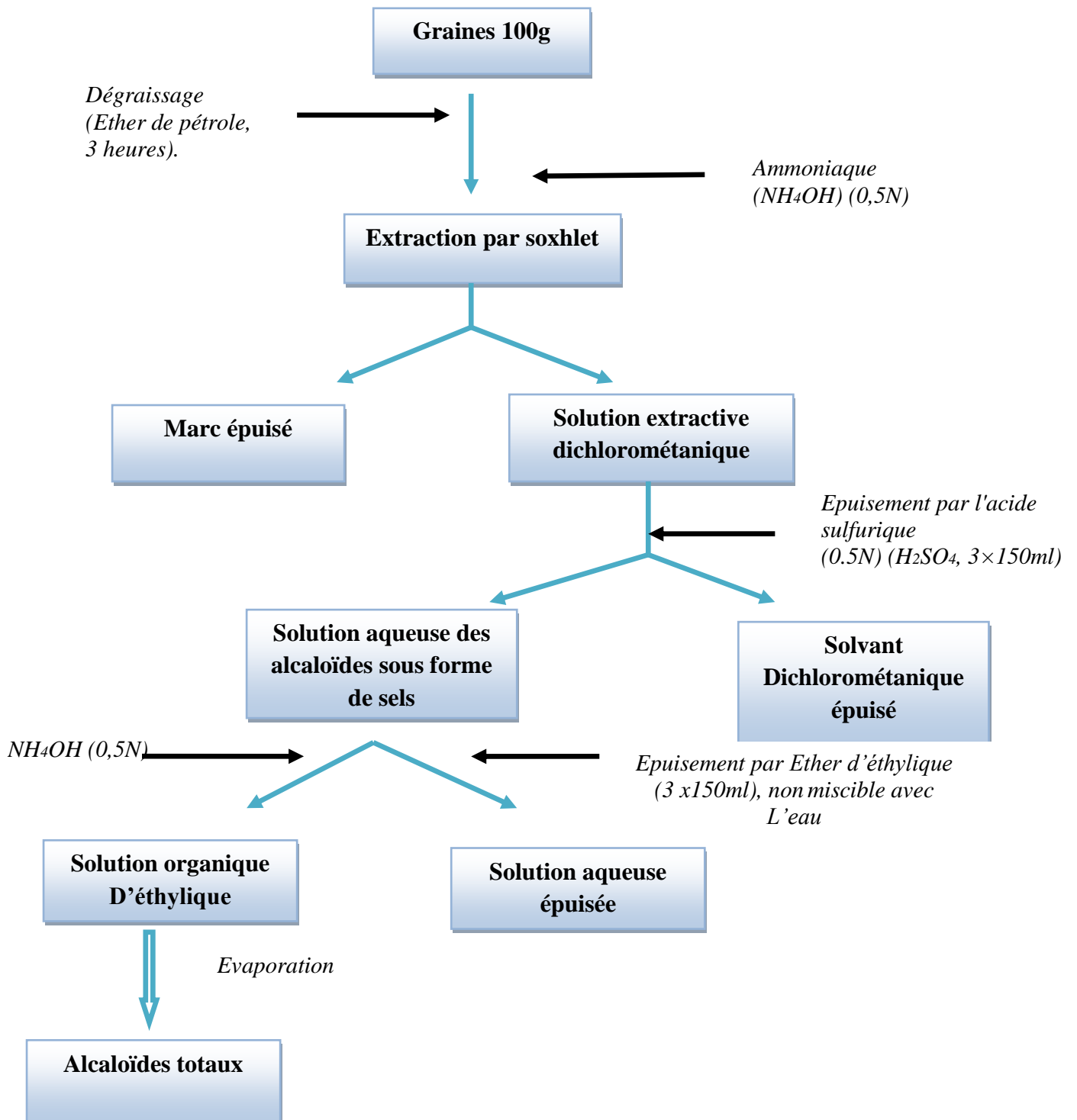


Figure 24: Extraction des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* (Bruneton, 1999).

II.2.2 Analyse qualitative des extraits bruts et des alcaloïdes totaux par chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode de séparation physico-chimique faisant intervenir une phase stationnaire ou adsorbant et une phase mobile ou éluant. La CCM n'est pas suffisante pour identifier un produit mais elle apporte des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures, par exemple: fluorescence, coloration (Randerath, 1971).

Nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince en utilisant des plaques de Silica gel 60 F254 avec des dimensions 20 X 20 cm de marque MACHEREY-NAGEL (Germany). La phase mobile, constituée d'un mélange de méthanol/Dichlorométhane : 80/20/ (V/V) pour les extraits bruts (EBG, EBF) et d'un mélange de « méthanol/chloroforme/ammoniaque : 79/20/1 (V/V/V) » (Mahdeb *et al.*, 2013) pour les extraits bruts et alcaloïdique.

Après dissolution des extraits (EBF) et (EBG) et (EAT) dans du méthanol, nous déposons 10 µl de chaque solution à l'aide d'une micropipette sur une plaque qui était activée dans l'étuve à 100°C pendant 5 min; à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base, on sèche chaque dépôt à l'aide d'un sèche-cheveux. La plaque est ensuite mise dans la chambre de migration contenant la phase mobile. Quand le front du solvant atteint 1 cm du bord supérieur, le chromatogramme est retiré, séché, observé à l'extinction de la fluorescence à 366 nm puis pulvérisé avec le réactif de Bouchardât jusqu'à l'apparition de spots colorés.

II.2.3 Screening phytochimique

Le screening phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Il met seulement en évidence la présence de telle ou telle famille chimique pouvant être contenue dans un échantillon. Les tanins, les stérols et triterpènes et les saponosides sont caractérisés par les méthodes décrites par (Trease et Evans, 1987), les alcaloïdes (Paris *et al.*, 1969), les anthocyanes (Paris *et al.*, 1969 ; Debray *et al.*, 1971) et les coumarines (Rizk, 1982).

II.2.4 Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante

II.2.4.1 Effet scavenger du radical DPPH

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

(Figure 25). La couleur violette foncée, mesurable à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire de l'extrait (Parejo *et al*, 2002).

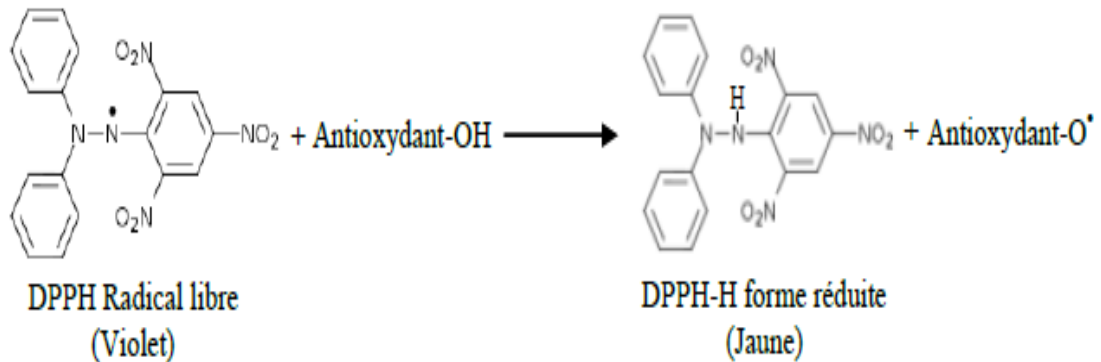
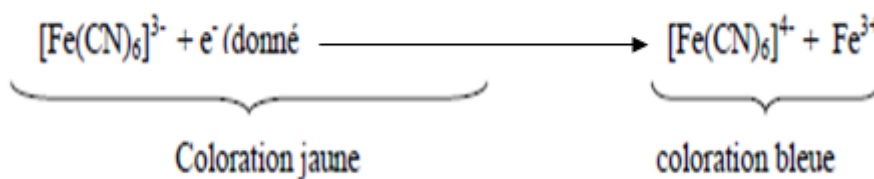


Figure 25: La réduction du radical DPPH (Popovici *et al.*, 2009).

Le test de DPPH• est réalisé en suivant la méthode décrite par (Mansouri *et al* ,2005). L'IC₅₀ ou la concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH•. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées).

II.2.4.2 Test de réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺) .



En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

II.2.5 Etude de l'activité antibactérienne

Le test antibactérien a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait vis-à-vis de différentes souches bactériennes. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient d'ouvrir d'autres pistes à la recherche. Les extraits ont été solubilisés dans du DMSO. Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota *et al.*, 2008).

Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien *in vitro* des différents extraits, nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

➤ Préparation des dilutions des extraits

Les extraits ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.

➤ Préparation de l'inoculum

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans bouillon nutritif pour avoir une turbidité voisine à 0,5McFarland, puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C.

➤ Préparation des disques

Des disques de papier Wattman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 121°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait à tester, des disques imprégnés de DMSO sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

➤ Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri

avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits (10 µl) sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota *et al.*, 2008).

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

➤ **Choix des antibiotiques utilisés**

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012), le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel contre des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique. Dans notre travail les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion sur disque, sont Amoxicilline/acide clavulanique (AM.C) (20/10µg), Céfazoline (CZ) (30µg), Céfotaxime (30µg) (CAZ), Triméthoprim sulfaméthoxazole (SXT) (30µg). Ils ont été sélectionnés selon leur disponibilité.

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions au tour des disques.

➤ **Détermination des CMI et CMB**

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer la plus petite concentration d'antibiotique donnant une inhibition de la croissance après un temps de contact avec l'antibiotique de 18 à 24 heures (Michel Briand, 1986). Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 200 à 0.78 mg/ml en effet de chaque dilution on prélève 10 µl et on la met sur les disques qui sont déjà dans les boîtes de pétri. Après détermination de la CMI, pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour de chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01% de bactéries survivantes après un temps d'exposition à l'antibiotique de 12 à 18 heures correspond à la CMB (Michel Briand, 1986).

II.2.6 Test de l'activité antifongique des extraits

II.2.6.1 Test d'inhibition de la croissance

La méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée pour tester la sensibilité de la souche fongique vis-à-vis des différents extraits. Des boîtes de pétri stériles, contenant milieu PDA (200 g de pomme de terre, 20 g de saccharose, 15 g d'agar-agar, 1000 ml d'eau distillée), supplémentés de différentes concentrations des extraits (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg/ml) ont été ensemencés au centre par un disque fongique de 6 mm de diamètre (obtenu d'une préculture de 7 jours d'incubation sur milieu solide PDA). Le témoin est préparé sans extrait. Les boîtes de pétri sont placées dans une étuve à la température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pour une durée d'incubation de 4 jours. Pour chaque extrait, le pourcentage d'inhibition de croissance I(%) est exprimé par la réduction du diamètre de la colonie fongique par rapport au témoin (Fandohan *et al.*, 2004) selon la formule suivante:

$$I (\%) = [1 - (D \text{ test} / D \text{ témoin})] \times 100$$

Dont : **D test** : diamètre de la colonie dans le test en mm

D témoin : témoin diamètre de colonie témoin en mm

II.2.6.2 Test de mesure de la croissance radiale

L'effet des extraits sur la croissance fongique a été évalué aussi par la détermination de la croissance radiale selon la méthode décrite par (Abdel Moneim *et al.*, 2016). Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour préparer l'inoculum fongique et pour le test antifongique. L'étude de l'activité antifongique des extraits de *Peganum harmala* a été effectuée dans des boîtes de pétri stériles, contenant milieu PDA, supplémentés par différentes concentrations des extraits (Les extraits ont été pesés et dilués avec le DMSO (Diméthylsulfoxyde) et ajoutés au milieu de culture PDA) puis ont été ensemencés par un disque fongique de 5 mm de diamètre (obtenu d'une préculture de 7 jours d'incubation sur milieu solide PDA). Les boîtes de pétri sont placées dans une étuve à la température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pour une durée d'incubation de 8 jours pour la détermination de l'effet des extraits de *Peganum harmala* sur la croissance radiale.

La croissance radiale a été mesurée tous les deux jours. Tous les traitements ont été faits en triplicata. Le diamètre de la croissance de disque a été mesuré toutes les 48 heures en prenant la moyenne de deux dimensions croisées pour chaque disque dans la boîte de Pétri.

II.2.7 Etude de la toxicité aigüe chez les souris *Mus musculus*

Les essais de la toxicité aigüe permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court (de 1 à 14 jours) après l'administration d'une substance, soit à dose forte, soit à doses répétées sur une période maximale de 24 heures.

* Les principaux effets recherchés sont:

- Faible consommation de nourriture et / ou d'eau.
- Changements du poids corporels.
- Symptômes cliniques (changements observés à l'œil nu). -Décès

II.2.7.1 Détermination de la DL₅₀ chez les souris

Les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* L à tester sont solubilisés dans quelque goutte du méthanol et dilués dans de l'eau physiologique et sont administrés à différentes doses, par voie intrapéritonéal.

Les animaux utilisés sont des souris *Mus musculus* de deux sexes .Après une période d'habituation, les souris sont pesés, identifiées par un marquage sur une partie du corps de l'animal, avec une solution aqueuse d'acide picrique et repartis en 7 groupes de dix animaux chacun, dont un, est un groupe témoins. Les animaux sont mis a un jeun pendant 24 heures avant l'essai. Ils sont pesés au moment de l'essai.

Les 6 lots ont reçu les doses suivantes : 85, 180, 275, 370, 465,560 mg/ kg du poids des souris. Le groupe témoin a reçu de l'eau physiologique avec quelque goutte de méthanol. Après administration des alcaloïdes totaux des graines, les animaux sont observés individuellement chaque heure pendant le premier jour et chaque jour pendant 14 jours. Le comportement et les symptômes cliniques des animaux sont notés pendant toute la durée de l'expérience. La DL₅₀ et son intervalle de confiance sont calculés par la méthode graphique de (Lichfield et Wilcoxon, 1949) et la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (Benbott *et al.* , 2013) .

II.2.7.2 La toxicité aigüe chez les souris (Dose forte non létale)

Nous avons utilisés des souris blanches (entre 20 et 30 g pour les femelles, entre 25et 40 g pour les mâles). Elles sont identifiées par marquage par un numéro sur la queue (pour le groupe témoins) et par une marque avec une solution aqueuse d'acide picrique (pour les deux groupes traités), et sont réparties en 3 groupes expérimentaux renfermant chacun 10 animaux :

- Un groupe d'animaux témoins.
- Deux groupes d'animaux traités.
 - Toxicité aigüe de 1^{ier} jour : Le groupe témoin et un groupe traité (lot 1).
 - Toxicité aigüe de 5^{ème} jour qui représente le seuil maximal de la toxicité aigüe du foie (Szymanowicz et Danel, 2005): Le groupe témoin (qui est le même) et un groupe traité (lot 2). Les animaux sont privés de nourriture 24 heures avant l'essai. Ils sont pesés au moment de l'application

Les souris des deux groupes traités ont reçu par voie intrapéritonéale une dose unique non létale de (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀), a pour but de déterminer les organes cibles (Antov *et al.*, 1991), des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* solubilisés en quelques gouttes du méthanol et dilués dans de l'eau physiologique. Le groupe témoin a reçu par voie intrapéritonéal de l'eau physiologie avec quelques gouttes du méthanol. Après le traitement, les animaux sont observés pour noter leurs comportements et la carte clinique.

II.2.7.3 Evaluation de la toxicité subaigüe chez les souris

Pour chaque sexe les souris sont réparties en deux groupes de 15 animaux chacun, le groupe traité a reçus par voie intrapéritonéale la dose de (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) chaque jour pendant 28 jours. Les souris sont pesées chaque semaine. A la fin de cette période les souris sont sacrifiées et les organes sont observés macroscopiquement *in situ* (reins, rate, foie, poumon, cœur, cerveau) prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés. Les pièces des reins, foie et cerveau sont conservés au formol à 10% pour des études anatomopathologiques.

II.2.7.4 Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques

➤ Prélèvement sanguin

Le prélèvement du sang est effectué par ponction cardiaque avant le sacrifice des animaux et le sang est recueilli dans des tubes héparines (pour les analyses biochimiques) et dans des tubes EDTA (pour les analyses hématologiques), pour chaque prélèvement.

Les tubes héparines sont centrifugés à 3000 trs/min pendant 5min, et dans le sérum obtenu, sont dosés les paramètres biochimiques.

➤ **Dosage de quelques paramètres hématologiques et biochimique**

Les paramètres hématologiques sont (RBC, WBC, PLT, HGB, HCT, MCV, MPV, MCH, MCHC), les paramètres sériques sont : Urée et Créatinine pour évaluer l'état du rein et les Transaminases (TGO, TGP) et la PAL (phosphatase alcaline) pour évaluer l'état du foie.

II.2.7.5 Technique histologique

➤ **Prélèvement des organes et la réalisation des coupes histologiques**

Après la dissection, le foie, les reins, le cœur, la rate, les poumons et le cerveau sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Na Cl) à 0.9 % et pesés.

Après avoir fixés les reins, foie et le cerveau dans le formol à 10 %, sont déposés dans des cassettes en plastique, puis sont déshydratés (par immersion dans des bains successifs d'alcools, l'alcool est éliminé par des solvants (xylène) avant d'être coulé dans des moules contenant de la paraffine fondue par chauffage (paraffine liquide). Après refroidissement le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé à l'aide d'un microtome permettant de réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur. Les coupes obtenues sont étalées et collées sur des lames, puis séchées dans une étuve pendant une nuit. Elles sont ensuite colorées par une solution d'hématoxyline-éosine. Après la coloration, le montage se fait à l'aide de l'eukitt placé entre lame et lamelle.

II.2.8 Analyses statistiques

Les différences statistiques significatives entre les moyennes sont calculées en utilisant One-Way ANOVA suivi par Tukey's test pour la comparaison multiple avec le groupe control pour la toxicité aiguë et le test de « t » Student pour la toxicité subaiguë, les données sont exprimés en moyenne ± SEM et en moyenne ± SD (activité antioxydante, antibactérienne et antifongique).

III. Résultats

III Résultats

III.1 Rendements des extractions

- **La macération**

La première quantification à faire est celle de déterminer le rendement des extraits bruts des graines et des feuilles de *Peganum harmala* (EBF ; EBG) obtenus par macération. Ce rendement est calculé à partir du poids d'extrait par rapport au poids sec de la masse végétale utilisée (Tableau 2)

Tableau : 2 Rendement et couleurs des extraits

Extraits	Couleur	Rendement
EBF	Vert foncé	13.44%
EBG	marron foncé	10.52%
EAT	rouge brique	2.11%

Les résultats de rendement des extraits bruts des feuilles et des graines de *Peganum harmala* en utilisant la macération a permis d'obtenir des extraits bruts de couleur différentes (vert foncé et marron foncé), avec un rendement de 13.43% et 10.52% successivement.

- **Extraction des alcaloïdes totaux des graines**

L'extraction liquide- liquide des alcaloïdes totaux à partir des graines de *Peganum harmala* , a permis d'obtenir un extrait de couleur rouge brique avec un rendement 2.11 % .

III.2 Analyse qualitative

III. 2.1 Chromatographie sur couche mince CCM des extraits

La chromatographie sur couche mince des extraits bruts des feuilles et des graines de *Peganum harmala* nous a permis de séparer plusieurs substances qui sont apparues sous formes de spots colorées de taille différentes après révélation par le réactif de Dragendorff et sous L'UV et en absence de standards , les spots apparus n'ont pu être identifiés (Figure 26).

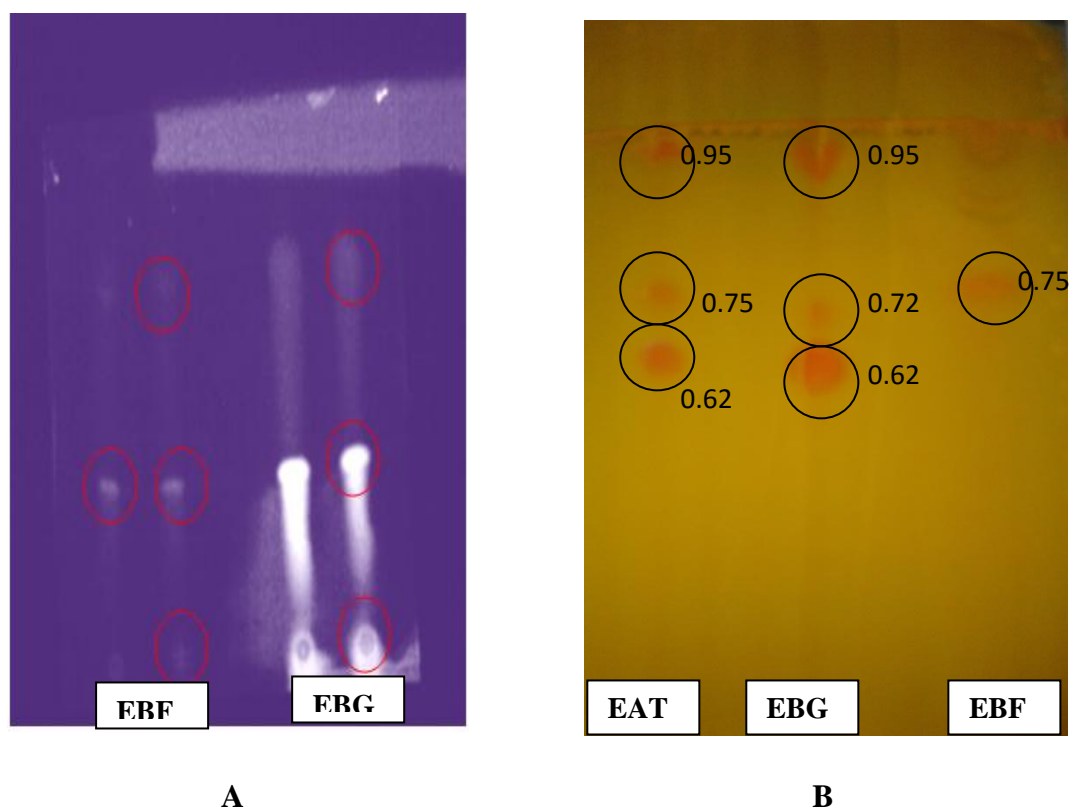


Figure 26 : A : Chromatographie sur couche mince des extraits bruts des graines et des feuilles de *Peganum harmala*.

Phase mobile : méthanol/Dichlorométhane : 80/20/ (V/V). Sous UV 360 nm.

B : Séparation par CCM des extraits bruts et alcaloïdique de *Peganum harmala*

Phase mobile : méthanol/chloroforme/ammoniaque: 79/20/1 (V/V/V). *Révélateur :* réactif de Dragendorff

III. 2.2 Chromatographie sur couche mince CCM des alcaloïdes totaux

La chromatographie sur couche mince de l'extrait des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* a permis de séparer quatre substances qui sont apparues sous forme de spots colorés après révélation par le réactif de Bouchardât et sous l'UV 360 nm (Figure 27).

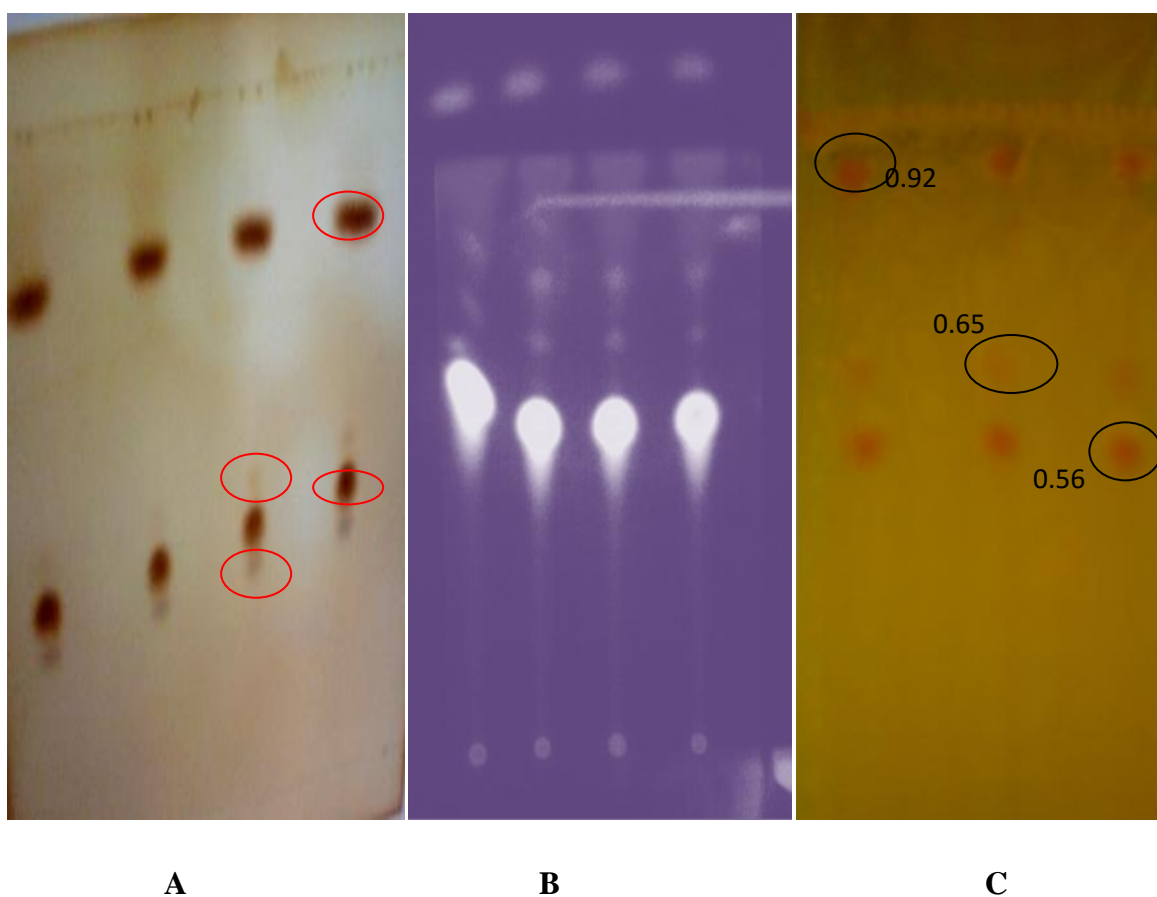


Figure 27: Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* L. Phase mobile : méthanol/chloroforme/ammoniaque: 79/20/1 (V/V/V). **A-** Révélateur : réactif de Bouchardât **B-** Révélateur : Sous UV 360 nm **C-** Révélateur : réactif de Dragendorff

III.3 Screening phytochimique

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur les extraits obtenus à partir de la poudre de chaque échantillon végétal génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits. Le résultat de ce criblage phytochimique est résumé dans le tableau 3. Il révèle la présence (+) ou l'absence (-) d'un groupe de métabolites secondaires.

Tableau 3 : Screening phytochimique des graines et des feuilles de *Peganum harmala*.

Métabolites secondaires	feuilles	graines
Tanins	+++	+++
Alcaloïdes	+	+++
Anthocyanines	-	+
Coumarines	-	+
Stérols et triterpènes	+	+
Saponosides	++	-

III.4 Activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala*

Les résultats d'une méthode ne donnent que des suggestions réduites sur les propriétés antioxydantes des extraits. La combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents serait idéale pour une évaluation efficace et complète des potentiels antioxydants chez une ou plusieurs espèces. Deux méthodes sont employées : piégeage du radical libre DPPH et le test Feric Reducing Antioxydant Power assay (FRAP) qui mesure le pouvoir de réduction des ions de fer.

III.4.1 Effet piègeur envers le radical DPPH

L'acide ascorbique, un antioxydant de référence, a montré un pourcentage d'inhibition très puissant du radical libre DPPH à des concentrations plus faibles (Figure 28).

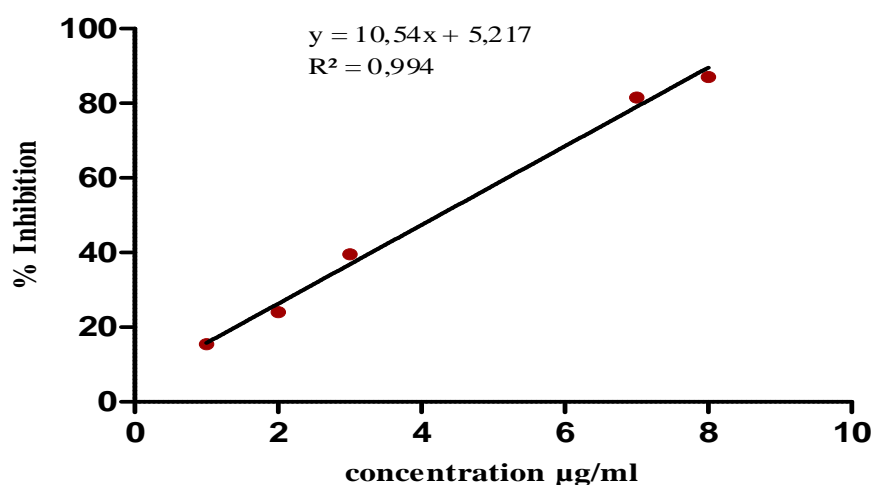


Figure 28 : L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Le pourcentage d'inhibition de radical DPPH a été simultanément augmenté avec l'augmentation de la concentration des EBF, EAT de 25 à 250 µg/ml. Le pourcentage d'inhibition a été de 31.55 et 29.33 à la petite concentration de 25µg /ml et de 71.48 à 81.77 à la plus grande concertation de 250 µg/ml pour EBF, EAT respectivement (Figure 29,30). L'EBG a un pourcentage d'inhibition de 27,7% à 2.5µg/ml et 89.21 à 100 µg / ml (Figure 31).

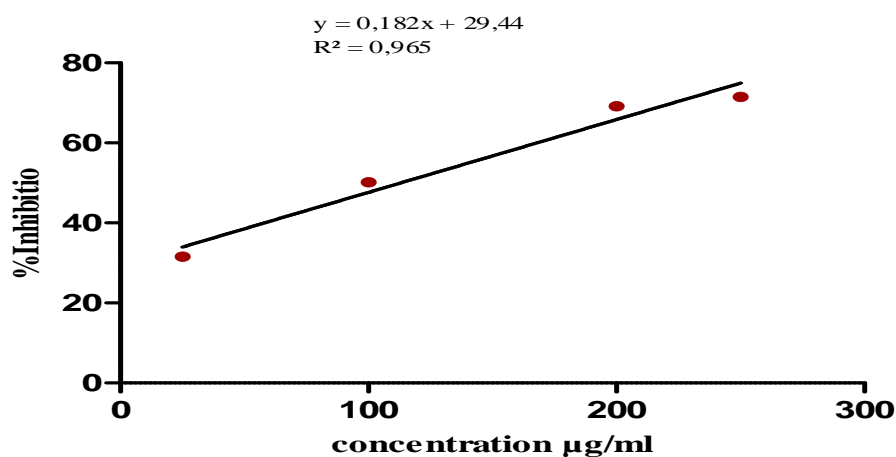


Figure 29 : L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut des feuilles de *Peganum harmala*.

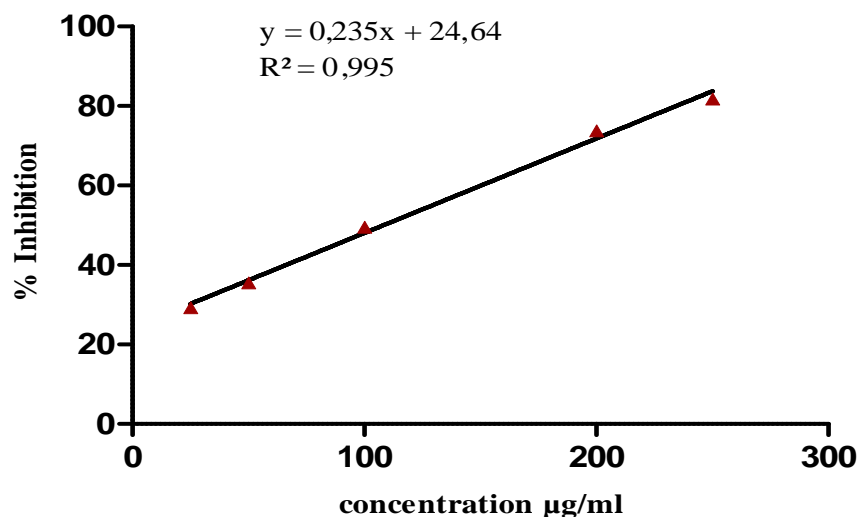


Figure 30 : L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des alcaloïdes du *Peganum harmala*.

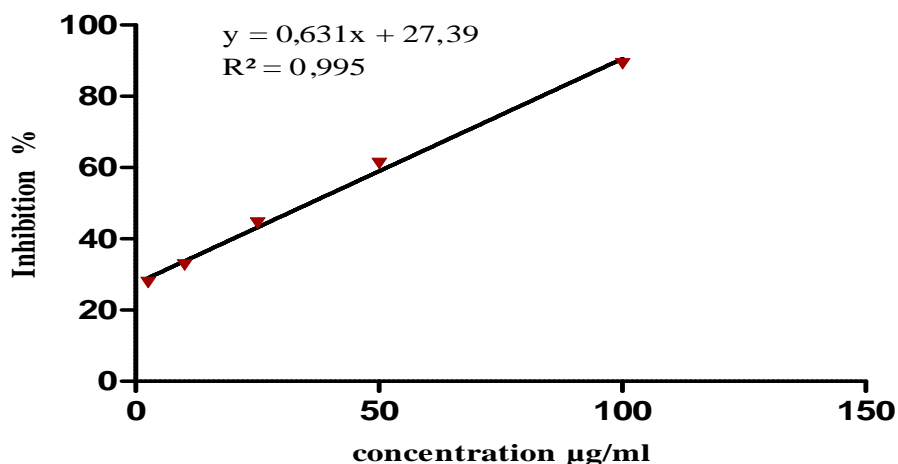


Figure 31: L'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut des graines de *Peganum harmala*.

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus (EBF, EBG, EAT) de la plante *Peganum harmala* a été faite en comparaison avec un antioxydant de référence qui est l'acide ascorbique 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.

L' IC_{50} obtenu pour la totalité des extraits, sont représentés dans la figure ci-dessous (Figure 32) dont les valeurs sont exprimées en µg / ml.

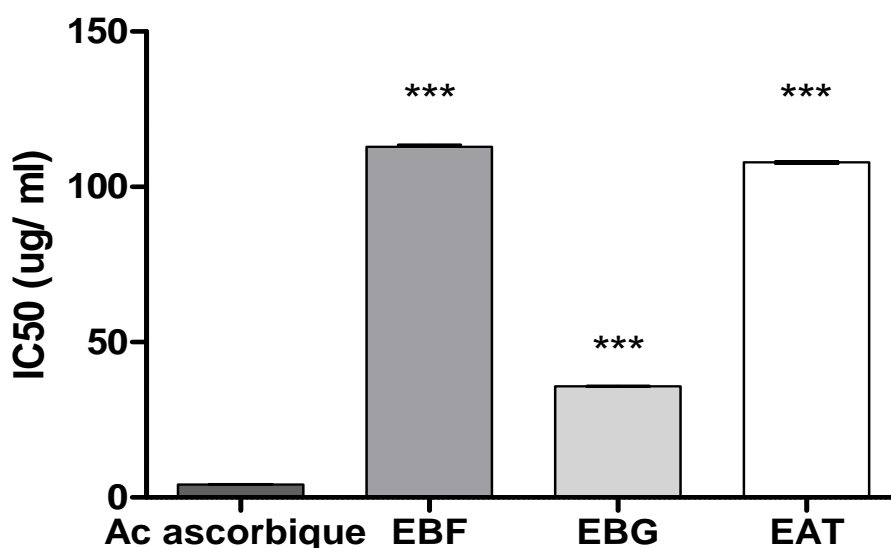


Figure 32: Valeurs d' IC_{50} des différents extraits de *Peganum harmala* et d'acide ascorbique.

Chaque valeur d'IC₅₀ représente la moyenne ± SD (p < 0.05). * Significativement différent pour p < 0.05. L'activité antioxydante de l'acide ascorbique est très différente et élevée par rapport aux extraits.

III.4.2 Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺. La puissance de réduction est l'un des mécanismes. Nous avons opté pour tester les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait et en comparaison avec un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique (Figure 33, 34,35).

L'EBG est généralement le plus actif avec une densité optique maximale de 0,667 nm à la concentration 800µ/ml (Figure 32), suivis de l'EAT et EBF avec des absorbances respectives : 0,5820 nm et 0,304 nm (Figure 33,34).

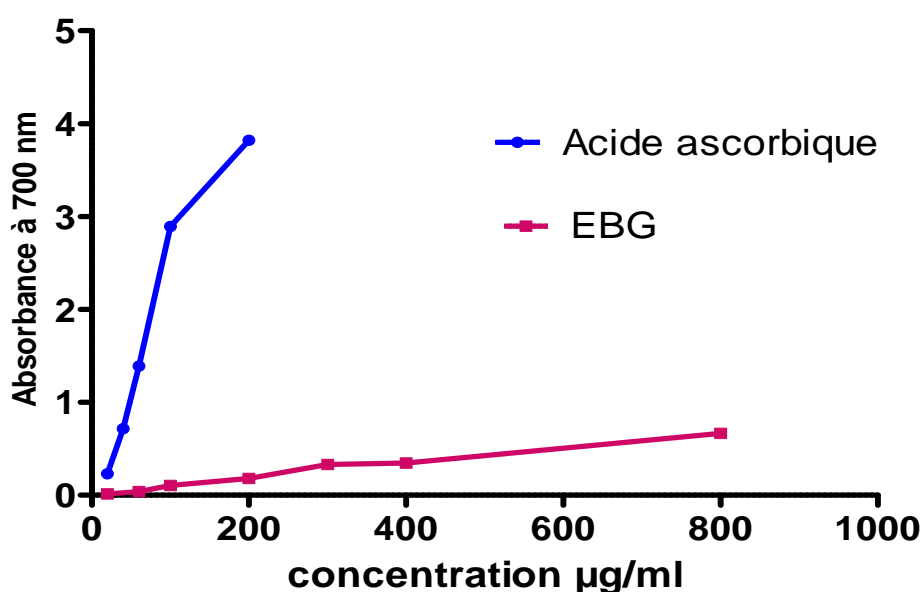


Figure 33: Pouvoir réducteur d'EBG et acide ascorbique.

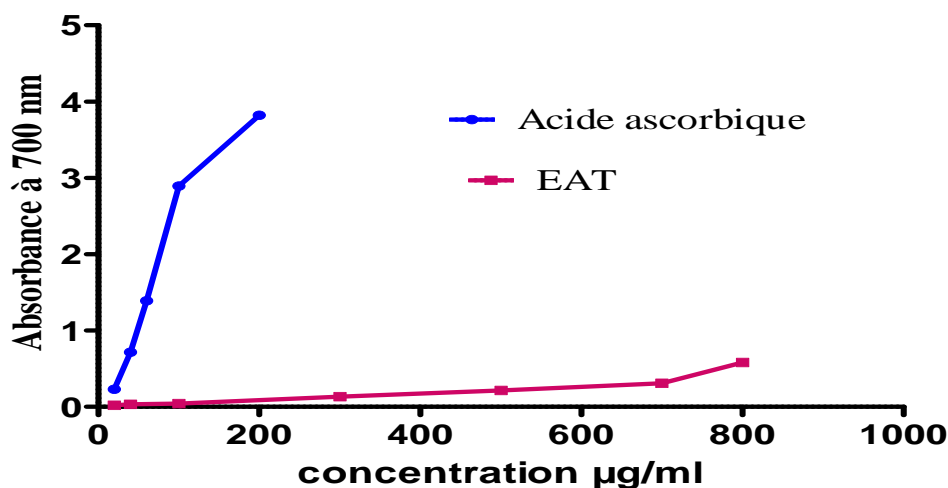


Figure 34 : Pouvoir réducteur d'EAT et acide ascorbique.

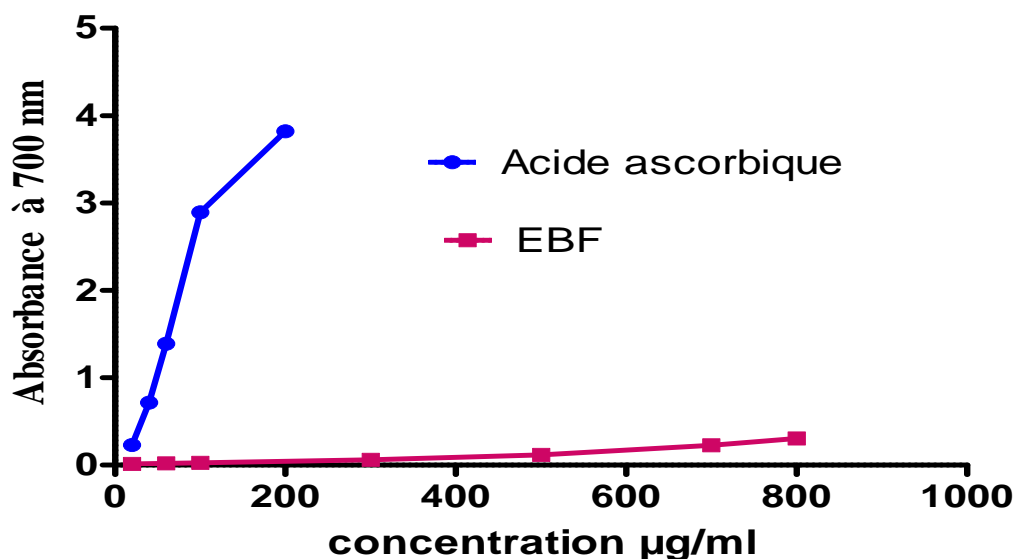


Figure 35: Pouvoir réducteur d'EBF et acide ascorbique.

Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celles de l'antioxydant de référence (acide ascorbique).

III. 5 Activité antibactérienne des extraits de *Peganum harmala*

III.5.1 Test de toxicité de DMSO

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces

composés. Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches bactériennes.

III.5.2 Sensibilité des bactéries aux extraits bruts et alcaloïdique de *Peganum harmala*

La méthode de diffusion a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits bruts et contre quatre souches bactériennes testées.

Les résultats sont exprimés par des diamètres de zones d'inhibition exercées par les différentes concentrations des extraits et les antibiotiques standards utilisés Amoxicilline/acide clavulanique (AM.C), Céfazoline(CZ), Céfotaxime (CAZ) et Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT).

En se basant sur les résultats obtenus, on observe que les zones d'inhibitions sont augmentées avec une élévation des concentrations des extraits. En plus tous nos extraits sont efficaces contre toutes les souches bactériennes examinées (Gram -, Gram +).

L'EBF a montré des zones d'inhibitions variant de 24 mm - 26.5 mm pour 200 mg/ml et de 6.5mm à 07mm pour 1.562 mg/ml (Tableau 4).

Tableau 4 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EBF (mg/ml). Moyenne \pm SD

Bactéries testées	Concentration (mg mL-1)								
	0.78	1.562	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
<i>Bacillus cereus</i>	-	6.5 \pm 01	6.5 \pm 01	6.5 \pm 01	9,5 \pm 0.5	10,5 \pm 1.5	13 \pm 00	15,5 \pm 0.5	26,5 \pm 1.5
<i>E .coli</i>	-	-	6.5 \pm 01	6,5 \pm 0.5	7,5 \pm 0.5	08,5 \pm 0.5	11,5 \pm 0.5	16 \pm 01	24 \pm 01
<i>S.aureus</i>	-	7 \pm 0.5	7 \pm 0.5	7.5 \pm 0.5	9 \pm 01	11 \pm 01	13,2 \pm 0.7	16,3 \pm 1.5	25,5 \pm 0.5
<i>S. typhimurium</i>	-	-	7 \pm 01	7 \pm 0.5	7,5 \pm 0.5	9,5 \pm 0.5	12,5 \pm 0.5	15 \pm 01	24,5 \pm 0.5

En plus, on a marqué pour l'EAT des zones inhibitions variant de 24 mm à 27.5mm pour 200 mg/ml et de 6.5 pour la plus faible concertation de 0.78 mg/ml (Tableau 5). Il n'existe pas une différence significative entre EBF et EAT contre les souches testées.

Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EAT (mg/ml).Moyenne \pm SD.

Bactéries testées	Concentration (mg mL-1)								
	0.78	1.562	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
<i>Bacillus cereus</i>	6.5 \pm 0.5	6.5 \pm 0.5	7 \pm 0.5	8 \pm 0.5	9,5 \pm 0.5	10 \pm 01	13,5 \pm 1.5	17 \pm 01	27,5 \pm 1.5
<i>E .coli</i>	6.5 \pm 01	6.5 \pm 01	6.5 \pm 0.5	6,5 \pm 0.5	8,5 \pm 0.5	8,5 \pm 1.5	12,5 \pm 0.5	17 \pm 01	24 \pm 02
<i>S.aureus</i>	6.5 \pm 01	7 \pm 01	7 \pm 01	8 \pm 01	9 \pm 01	11.5 \pm 0.5	14.5 \pm 1.5	18 \pm 01	26 \pm 01
<i>S. typhimurium</i>	6.5 \pm 01	6.5 \pm 01	6.5 \pm 01	7 \pm 0.5	9 \pm 01	8,5 \pm 1.5	12 \pm 01	14.5 \pm 0.5	25 \pm 01

L'EBG a montré une forte zone d'inhibition pour *Bacillus cereus* (33mm) (Tableau 6). Le profil d'activité antimicrobienne d'EBG contre les souches testées a indiqué que *Bacillus cereus* est la bactérie la plus sensible de toutes les souches pour la plus grande concentration de 200 mg/ml.

Les autres souches bactériennes étudiées (*E. coli*, *S.aureus*, *S. typhimurium*) ont montré des zones d'inhibitions variant de 20 mm à 22 mm. On note que l'efficacité d'EBG était meilleure avec *Bacillus* comparés avec les autres souches examinées.

Tableau 6: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations d'EBG (mg/ml) .Moyenne ± SD

Bactéries testées	Concentration (mg mL-1)								
	0.78	1.562	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
<i>Bacillus cereus</i>	-	6.5 ±0.5	6.5±0,70	8.5±0,7	13±00	15.5±0,7	17.5±0,7	19.5±0,7	33±5,6
<i>E. coli</i>	-	7±0.7	7± 0.7	7± 0.35	9.5±0,70	13.5±3,5	18±4,2	19.5±0,7	21±1,4
<i>S.aureus</i>	-	6.5 ±0.5	7±1,4	8 ± 1,4	11.5±0,7	12.5±0,7	15±0,7	16±1,41	20.5±0,7
<i>S. typhimurium</i>	-	6.5±00	6.5± 00	8.5± 00	9±00	9±1,4	18±1,4	19.5±0,7	22.5±3,5

L'activité des extraits (EBF, EBG, EAT) était plus haute en comparaison avec de AM.C et CAZ pour les souches bactériennes étudiées. En plus dans le cas *du S. aureus et Bacillus cereus* l'activité des extraits (25,5±0.5, 20.5±0.5, 26±01 respectivement) et (26,5±1.5, 33±5.6, 27.5±1.5 respectivement) était supérieure à celui du Céfazoline (16 mm, 21mm) et relativement la même pour *E. coli* (24.5 mm) et *S. typhimurium* (21mm) (Tableau7). Tous les extraits ont montré des zones d'inhibitions plus élevés contre les souches (*S. aureus, Bacillus cereus* et *S. typhimurium* en comparaison avec l'antibiotique SXT .Au contraire, tous les extraits ont montré des zones d'inhibition relativement inférieur en comparaison avec SXT (25.6 mm) contre la souche *E. coli*.

Tableau : 7 Diamètre des zones d'inhibition (en mm) de différentes concentrations des antibiotiques standards.

Bactéries	Antibiotiques			
	Céfazoline (CZ)	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT)	Céftazidime (CAZ)	Amoxicilline/acide clavulanique AM .C
<i>Bacillus cereus</i>	21	15	11	13
<i>E. coli</i>	24.5	25.6	12	13
<i>S. aureus</i>	16	11	11	18
<i>S.typhimurium</i>	21	20	17	16

Les valeurs de CMI et CMB obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 8)

Tableau 8 : CMI et CMB (mg/ml) de différents extraits

Bactéries testées	Concentration (mg mL ⁻¹)								
	EBF			EBG			EAT		
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB /CMI
<i>Bacillus cereus</i>	1.56	3.125	2	1.56	6.25	4	0.78	6.25	8
<i>E .coli</i>	3.125	6.25	2	1.56	3.125	2	0.78	3.125	4
<i>S.aureus</i>	1.56	6.25	4	1.56	3.125	2	0.78	3.125	4
<i>S. typhimuium</i>	3.125	12.5	4	1.56	12.5	8	0.78	3.125	4

III.6 Activité antifongique des extraits de *Peganum harmala*

III.6.1 Effet des extraits sur la croissance des champignons

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne d'*Aspergillus niger* variant avec l'augmentation de la concentration d'EBF, EBG et EAT (Tableau 9). L'EBF a montré un pourcentage d'inhibition plus élevé pour la plus grande concentration de 200 mg/ml en comparaison avec l'EBG et EAT. Ce résultat montre l'efficacité de l'EBF pour *Aspergillus niger*.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* variant avec l'augmentation de la concentration surtout de l'EAT .Ce dernier a marqué pour la plus grande concertation de 200 mg/ml un pourcentage d'inhibition de 64,86 %, puis de 39,18 à la plus petite concentration de 6.25 mg/ml. Tandis que les EBF et EBG ont montré pour la plus grande concentration de 200 mg/ml des pourcentages d'inhibition respectifs de 57.43% et 58,51 %, puis de 4,05 et 12,216 % pour la plus petite concentration de 6.25 mg/ml L'activité inhibitrice de l'extrait alcaloïdique est plus importante que les extraits bruts pour le *Fusarium oxysporum*.

Tableau 9 : Les effets toxiques des extraits sur la croissance des souches fongiques testées *A. Niger, Fusarium oxysporum*.

Concentrations mg/ml	EBF		EBG		EAT	
	<i>A. Niger</i>	<i>Fusarium</i>	<i>A. Niger</i>	<i>Fusarium</i>	<i>A. Niger</i>	<i>Fusarium</i>
200	75.42%	57.43%	55.10%	58.51%	47.95%	64.86%
100	64.28%	16.21%	48.97%	35.67%	40.81%	56.75%
50	42.85%	12.16%	42.85%	24.32%	28.57%	59.45%
25	34.69%	10.13%	34.69%	25%	24.48%	52.70%
12.5	24.48%	9.45%	20.40%	23.64%	18.36%	45.94%
6.25	10.20%	4.05%	12.24%	12.16	6.12%	39.18%

III.6.2 Effet des extraits sur la croissance radiale des champignons

Pour déterminer aussi les propriétés antifongiques de nos extraits, ces derniers ont été examinés contre la croissance radiale mycélienne. Les extraits ont un effet inhibiteur significatif sur la croissance radiale mycélienne d'*Aspergillus niger* (Figure 36, 37,38). Cet effet a été prononcé surtout pour les concentrations les plus élevées. Le champignon a pu se développer mieux à la concentration la plus faible et l'effet n'a pas été significativement différent par rapport aux témoins.

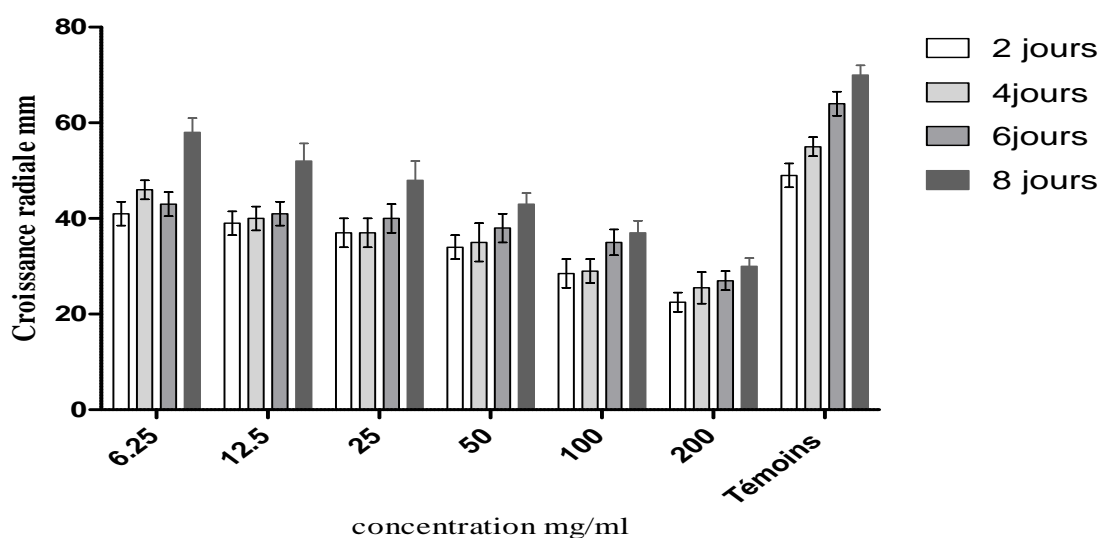


Figure 36 : Effet de différentes concentrations d'EAT sur la croissance radiale d'*Aspergillus niger*.

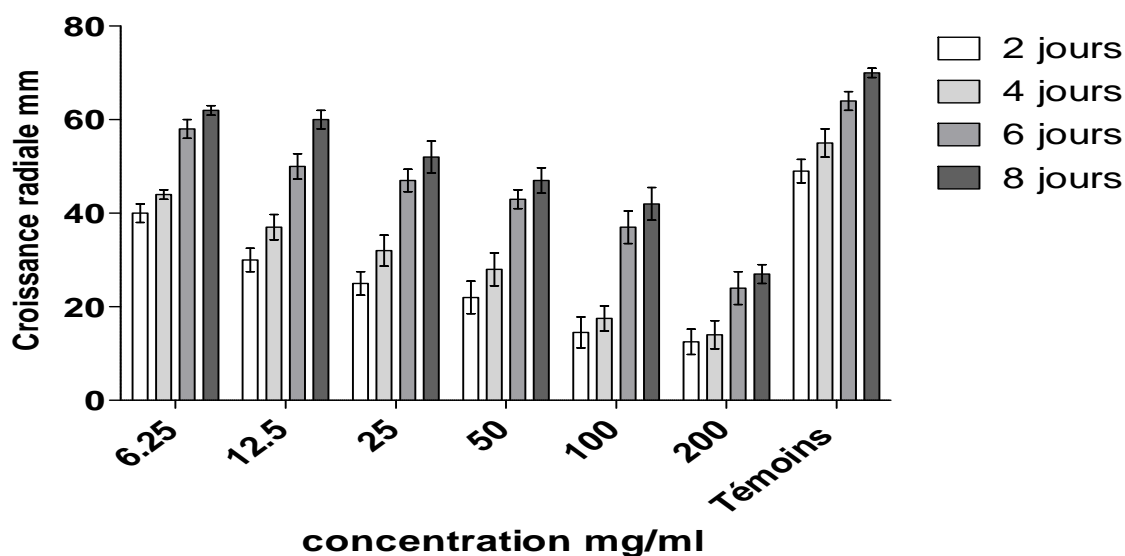


Figure 37 : Effet de différentes concentrations d'EBF sur la croissance radiale d'*Aspergillus niger*.

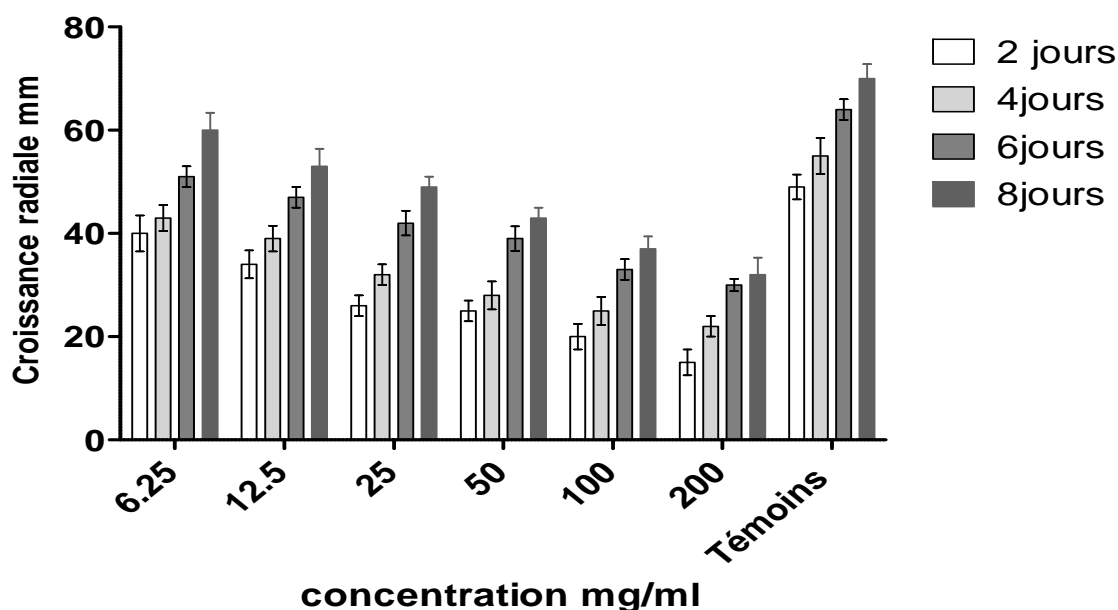


Figure 38 : Effet de différentes concentrations d’EBG sur la croissance radiale d’*Aspergillus niger*.

Concernant l’effet des extraits sur la croissance radiale de *Fusarium oxysporum*, on a remarqué que l’EAT a considérablement affecté la croissance radiale mycélienne (effet inhibiteur significatif) pour toutes concentrations et la durée d’incubation testée (Figure 38).

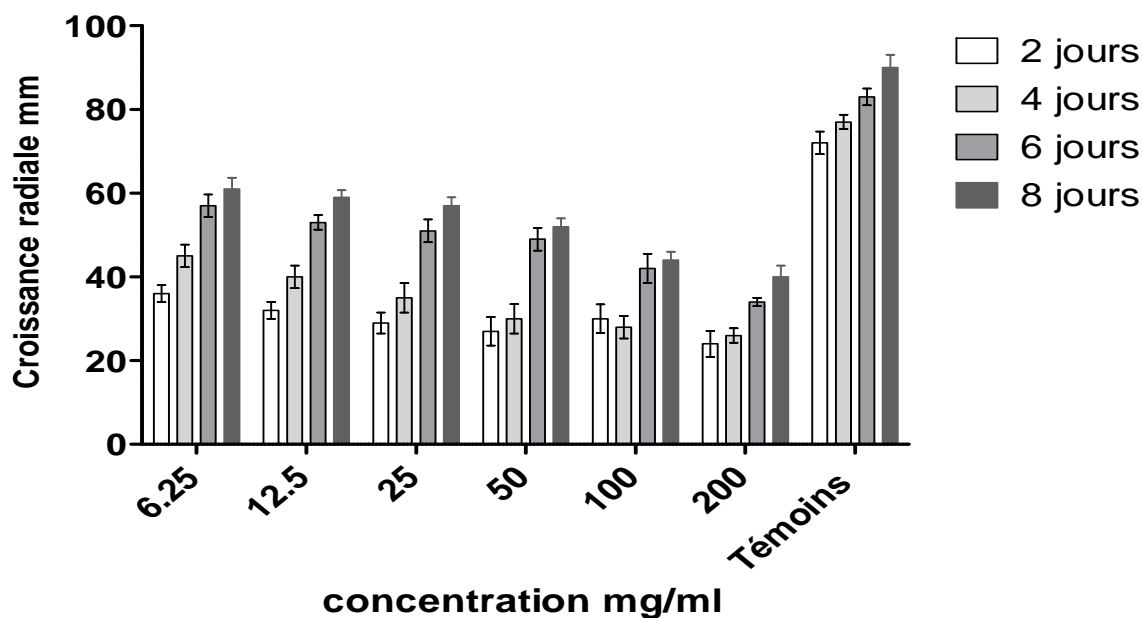


Figure 39 : Effet de différentes concentrations d’EAT sur la croissance radiale de *Fusarium Oxysporum*.

L’EBF a un effet inhibiteur significatif sur la croissance radiale mycélienne de *Fusarium oxysporum* surtout pour la concentration la plus élevée de 200 mg/ml. Pour les autres

concentrations qui suivent les extraits n'ont pas affectés la croissance mycélienne et le champignon a pu se développer et l'effet n'a pas été significativement différent aux témoins (Figure 40).

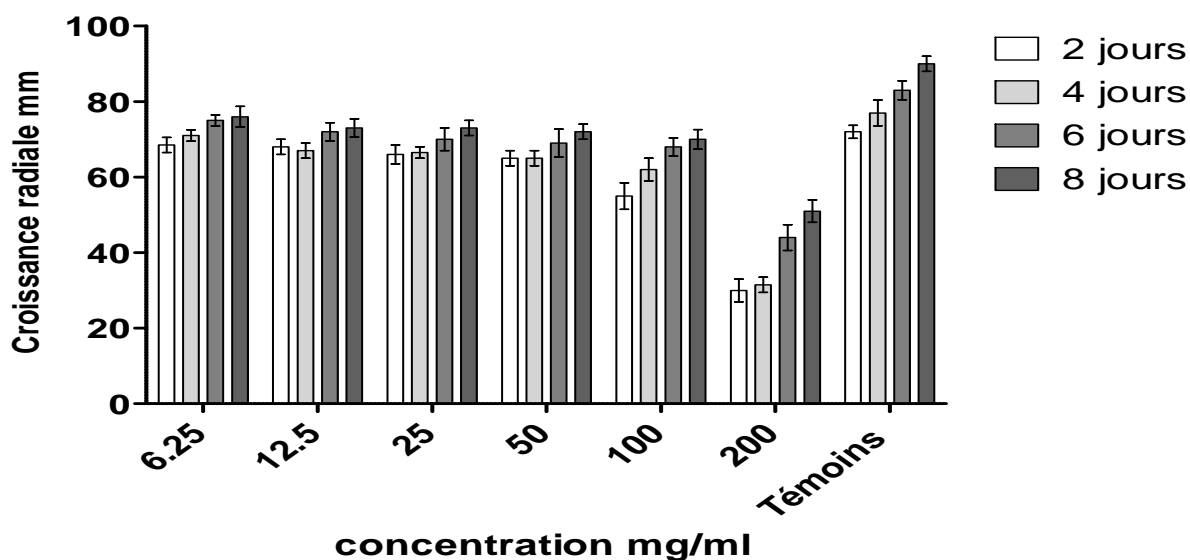


Figure 40 : Effet de différentes concentrations d'EBF sur la croissance radiale de *Fusarium oxysporum*

L'EBG a un effet inhibiteur significatif sur la croissance radiale mycélienne de *Fusarium oxysporum* surtout pour la concertation la plus élevée de 200 mg/ml (Figure 41).

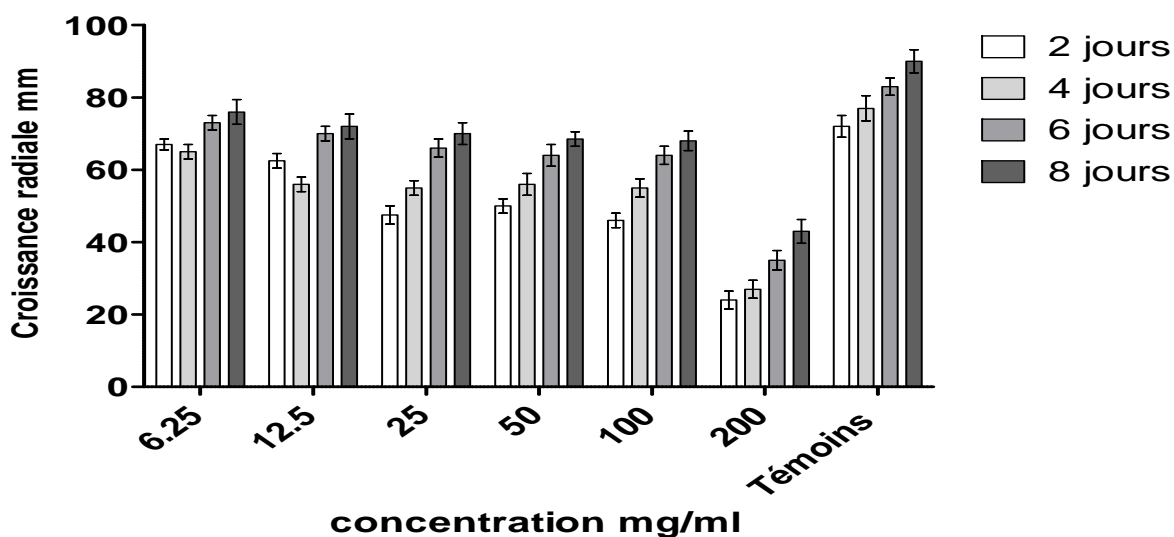


Figure 41: Effet de différentes concentrations d'EBG sur la croissance radiale de *Fusarium oxysporum*.

III.7 Détermination de la DL₅₀ chez les souris

III.7.1 Détermination de la DL₅₀ chez les souris femelles

III.7.1.1 Observation du comportement et symptômes cliniques des animaux

Des signes de toxicité sont observés dès le début du traitement. Les animaux ont montré une carte clinique caractérisée par des symptômes suivants : perdre de l'activité de locomotion, ataxie, alors que les syndromes nerveux sont excitabilité, tremblement, une respiration accélérée, des yeux saillants. Secondairement, l'activité des animaux se réduit, leur démarche devient lente, puis peu à peu ils se couchent avec pattes postérieures écartées.

La mort des souris a été notée dans les premières minutes après l'injection des alcaloïdes pour les doses plus élevés de 275- 560 mg/kg. Les souris ayant survécues dans les groupes traités ne s'alimentent pas et restent dans un état critique mais elles retrouvent leur état normal à partir du deuxième jour.

III.7.1.2 Calcul de la DL₅₀ par la méthode de Lichfield et Wilcoxon (1949)

Après administration des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*, par voie intrapéritonéale aux différents lots de souris avec des doses différentes comprises entre 85 mg/kg et 560 mg/kg, la mortalité des souris femelles en pourcentage et en unités des probits en fonction de la dose sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Tableau caractérisant « «Dose - Réponse » par dose unique après une injection intrapéritonéal des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris femelles (n=10).

Dose mg/kg	Mortalité	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	Σ χ ²
		Probit	%	Probit	%		
85	0/10	2,71	1.1	03	3.3	2.2	0,015
180	1/10	3,72	10	3,6	8.1	1.9	0.05
275	2/10	4,16	20	4.49	30.4	10.4	0,07
370	5/10	5,00	50	5.00	50	00	00
465	7/10	5,52	70	5.40	65.4	4.6	0,01
560	10/10	6.45	92.6	5.65	74.2	18.4	0.18

➤ Détermination des paramètres létales des souris femelles traitées par intrapéritonéale avec les alcaloïdes totaux de *Peganum harmala*

La somme des diverses contributions au χ² : Σ χ² expérimental = 0.280

χ² de la droite: χ² = Σ conχ² .N/K=0280.60/6= 2.8 (N: nombre total d'animaux, K : le nombre total de doses).

La valeur de χ^2 théorique pour le seuil de probabilité $p= 0.05$ pour un degré de liberté $n = 6-2$ (les nombres de doses-2) est: χ^2 tabule =9.49 donc χ^2 expérimental < χ^2 théorique. Donc le travail est acceptable. A partir des données présentées au tableau, on trace la courbe Probit en fonction de (log dose) (Figure 42).

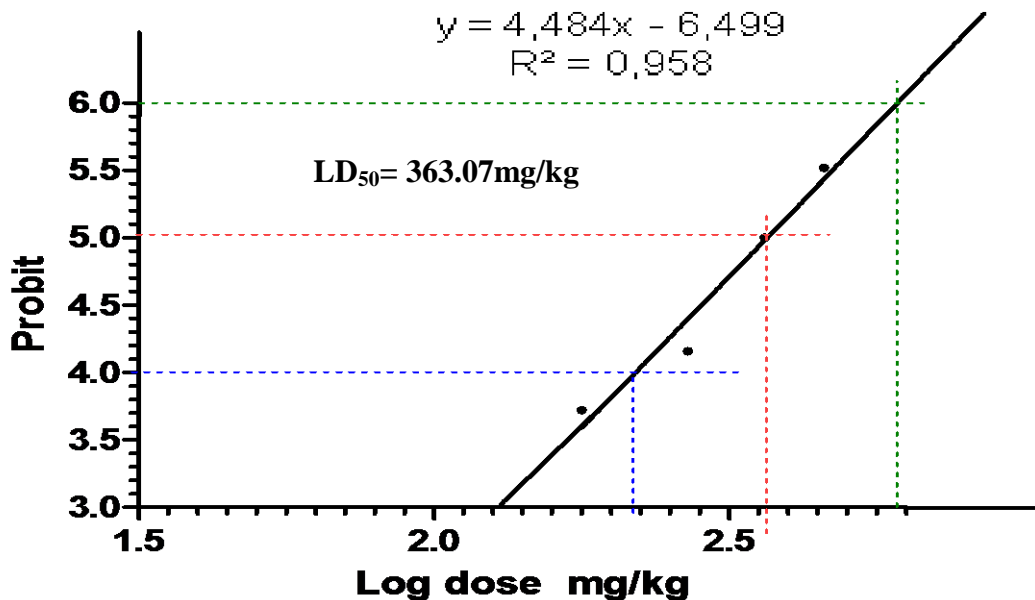


Figure 42 : Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponse » de la simple application par intrapéritonéal des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris femelles.

La DL_{50} calculée a partir de la droite tracée est égale à **363.07mg/kg**

La $DL_{16} = 218.77$ mg/kg

La $DL_{84} = 588.84$ mg/kg

- La pente (S)

$$S = (DL_{84}/ DL_{50} + DL_{50}/ DL_{16})/2 = 1.64$$

- L'intervalle de confiance

Pour le seuil de probabilité $P= 0.05$ l'intervalle de confiance de La DL_{50} est compris entre :

La limite supérieure : $DL_{50} \cdot f$ DL_{50} ,

La limite inférieure: DL_{50} / f DL_{50} avec $fDL_{50} = S^{2.77/ \sqrt{N}}$, N : le nombre d'animaux situés entre DL_{16} et DL_{84} donc l'intervalle est : **292.32 mg/kg < DL_{50} < 450.93 mg/kg**

III.7.1.3 Estimation de la DL₅₀ des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris femelles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés

La deuxième méthode utilisée, pour estimer et confirmé la DL₅₀ des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* est la méthode de « probits-Méthode des moindres carrés. »

Les résultats d'analyse par cette méthode exprimés en pourcentage et en unités des probits en fonction des doses injectées sont présentés dans le tableau 11 (Benbott *et al.* , 2013) .

Tableau 11 : Les résultats d'analyse obtenus par probits-Méthode des moindres carrés exprimés en pourcentage et en probits après une injection intrapéritonéale des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris femelles.

Dose (stimulus)	Pourcentage réel %	Nombre des animaux	Probits
85	0.025	10	3.039
180	0.1	10	3.718
275	0.2	10	4.158
370	0.5	10	5
465	0.7	10	5.52
560	0.975	10	6.96

La courbe dose -réponse ci-dessous (Figure 43) a permis d'estimer la DL₅₀ de **372,72 mg/kg**. Les différentes doses létales (DL) des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris femelles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale) sont :

DL₁₆= 235, 081 mg/kg

DL₈₄= 510.368 mg/kg

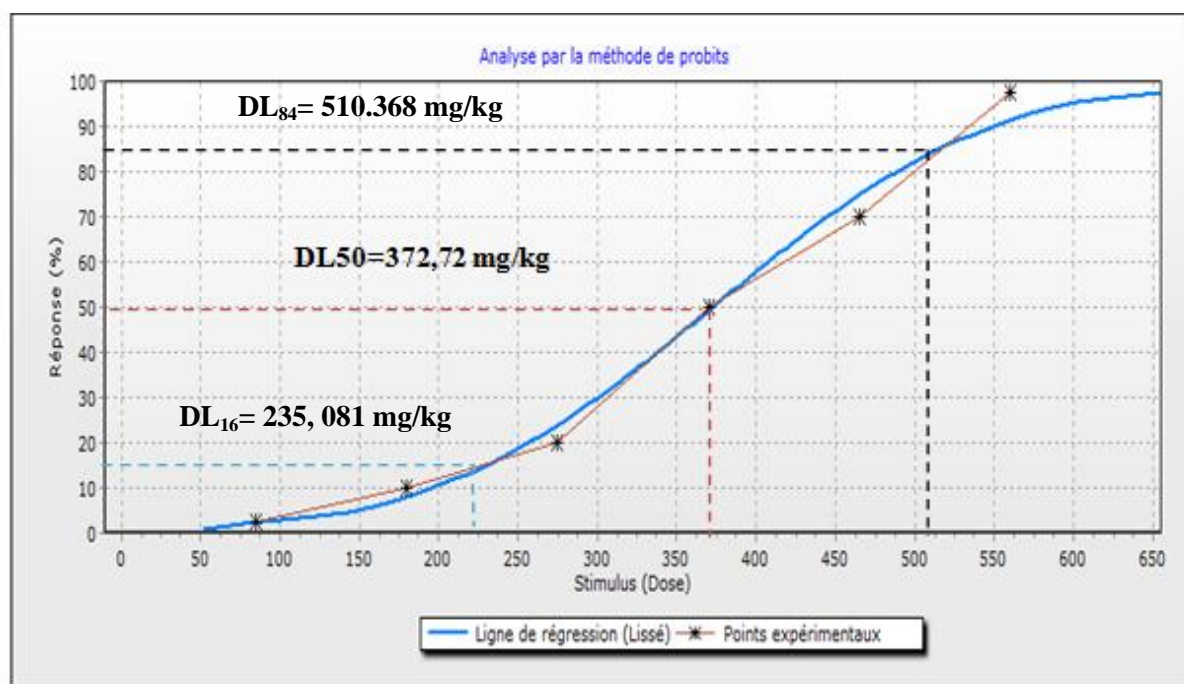


Figure 43: Courbe « dose - réponse » de la simple application par intrapéritonéal des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris femelles.

III.7.2 Détermination de la DL₅₀ chez les souris mâles

III.7.2.1 Observation du comportement et symptômes cliniques des animaux

Des signes de toxicité sont observés dans les premières minutes qui suivent l'administration, surtout pour les concentrations les plus élevées, des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles. Il s'agit essentiellement d'une baisse de l'activité locomotrice, ataxie, alors que les syndromes nerveux sont excitabilité, tremblement, une respiration accélérée, des yeux saillants suivis d'amaigrissement dans les jours suivants.

La mort des souris a été notée dans les premières minutes après l'injection des alcaloïdes pour les doses plus élevées de 275- 560 mg/kg. Les souris ayant survécues dans les groupes traités ne s'alimentent pas et restent dans un état critique mais elles retrouvent leur état normal à partir du deuxième jour.

III.7.2.2 Calcul de la DL₅₀ par la méthode de Lichfield et Wilcoxon (1949)

Après administration des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* par voie intrapéritonéale aux différents lots de souris et avec des doses comprises entre 85 mg/kg et 560 mg/kg, la mortalité des souris en pourcentage et en unités des probits en fonction de la dose sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Tableau caractérisant « «Dose - Réponse » par dose unique après une injection intrapéritonéale des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris mâle (n=10).

Dose mg/kg	Mortalité	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	Σ χ ²
		Probit	%	Probit	%		
85	0/10	2,99	2.2	3.5	6.6	4.4	0,03
180	1/10	3,72	10	3,8	12.6	2.6	0.007
275	3/10	4,48	30	4.5	31.0	10	00
370	5/10	5,00	50	5.00	50	00	00
465	6/10	5,25	60	5.30	61.6	1.6	0,0015
560	10/10	6.43	92.4	5.61	73	19.4	0.1

➤ **Détermination des paramètres létales des souris mâles traitées par intrapéritonéale avec les alcaloïdes totaux de *Peganum harmala***

La somme des diverses contributions au χ² : Σ χ² expérimental = 0.1385

χ² de la droite: $\chi^2 = \sum \text{con}\chi^2 \cdot N/K = 0.1385 \cdot 60/6 = 1.385$ (N: nombre total d'animaux, K : le nombre total de doses).

La valeur de χ² théorique pour le seuil de probabilité p= 0.05 pour un degré de liberté n = 6-2 (les nombres de doses-2) est: χ² tabule =9.49 donc χ² expérimental < χ² théorique. Donc le travail est acceptable. A partir des données présentées au tableau 14, on trace la courbe (Figure 44) Probit = f (log dose).

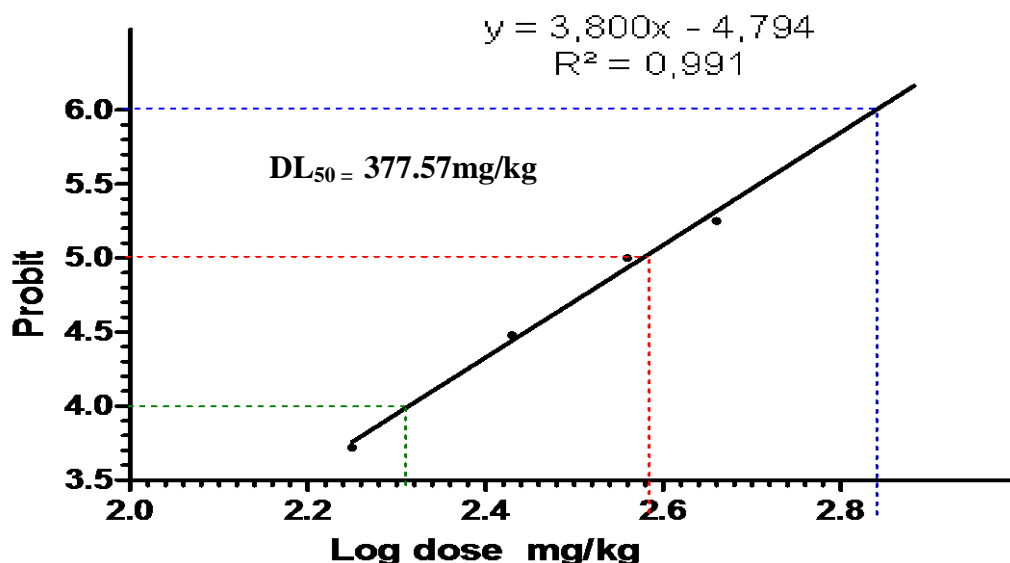


Figure 44 : Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris mâles.

La DL_{50} calculée a partir de la droite tracée est égale à **377.57mg/kg**

La DL_{16} = **206.07 mg/kg**

La DL_{84} = **691.83 mg/kg**

- **La pente (S)**

$$S = (DL_{84}/ DL_{50} + DL_{50}/ DL_{16})/2 = \mathbf{1.832}$$

- **L'intervalle de confiance**

Pour le seuil de probabilité $P=0.05$ l'intervalle de confiance de La DL_{50} est le suivant :

La limite supérieure : $DL_{50} \cdot f DL_{50}$, la limite inférieure: $DL_{50} / f DL_{50}$ avec $fDL_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$,

N' : le nombre d'animaux situes entre DL_{16} et DL_{84} .

Donc l'intervalle est comprise entre : **289.76 mg/kg <DL50 < 491.97mg/kg.**

III.7.2.3 Estimation de la DL_{50} des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés.

La deuxième méthode utilisée, pour estimer et confirmer la DL_{50} des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* est la méthode de « probits-Méthode des moindres carrés. »

Les résultats d'analyse par cette méthode exprimés en pourcentage et en unités des probits en fonction des doses injectées sont présentés dans le tableau 13 (Benbott *et al.* , 2013) .

Tableau 13: Les résultats d'analyse obtenus par probits-Méthode des moindres carrés exprimés en pourcentage et en probits après une injection intrapéritonéal des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris mâles.

Dose (stimulus)	Pourcentage réel %	Nombre des animaux n	Probits
85	0.025	10	3.039
180	0.1	10	3.718
275	0.3	10	4.476
370	0.5	10	5
465	0.6	10	5.25
560	0.975	10	6.96

La courbe dose -réponse ci-dessous (Figure 45) a estimé une DL₅₀ de **377,48 mg/kg**. Les différentes doses létales (DL) des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* chez les souris mâles par la méthode de probits-Méthode des moindres carrés (Distribution Normale) sont :

DL₁₆= 220, 631 mg/kg

DL₈₄= 534.33 mg/kg

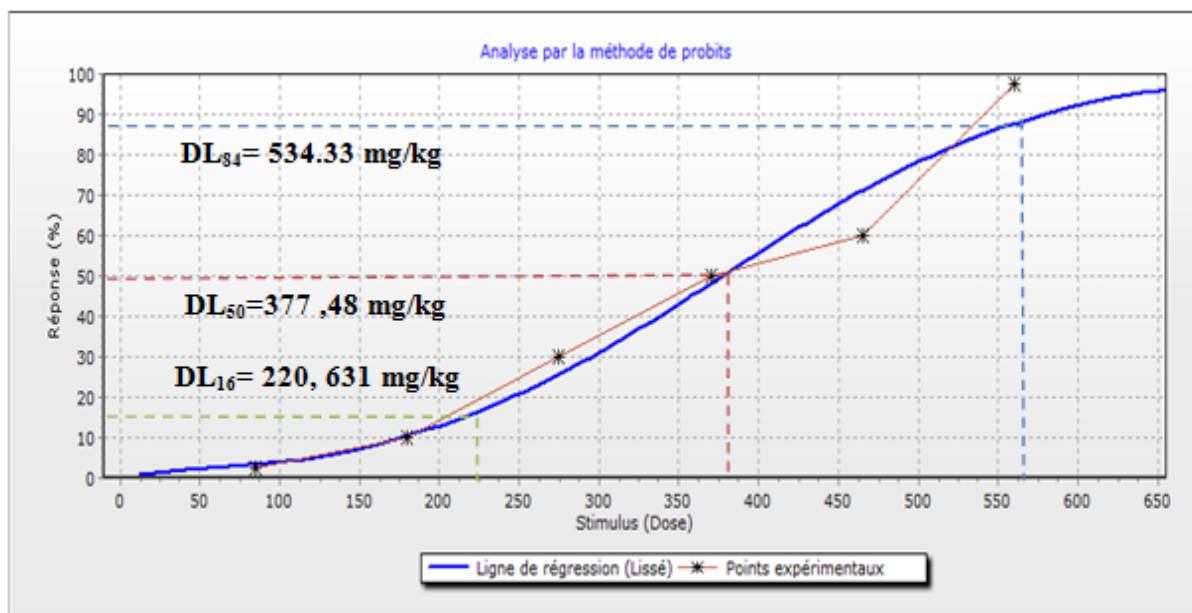


Figure 45: Courbe « dose - réponse » de la simple application par intrapéritonéal des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris mâles.

III.7.3 Etude de la sensibilité de sexe (souris femelles et mâles) aux alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*

D'après les données des doses testées et les probits obtenus pour déterminer les DL d'une simple application et par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles et femelles, on trace les courbes « dose-réponse » (Figure 46) pour tester la sensibilité liée au sexe.

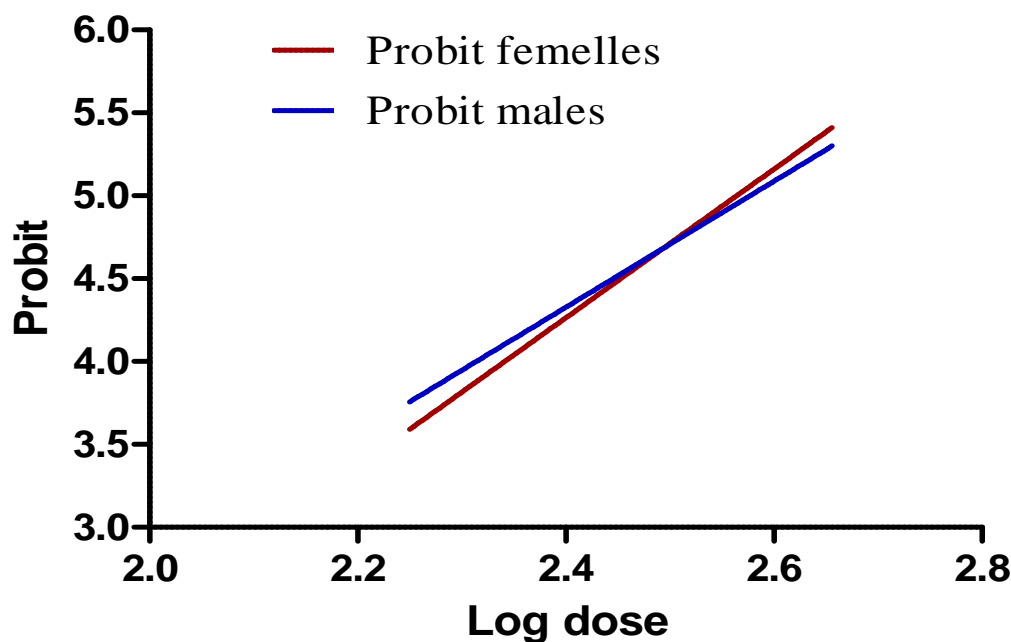


Figure 46 : Courbe caractérisant la dépendance « Dose- Réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* chez les souris des deux sexes.

➤ Détermination des paramètres d'étude de la sensibilité de sexe aux alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*

La pente de chaque courbe est calculée à partir des valeurs de la DL_{50} , DL_{16} et DL_{84}

Tant que le $SR < FSR$ on peut dire que les deux courbes sont pratiquement identiques (superposés) donc l'effet létal pourrait être identique chez les souris mâles et femelles

Tableau 14 : Paramètres de comparaison « dose-réponse » de la simple application par intrapéritonéale des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles et femelles

Les paramètres calculés	Equation des calculs	Souris femelles	Souris mâles
DL ₅₀ (mg/kg)		363.07	377.57
DL ₈₄ (mg/kg)		588.84	691.83
DL ₁₆ (mg/kg)		218.77	206.07
K= Coefficient de l'effet léthal	$K= 1/ DL_{50} \cdot S$	$1.67 \cdot 10^{-3}$	$1.44 \cdot 10^{-3}$
Z= La zone de l'effet léthal	$Z= DL_{84}/ DL_{16}$	2.691	3.357
S = La pente de la droite	$S= \frac{DL_{84}/DL_{50}+ DL_{50}/ DL_{16}}{2}$	1.64	1.832
F _S = coefficient de l'intervalle de S	F _S	1.22	1.35
FSR = coefficient de la relation entre les pentes.	FSR	1.43	
SR = La relation entre les pentes des droites	SR = S 1/ S2, S1> S2	1.11	

III.8 Toxicité aigüe des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris femelles

III.8.1 Le poids corporel et la masse relative des principaux organes des souris femelles dans les conditions de la toxicité aigüe

Le poids corporel des souris femelles témoins et traitées dans les conditions de la toxicité aigüe est présenté dans le tableau 15. Aucun changement significatif n'a été enregistré dans le poids corporel des animaux traités au 5^{ème} jour par rapport au témoin (5^{ème} jour).

Tableau 15 : L'effet des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* sur le poids corporel (g) des souris femelles traitées par la dose de 118 mg/kg dans les conditions de la toxicité aigüe. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.

Groupes	1 ^{er} jour	5 ^{ème} jours	Le gain
Traité sacrifié après le 1 jour	31.70 \pm 1.055		
Traités sacrifié après 5 jours	31.24 \pm 1.957	30.80 \pm 0.988	0.27 \pm 0.063
Témoins	34.80 \pm 0.904	35.57 \pm 0.593	0.58 \pm 0.407

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

Après dissection, l'examen macroscopique des principaux organes *in situ* (rein, foie, poumons, cerveau, rate et cœur), n'a révélé aucun changement morphologique dans les organes des souris traitées par les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* en comparaison avec ceux des souris témoins.

La variation de la masse relative des différents organes des souris traitées par alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* en comparaison avec des souris des lots témoins, a montré une augmentation significative après le 1^{er} jour de 66.20% et 12.83% respectivement du cœur et de cerveau (Tableau 16). On a enregistré aussi une diminution significative de la masse relative de 38.73 % des reins et une augmentation significative de 12.83% de cerveau respectivement pendant le 5^{ème} jour après l'application (Tableau 16). La masse relative des autres organes : foie, rate, poumons n'a pas connu aucun changement notable dans le 1^{er} jour et le 5^{ème} jour après application des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala*.

Tableau 16: Masse relative des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aigüe par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM

Organes	Témoins	Traités du 1 ^{er} jour	Traités du 5 ^{ème} jour
Foie	0.051 \pm 0.002	0.051 \pm 0.003	0.058 \pm 0.0005
Reins	0.0142 \pm 0.002	0.0092 \pm 0.0003	0.0087 \pm 0.0004*
Rate	0.0041 \pm 0.0002	0.0168 \pm 0.008	0.0047 \pm 0.0003
Cœur	0.0049 \pm 0.0002	0.0145 \pm 0.0003***	0.0045 \pm 0.0001
Poumons	0.0095 \pm 0.001	0.139 \pm 0.006	0.0067 \pm 0.0001
Cerveau	0.0129 \pm 0.0004	0.0148 \pm 0.0003*	0.149 \pm 0.0004*

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.8.2 Etude des paramètres hématologiques

Les résultats hématologiques obtenus sont illustrés dans le tableau 17. Pour la toxicité aiguë du premier jour, les paramètres hématologiques n'ont montré aucun changement notable. Au cours du 5^{ème} jour, on a enregistré une augmentation significative des MCHC 10.58 % et une diminution significative de MCV de 8,38 %.

Tableau 17 : Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM

Paramètres	Témoins	Traités du 1 ^{er} jour	Traités du 5 ^{ème} jour
RBC 10 ⁶ /mm	7.737 \pm 0.292	7.914 \pm 0.270	7.39 \pm 0.180
MCV fL	45,90 \pm 0,511	44,42 \pm 0,760	42,05 \pm 0,424**
HCT %	35 \pm 1	37 \pm 2	31 \pm 0.9
WBC 10 ³ /mm	6,233 \pm 0,6412	6,371 \pm 0,8676	6,980 \pm 1,877
PLT 10 ³ /mm	249 \pm 41.43	412.7 \pm 50.06	413.7 \pm 56.77
HGB g/dl	12,83 \pm 0,306	13,65 \pm 0,433	12,57 \pm 0,260
MCH pg	16,68 \pm 0,439	16,53 \pm 0,413	17,07 \pm 0,525
MCHC g/dL	36.33 \pm 0.73	37.05 \pm 1.51	40.63 \pm 1.27*

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.8.3 Etude paramètres biochimiques sériques

L'étude des paramètres biochimiques sériques pour l'évaluation de l'état du foie et des reins des souris traitées par des alcaloïdes de *Peganum harmala* a montré des changements significatifs pendant le 5^{ème} jour. Des augmentations significatives d'AST (51 ; 42%) et de PAL (40.72%) sont observées pendant le 5^{ème} jour. (Figure 47). Avec une augmentation significative d'urée (41.45%) pendant le 5^{ème} jour est enregistrée (Figure 48).

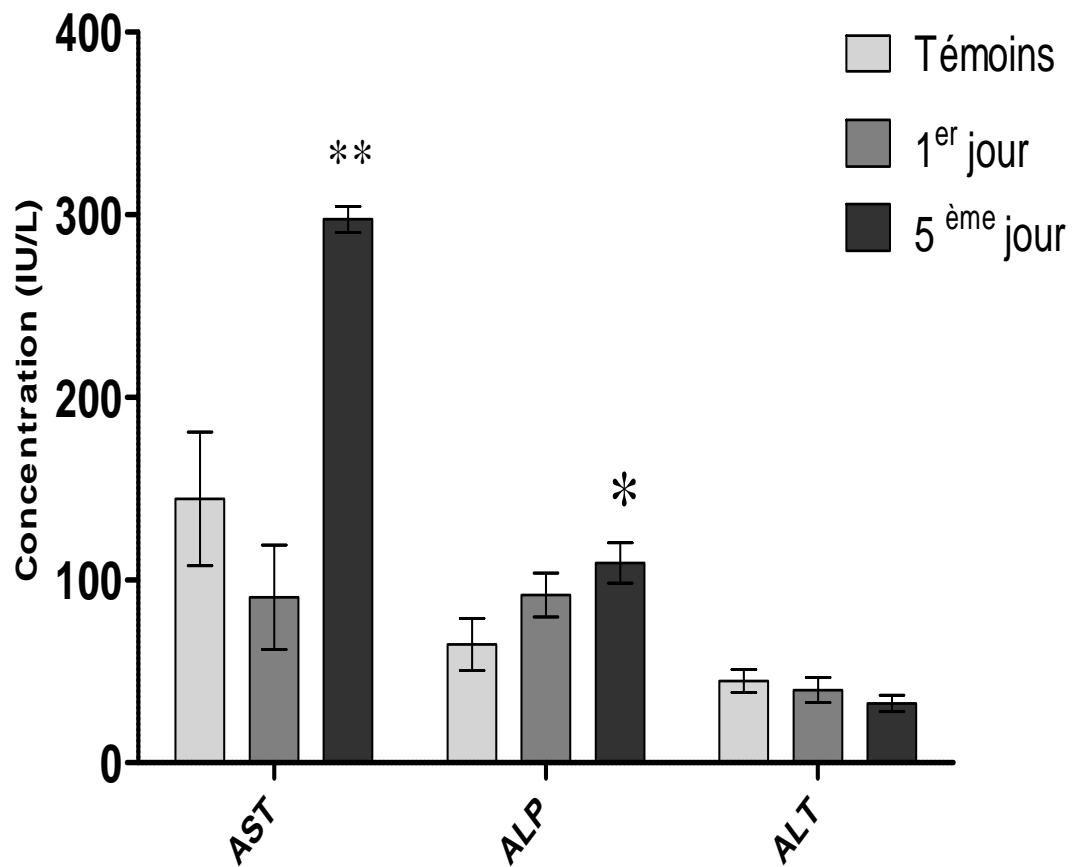


Figure 47 : Effet aigüe des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, ALP) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

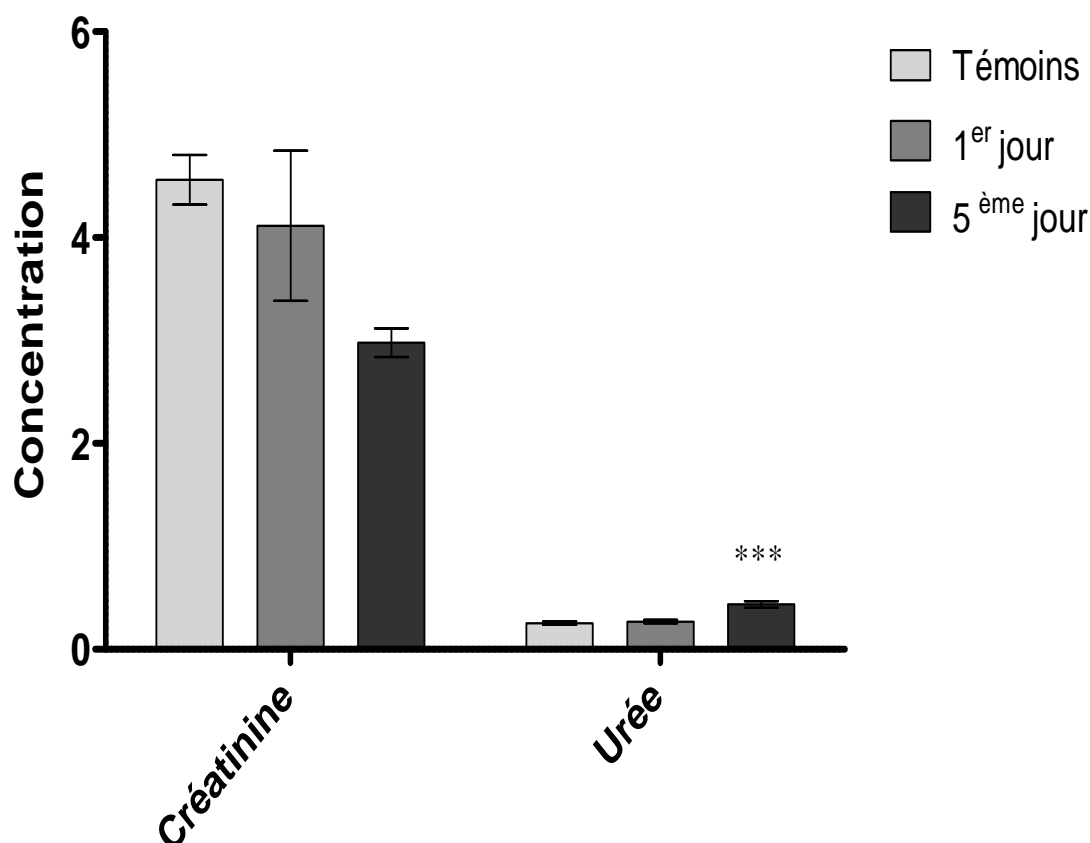


Figure 48: Effet aiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (118mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (Urée, créatinine) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.8.4 Etude histologique

Les figure ci-dessous (49, 50, 51), mettent en évidence les observations histologiques au niveau du foie, des reins et du cerveau dans les conditions de la toxicité aiguë par des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Aucune pathologie caractéristique, ni anomalie dans l'architecture des cellules du rein des groupes traités (1^{er} jour et 5^{ème} jour) par rapport aux témoins n'ont été observées.

Par contre, les coupes histologiques du foie ont montré une surcharge hépatocytaire au niveau des hépatocytes où elles apparaissent sous une forme agrandie avec un cytoplasme très étalé. Le cerveau a montré la présence des œdèmes dans les groupes traités en comparaison avec les groupes témoins.

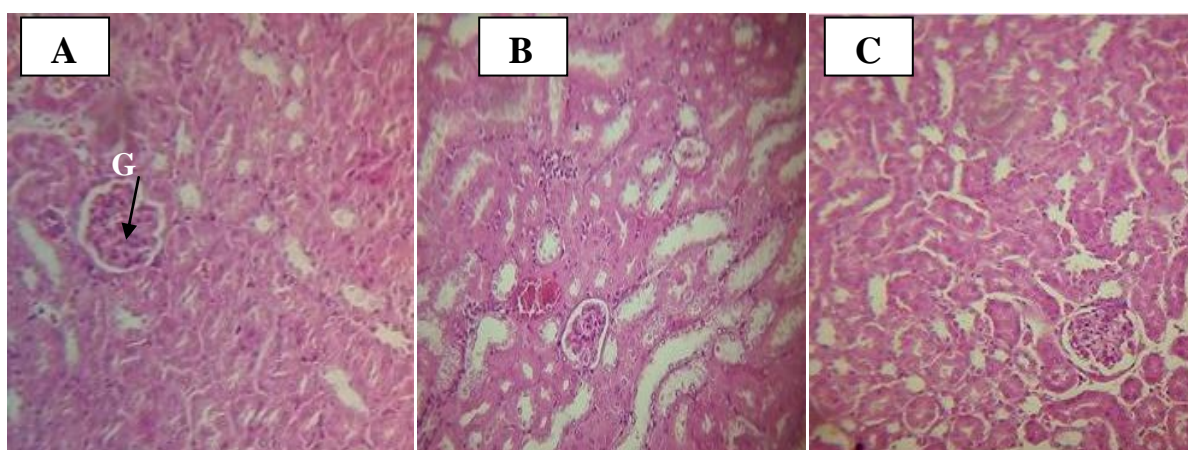


Figure 49: Coupes histologiques des tissus des reins des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aigüe avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (G : glomérules). (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème}. Coloration éosine hématoxyline. X40

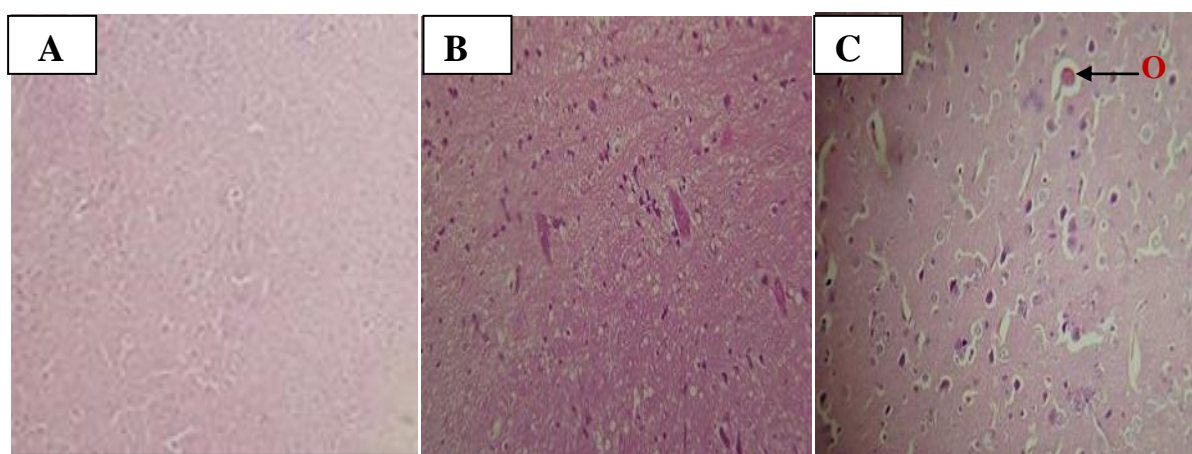


Figure 50 : Coupes histologiques des tissus du cerveau des souris femelles dans les conditions de la toxicité aigüe avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins. (B), (C) : Groupes traités pour le 1^{er} jour et 5^{ème} jour : montrent la présence des œdèmes :(O œdème). Coloration éosine hématoxyline. X40

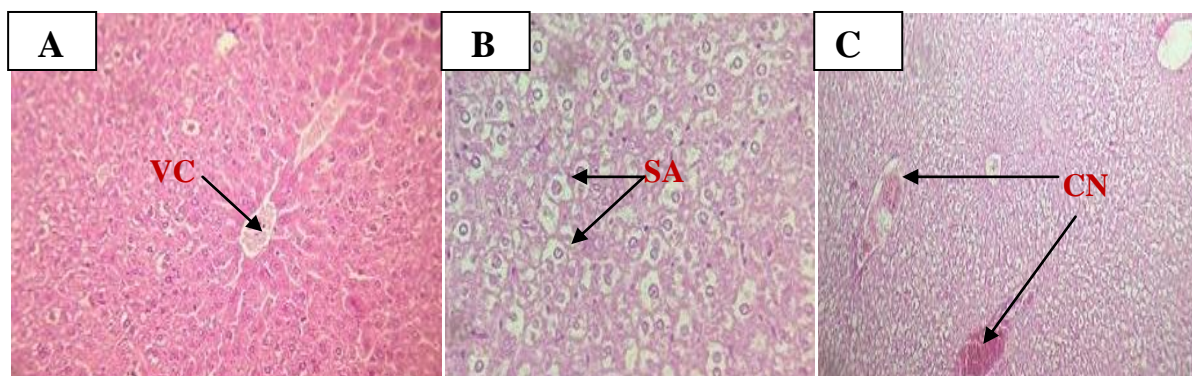


Figure 51 : Coupes histologiques des tissus du foie des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aigüe avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (VC : veine centrale. Groupes traités (B) :1^{er} jour, (C) 5^{ème} jour : montrent une surcharge hépatocytaire (SA), CN : Congestion. Coloration éosine hématoxyline. X40

III.9 Toxicité subaigüe des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris femelles

III.9.1 Les signes généraux et la variation du poids

Au cours de toxicité subaigüe par les alcaloïdes de *Peganum harmala* chez les souris femelles traitées par la dose de 18 mg/kg, on a noté une agressivité chez les souris à partir de la 2^{ème} semaine jusqu'aux derniers jours d'application.

Les pesées hebdomadaires tout au long de la durée de l'expérimentation (28 jours) ont permis de suivre l'évolution pondérale des groupes traités et témoins, les résultats obtenus sont rapportés dans la figure (52). L'évolution pondérale du groupe traité a connu une baisse significative à la 2^{ème} semaine puis elle a marqué une récupération pour la 3^{ème} et la dernière semaine. Les témoins ont présente une évolution normale de leurs poids.

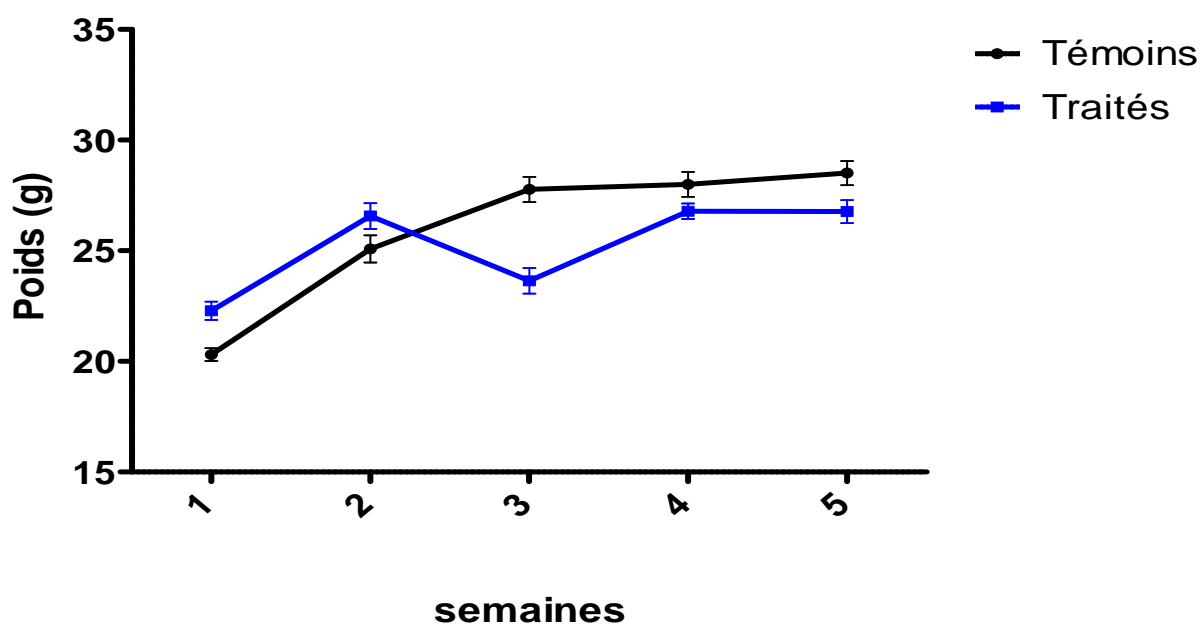


Figure 52: L'effet des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* sur l'évolution du poids des souris traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe. Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.9.2 Masse relative des différents organes des souris femelles dans les conditions de la toxicité subaiguë

Comme dans la toxicité aiguë, l'examen macroscopique des organes n'a révélé aucun changement morphologique à l'œil nu chez des souris traitées par les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* en comparaison avec les souris témoins.

La masse relative des organes n'a révélé aucun changement notable. A l'exception d'une augmentation significative de la masse relative du cerveau de 54.83 % en comparaison avec le groupe traité a été constaté (Tableau 18)

Tableau 18 : Masse relative des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM

Groupes	Témoins	Traités du 28 ^{ème} jour
Foie	0.051 \pm 0.0030	0.046 \pm 0.0016
Cerveau	0,014 \pm 0,0004	0,031 \pm 0,016***
Reins	0,0107 \pm 0,0005	0,0099 \pm 0,0003
Poumons	0,0068 \pm 0,0003	0,0077 \pm 0,0004
Cœur	0,0050 \pm 0,0002	0,0047 \pm 0,00018
Rate	0,0057 \pm 0,0002	0,0052 \pm 0,0003

* Significativement différent pour p< 0.05.

III.9.3 Etude des paramètres hématologiques

Les valeurs individuelles des paramètres hématologiques des souris témoins et traités sont consignées dans le tableau (19). On ne constate aucune variation des paramètres hématologiques (RBC, MCV, HCT, MPV, PLT, HGB, MCH) pendant toute la durée de traitement. Les taux d'hémoglobine (HB), d'hématocrite (HT), de globules rouges (GR) et des globules blancs (GB) des souris traités sont restés comparables à celles des souris témoins.

Tableau 19 : Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM

Paramètres	Témoins	Traités du 28 ^{ème} jour
RBC 10 ⁶ /	7,820 \pm 0,2474	8,471 \pm 0,2194
MCV fL	53,50 \pm 0,5000	51,57 \pm 0,7825
HCT %	43,78 \pm 2,082	43,61 \pm 1,232
WBC 10 ³ /mm	7,017 \pm 0,9148	6,043 \pm 0,9614
PLT 10 ³ /mm	924,8 \pm 80,16	1009 \pm 121,9
HGB g/dl	13,52 \pm 0,2701	14,31 \pm 0,2040
MCH pg	17,30 \pm 0,3445	16,96 \pm 0,3221
MCHC g/dL	32,35 \pm 0,4759	32,97 \pm 0,6171
Lymphocyte %	81,88 \pm 1,860	69,40 \pm 4,647*
Monocyte %	10,88 \pm 1,028	16,70 \pm 1,667*
Granulocyte %	7,183 \pm 1,073	13,92 \pm 3,125*

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

A l'exception une augmentation significative des monocytes et des granulocytes avec une diminution significative du nombre des lymphocytes sont notées.

III.9.4 Etude des paramètres biochimiques sériques

Les résultats du suivi sur 28 jours des taux sériques d'AST et ALT sont rapportés dans la figure 53 et révèlent une augmentation significative de leurs valeurs de 64.76% et 67.74 respectivement par rapport à ceux du groupe témoin. Cependant les valeurs moyennes des taux sériques de la PAL n'ont montré aucun changement notable.

Les résultats de l'évolution de la créatinémie et de l'urémie chez les souris traitées en comparaison avec le groupe témoin n'ont montré aucune différence significative (Figure 54).

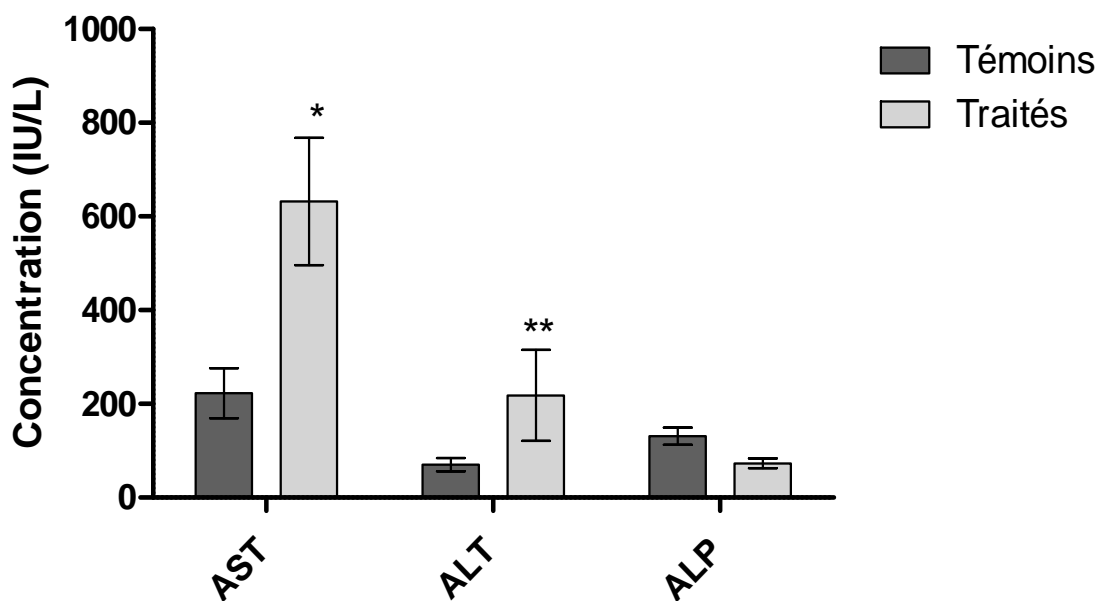


Figure 53 : Effet subaiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL_{50}) sur quelques paramètres biochimiques (AST, ALT, PAL) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

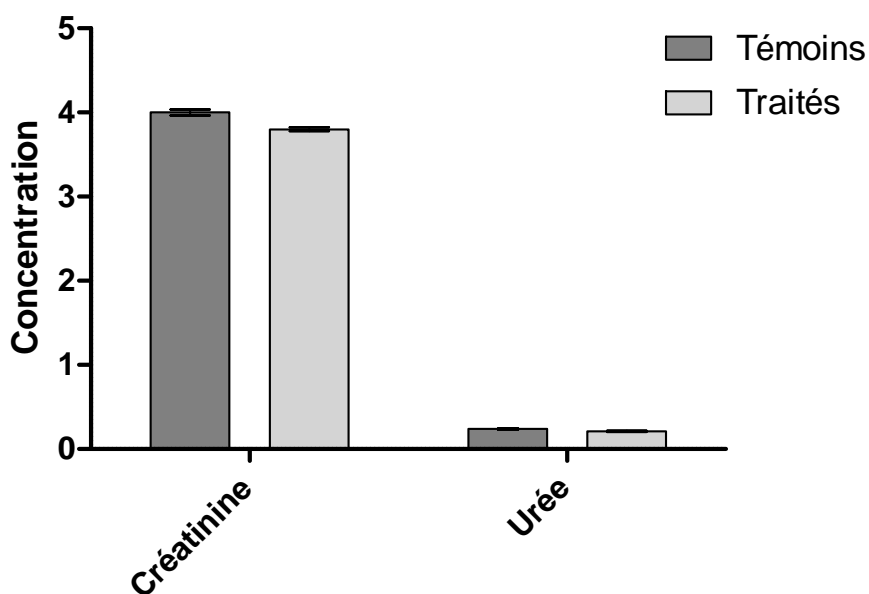


Figure 54 : Effet subaiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL_{50}) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris femelles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.9.5 Etude histologique

L'observation des coupes histologiques des reins des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* a montré une congestion sanguine du parenchyme rénal en comparaison avec le groupe témoins (Figure 55).

Les coupes histologiques du foie, ont permis de constater la conservation de la structure architecturale des lobes hépatiques, néanmoins des congestions sanguines sont observées chez des souris femelles traitées par rapport aux témoins. Les coupes histologiques du cerveau des souris traitées n'ont pas noté de changement dans leurs structures, sauf la présence de quelques œdèmes (Figure 55).

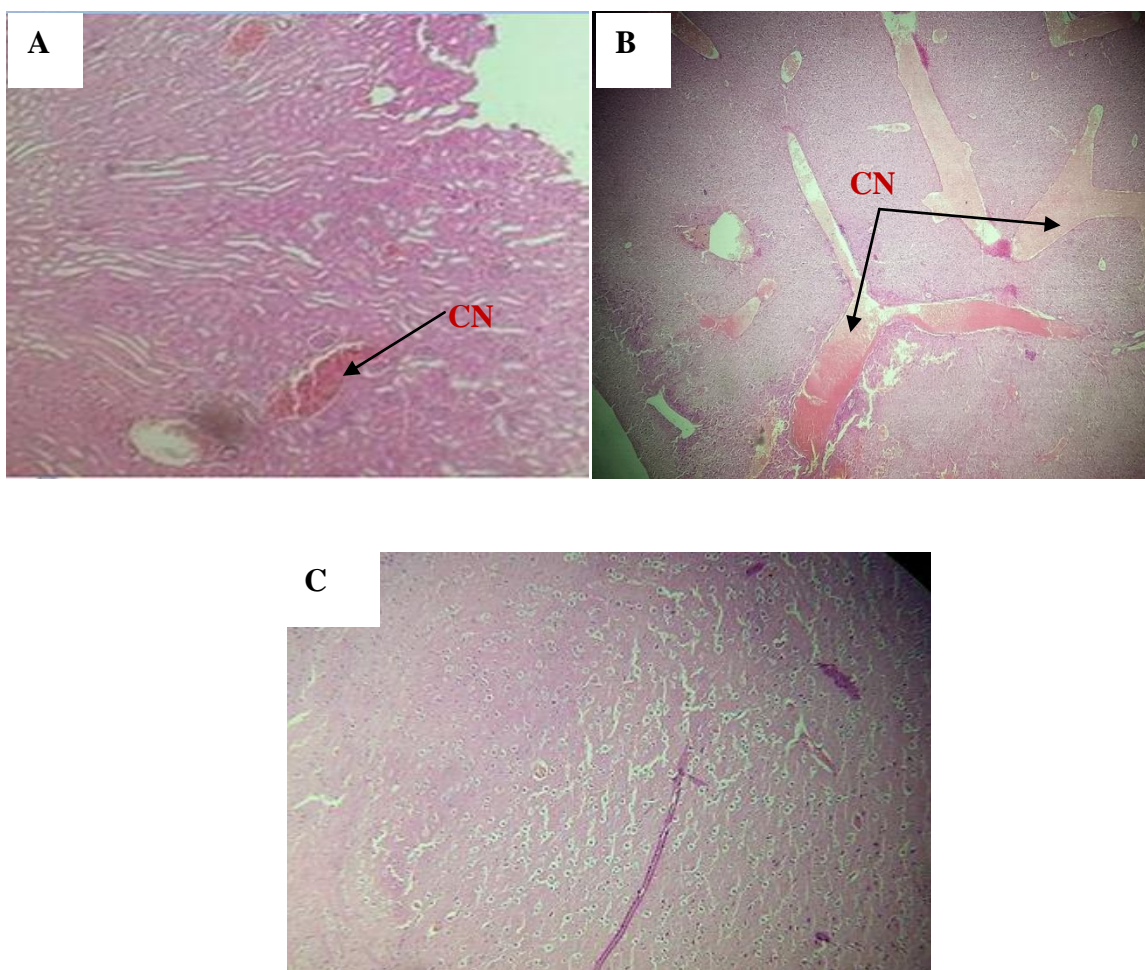


Figure 55 : Coupes histologiques des tissus : (A) des reins, (B) du foie, (C) du cerveau dans des souris femelles traitées les conditions de la toxicité subaiguë avec la dose de 18 mg/kg. CN : Congestion Coloration éosine hématoxyline. X40

III.10 Toxicité aigüe des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles

III.10.1 Le poids corporel et la masse relative des différents organes des souris mâles dans les conditions de la toxicité aigüe

Le poids corporel des souris mâles témoins et traitées dans les conditions de la toxicité aigüe est présenté dans le tableau 20. Aucun changement significatif n'a été enregistré dans le poids corporel des animaux traités au 5^{ème} jour par rapport au témoin (5^{ème} jour).

Tableau 20 : L'effet des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* sur le poids corporel (g) des souris mâles traitées par la dose de 118 mg/kg dans les conditions de la toxicité aigüe. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.

Groupes	1 ^{er} jour	5 ^{ème} jours	Le gain
Traité sacrifié après le 1 jour	32 \pm 0.748		
Traité sacrifié après 5 jours	31 \pm 0.258	30.84 \pm 0.300	1.027 \pm 0.263
Témoins	28.20 \pm 0.61	27.02 \pm 0.398	1.765 \pm 0.379

L'examen macroscopique des organes *in situ* (rein, foie, poumons, cerveau, rate, cœur et testicules) des souris mâles traitées par les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*, n'a révélé aucun changement morphologique notable en comparaison avec ceux des souris témoins. Le poids relatif des organes des groupes traités (après 24 h et 5 jours du traitement) n'a montré aucun changement significatif en comparaison avec le groupe témoin (tableau 21).

Tableau 21 : Masse relative des organes des souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë traitées par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.

Organes	Témoins	Traités du 1 ^{er} jour	Traités du 5 ^{ème} jour
Foie	0,0407 \pm 0.002	0,0440 \pm 0.003	0,0474 \pm 0.002
Reins	0.0114 \pm 0.0010	0.0107 \pm 0,0016	0.0101 \pm 0.0004
Rate	0.0045 \pm 0.0005	0.0039 \pm 0.0008	0.0039 \pm 0.0005
Cœur	0.0041 \pm 0.0003	0.0043 \pm 0.0006	0.0046 \pm 0.0009
Poumons	0.0077 \pm 0.0006	0.0079 \pm 0.0008	0.0083 \pm 0.001
Cerveau	0.0136 \pm 0.001	0.0109 \pm 0.001	0.0119 \pm 0.0006
Testicules	0.0064 \pm 0.0006	0.0060 \pm 0.0005	0.0065 \pm 0.0005

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.10.2 Etude des paramètres hématologique

Les résultats hématologiques obtenus sont illustrés dans le tableau 22. Ils n'ont révélé aucun changement significatif dans les paramètres hématologiques (RBC, MCV, HCT, MPV, PLT, HGB, MCH).

Tableau 22 : Paramètres hématologiques des souris males dans les conditions de la toxicité aiguë traitées par la dose de (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM

Paramètres	Témoins	Traités du 1 ^{er} jour	Traités du 5 ^{ème} jour
RBC 10 ⁶ /mm	8.31 \pm 1.02	8.10 \pm 0.215	9.90 \pm 0.301
MCV fL	46,78 \pm 1.860	45,06 \pm 0,667	47,60 \pm 0,651
HCT %	39.12 \pm 5.405	36.94 \pm 0.907	47. \pm 1.396
WBC 10 ³ /mm	5,660 \pm 0,938	6,117 \pm 1.475	6,533 \pm 0.594
PLT 10 ³ /mm	455 \pm 94.20	639.0 \pm 87.55	622.8 \pm 76.21
HGB g/dl	13,1 \pm 1.33	12,9 \pm 0,406	15,9 \pm 0,453
MCH pg	15,94 \pm 0,457	15,24 \pm 0,224	16,07 \pm 0,499
MCHC g/dL	34.36 \pm 1.858	33.42 \pm 0.682	33.22 \pm 1.016

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.10.3 Etude des paramètres biochimiques sériques

Les paramètres biochimiques sériques d'évaluation de la fonction rénale (créatinine, urée) et hépatiques (AST, ALT, PAL) sont illustrés dans les figures ci-dessous (figure 56, 57) ne révèlent aucun changement significatif à l'exception d'une augmentation significative d'urée après le 5^{ème} jour du traitement.

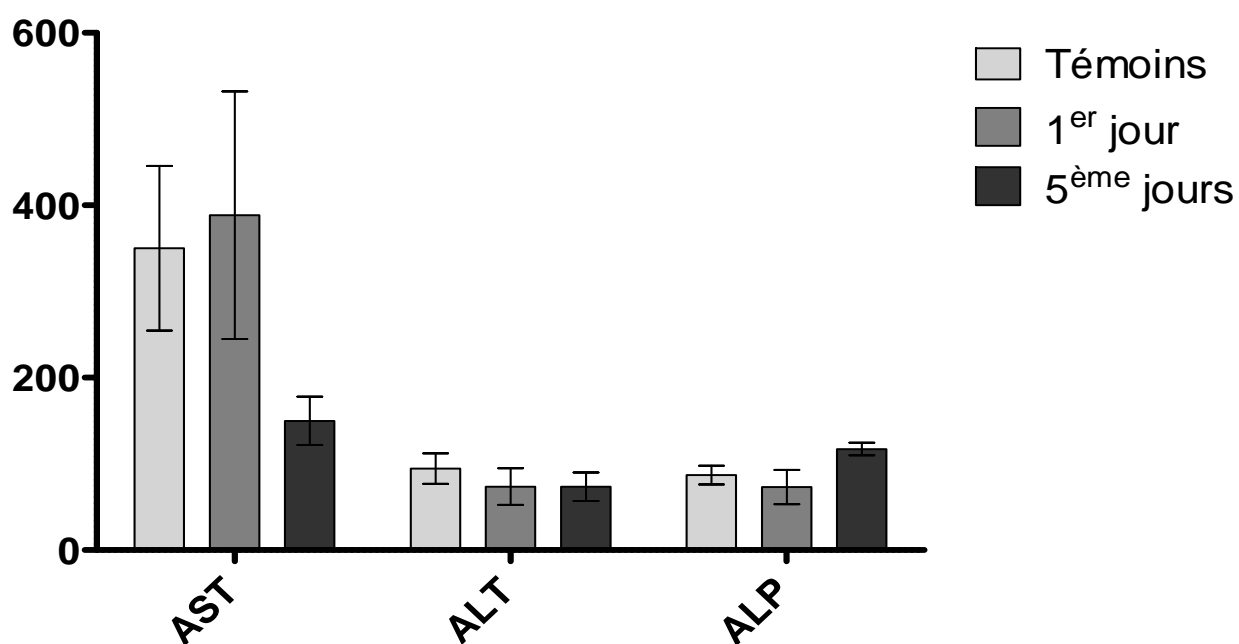


Figure 56 : Effet aigüe des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, PAL) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

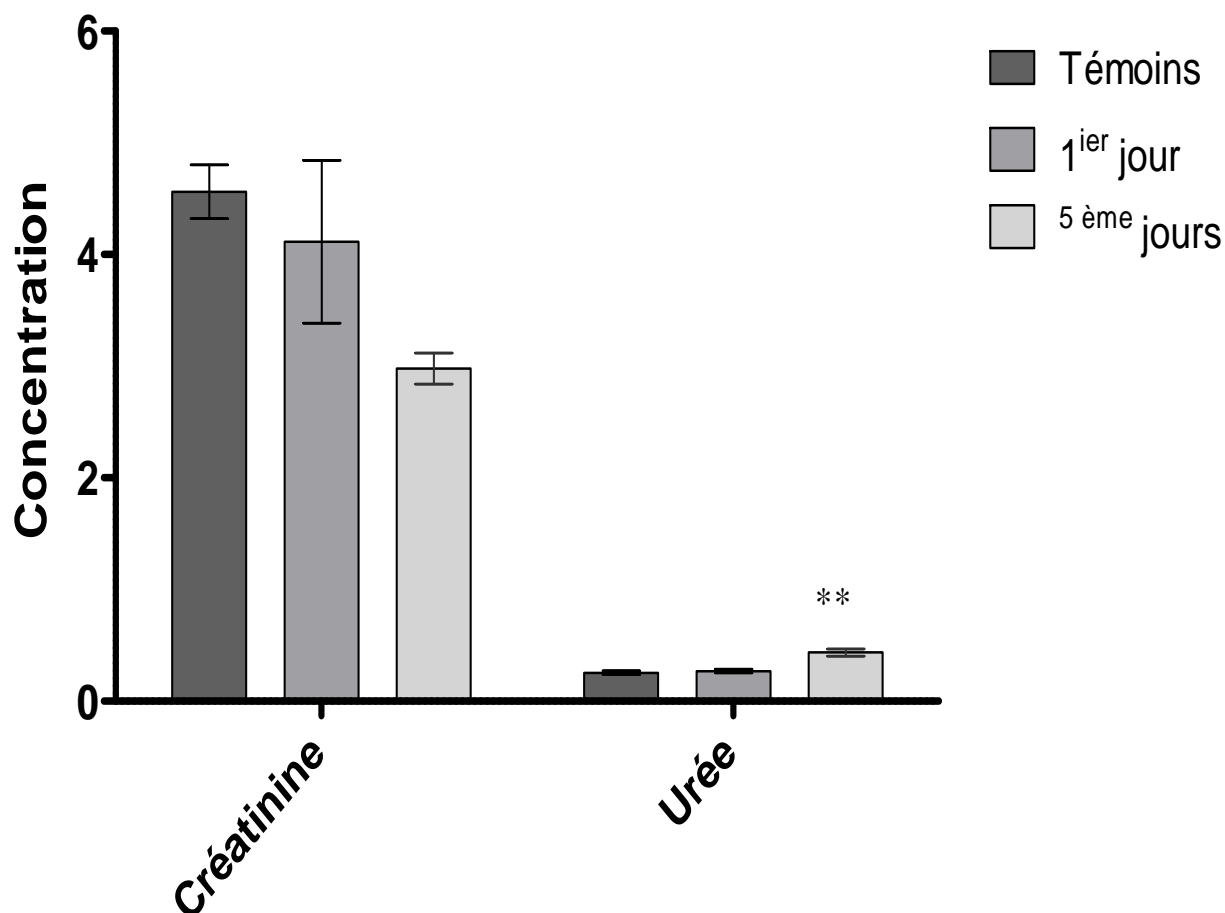


Figure 57 : Effet aiguë des alcaloïdes totaux du *Peganum harmala* (118 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.10.4 Etude histologique

Dans les conditions de la toxicité aiguë (du 1^{er} jour et 5^{ème} jour) des alcaloïdes totaux chez les souris mâles, les coupes histologiques du foie (Figure 58) montrent une architecture normale avec une congestion sanguine hépatique en comparaison avec le groupe témoin.

Les coupes histologiques des reins montrent aussi une congestion sanguine rénale dans les mêmes conditions de la toxicité aiguë (du 1^{er} jour et 5^{ème} jour) (Figure 59).

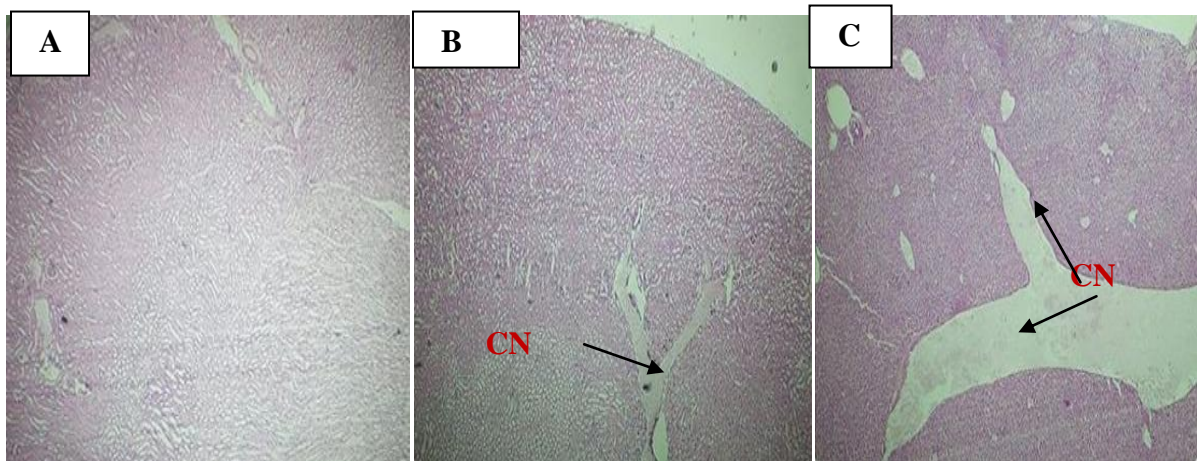


Figure 58 : Coupes histologiques des tissus du foie dans les conditions de la toxicité aigüe chez les souris mâles avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (VC : veine centrale, SI : sinusöide, NH : hépatocytes normaux). (B), (C) : Groupes traités de 1^{er} jour et 5^{ème} jour .CN : congestion hépatique. Coloration éosine hématoxyline X40.

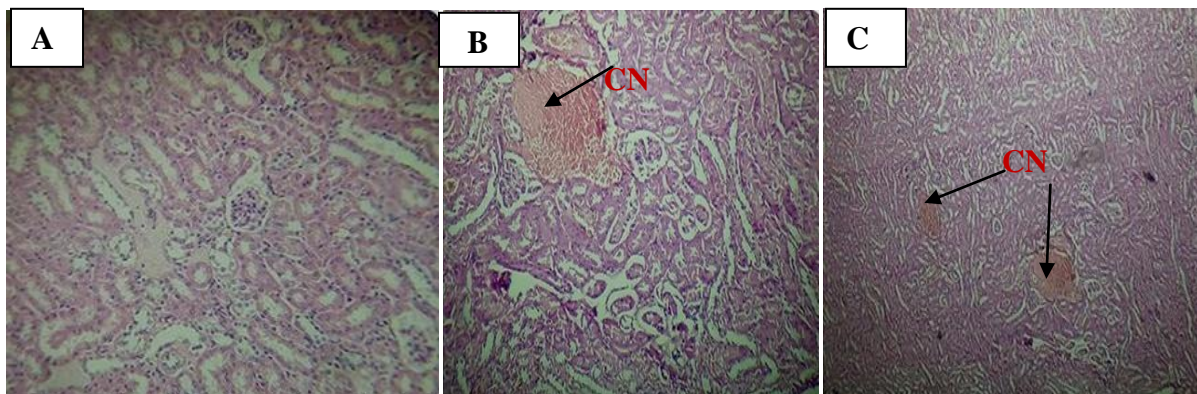


Figure 59: Coupes histologiques des tissus des reins dans les conditions de la toxicité aigüe chez des souris mâles avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins (G : glomérules). (B), (C) : Groupes traités de 1^{er} jour et 5^{ème}. CN : Congestion. Coloration éosine hématoxyline. X40

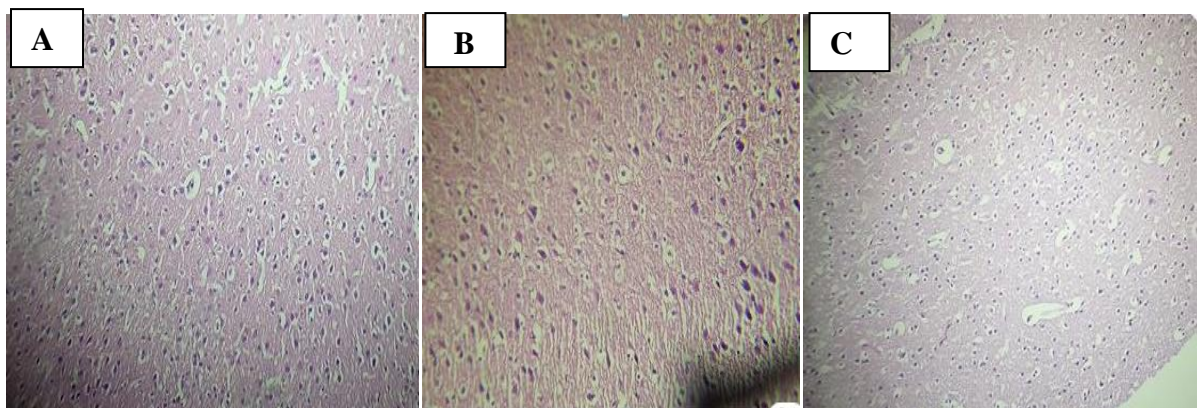


Figure 60: Coupes histologiques des tissus du cerveau dans les conditions de la toxicité aigüe chez des souris mâles avec la dose de 118 mg/kg. (A) Groupe témoins. (B), (C) : Groupes traités de 1^{er} jour et 5^{ème}. Coloration éosine hématoxyline. X40

III.11 Toxicité subaiguë des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* chez les souris mâles

III.11.1 Les signes généraux et la variation du poids

Les souris mâles traitées avec la dose de 18 mg/kg des alcaloïdes de *Peganum harmala* dans les conditions de la toxicité subaiguë ont noté une agressivité à partir de la 2^{ème} semaine jusqu'aux derniers jours d'application. Le poids corporel n'a signalé aucun changement significatif pendant toute les semaines d'expérimentation en comparaison avec le groupe témoin (Figure 61) (une évolution normale du poids).

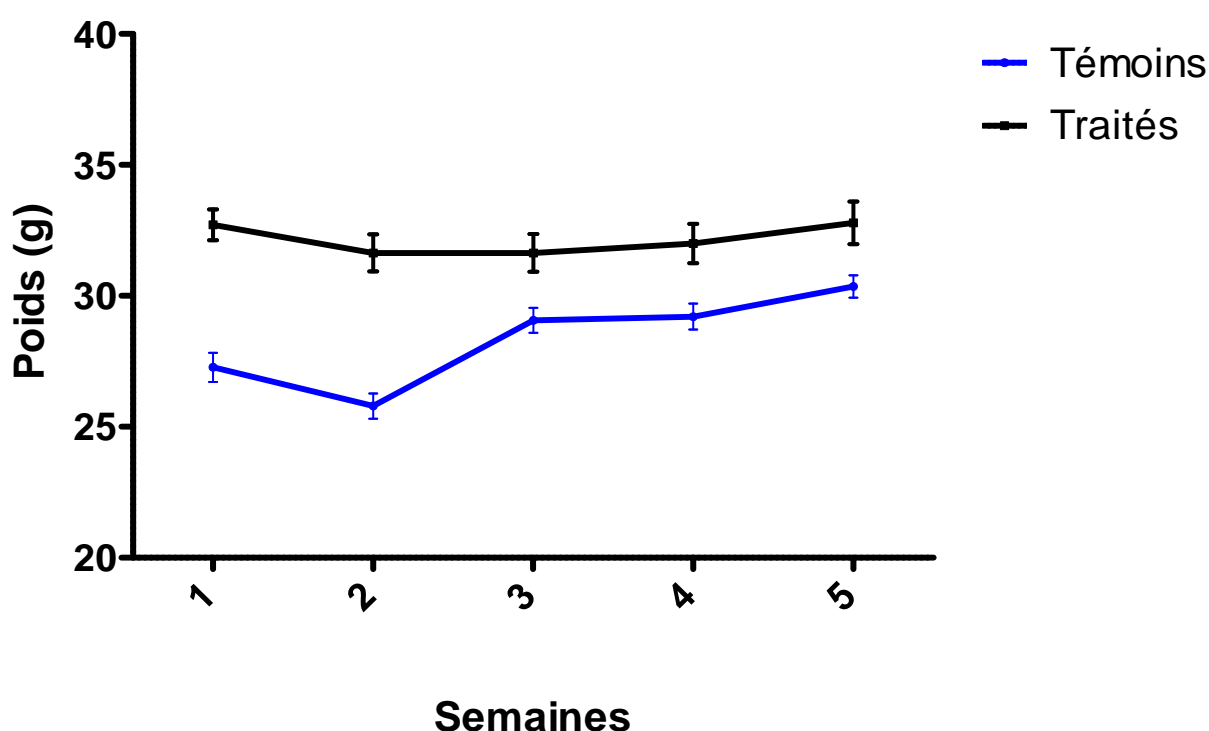


Figure 61 : L'effet des alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* sur le poids absolu des souris mâles dans les conditions de la toxicité subaiguë, valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.11.2 Masse relative des différents organes des souris mâles traités dans les conditions de la toxicité subaiguë

Les masses relatives des différents organes sont mentionnées dans le tableau 23. Elles montrent une augmentation significative de 24%, 29.41%, 23.80 et 25% respectivement des reins, poumons, cœur et la rate. Le foie, le cerveau et les testicules n'ont connu aucun changement significatif en comparaison avec les témoins.

Tableau 23 : Masse relative des organes des souris mâles traités dans les conditions de la toxicité subaigüe traitées avec la dose de (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM.

Groupes	Témoins	Traités du 28 ^{ème} jour
Foie	0.046 \pm 0.0020	0.049 \pm 0.0018
Cerveau	0,0131 \pm 0,0004	0,0128 \pm 0,0004
Reins	0,0100 \pm 0,0002	0,0124 \pm 0,0003***
Poumons	0,0051 \pm 0,0003	0,0066 \pm 0,0003**
Cœur	0,0042 \pm 0,0002	0,0052 \pm 0,00015**
Rate	0,0032 \pm 0,0002	0,0040 \pm 0,0002*
Testicules	0.0058 \pm 0,0003	0.0064 \pm 0,0002

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.11.3 Etude des paramètres hématologique

Les paramètres hématologiques des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe n'ont montré aucun changement significatif en comparaison avec le groupe témoin (Tableau 24).

Tableau 24 : Paramètres hématologiques des souris mâles traités dans les conditions de la toxicité subaigüe traitées avec la dose (18 mg/kg \approx 1/20 DL₅₀) des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*. Valeurs sont exprimés moyenne \pm SEM.

Paramètres	Témoins	Traités du 28 ^{ème} jour
RBC 10 ⁶ /	8,650 \pm 0,4563	8,507 \pm 0,1451
MCV fL	47,47 \pm 1,029	50,68 \pm 1,845
HCT %	41,23 \pm 2,903	43,07 \pm 1,269
WBC 10 ³ /mm	7,717 \pm 0,9300	6,900 \pm 0,7572
PLT 10 ³ /mm	645,3 \pm 76,35	630.5 \pm 72,75
HGB g/dl	13,18 \pm 0,6400	13,18 \pm 0,1740
MCH pg	15,25 \pm 0,1628	15,53 \pm 0,2445
MCHC g/dL	32,28 \pm 0,8416	30,78 \pm 0,9386

* Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.11.4 Etude des paramètres biochimiques sériques

Les résultats des paramètres biochimiques sériques, d'évaluation des fonctions rénales et hépatiques, sont illustrées dans les figures ci-dessous (Figures 62, 63) et ont révélé aucun changement significatif en comparaison avec les témoins.

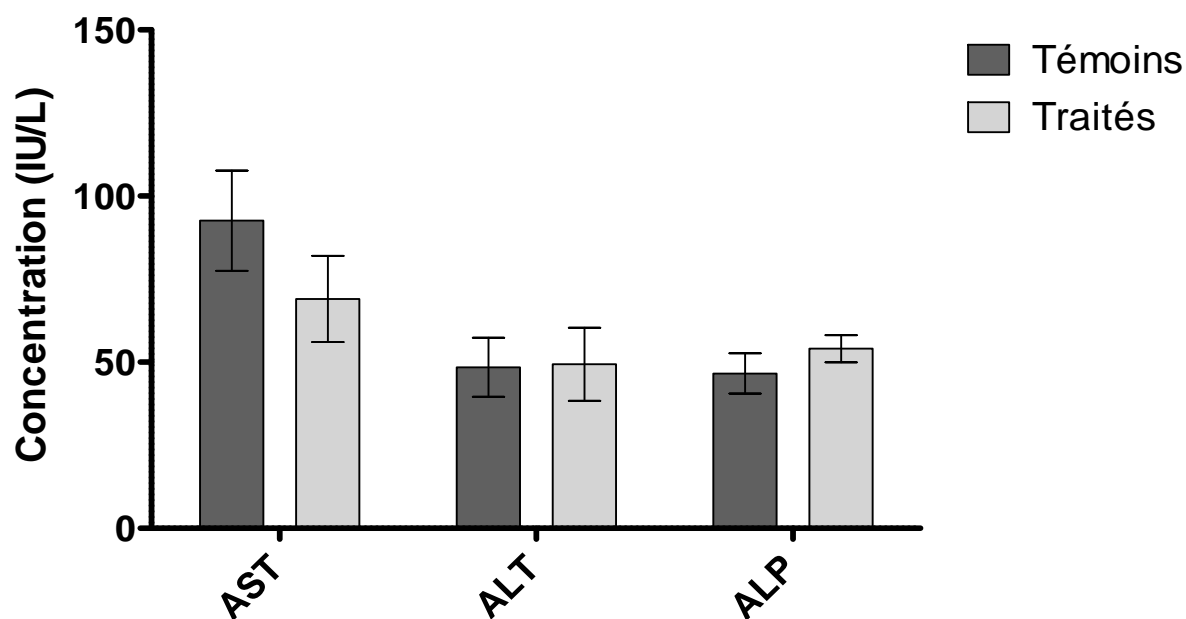


Figure 62 : Effet subaiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL_{50}) sur quelques paramètres biochimiques sériques (AST, ALT, PAL) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

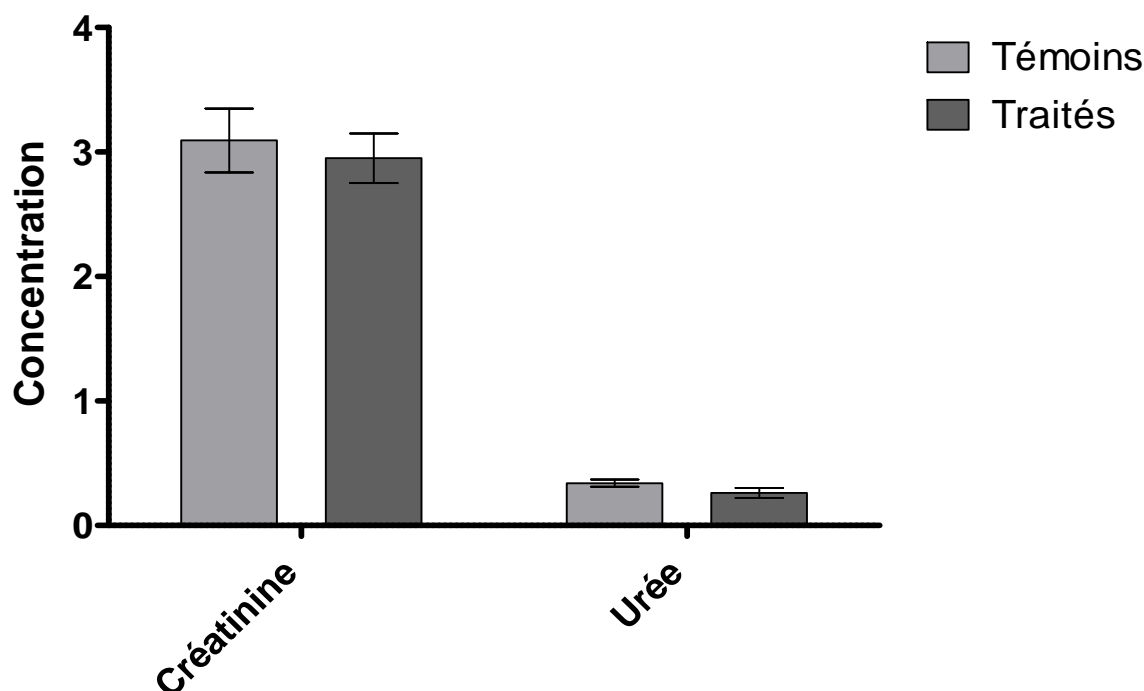


Figure 63 : Effet subaiguë des alcaloïdes totaux *du Peganum harmala* (18 mg/kg \approx 1/20 DL_{50}) sur quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, urée) des souris mâles. Les résultats sont exprimés par moyenne \pm SEM. * Significativement différent pour $p < 0.05$.

III.11.5 Etude histologique

L'observation des coupes histologiques des reins des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* a montré une congestion sanguine du parenchyme rénal en comparaison avec celui du groupe témoins (Figure 64).

Les coupes histologiques du foie, ont permis de constater la conservation de la structure architecturale des lobes hépatiques, néanmoins des congestions sanguines sont observées chez des souris mâles traitées par rapport aux témoins. Les coupes histologiques du cerveau des souris traitées n'ont pas montré de changement dans leurs structures (Figure 64).

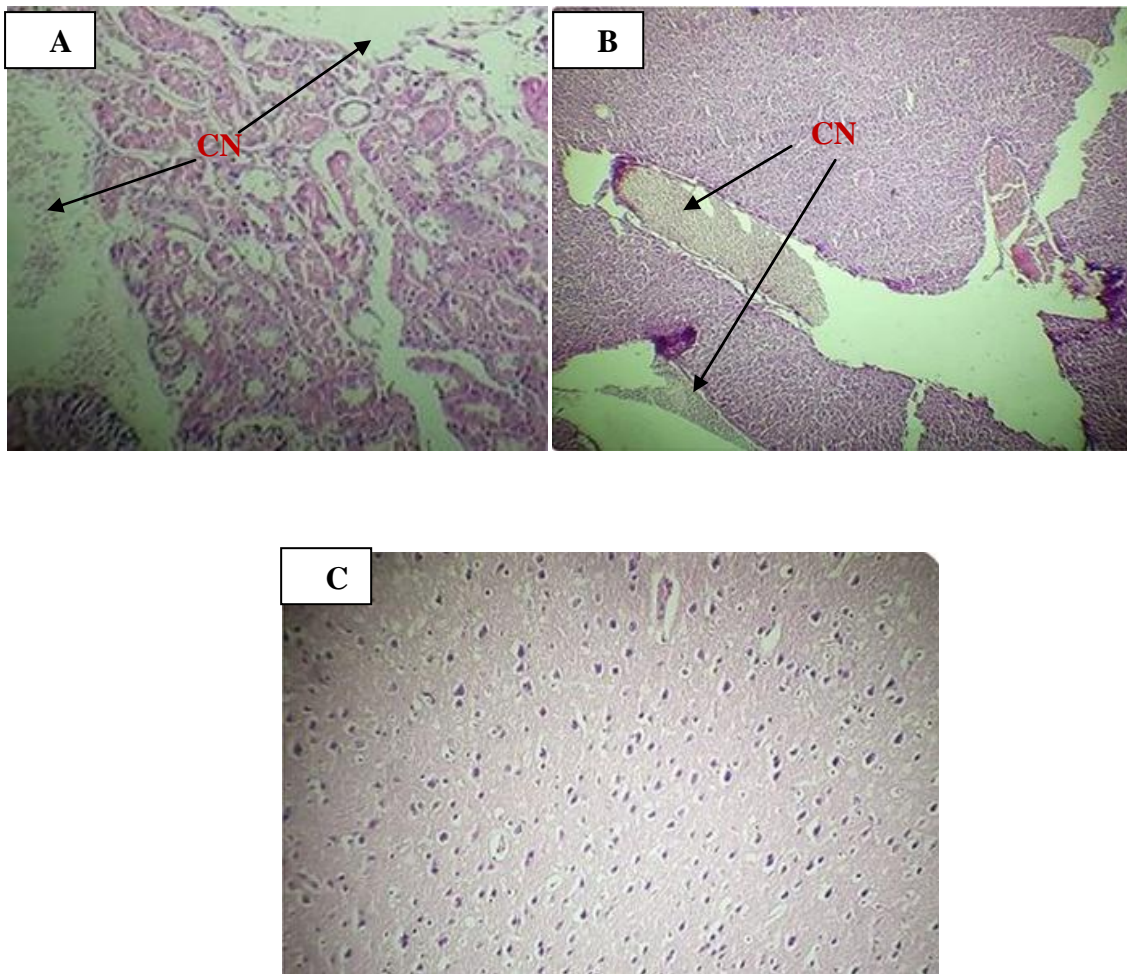


Figure 64 : (A) Coupes histologiques des tissus : (A) des reins (B) du foie, (C) du cerveau des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë avec la dose de 18 mg/kg chez des souris mâles. CN : congestion. Coloration éosine hématoxyline. X40.

IV. Discussion

IV. Discussion

La plante *Peganum harmala* L. utilisée est identifiée sur la base des données descriptives de ses caractéristiques morphologiques selon Chopra *et al* (1960), Maire (1933), Ozanda (1991) et Bruneton (1999). Elle est connue sous les noms de « harmel ». Il est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle à des fins rituelles, magiques, prophylactiques et surtout thérapeutiques (Bellakhdar, 1997 ; Sincich, 2002). Les graines sont depuis longtemps utilisées comme narcotiques, antihelminthiques, antispasmodiques et dans certains cas contre les rhumatismes et l'asthme (Bellakhdar, 1997 ; Siddiqui *et al.*, 1988). La plante est disponible chez tous les herboristes, et elle est présente dans la nature à l'état sauvage. Son utilisation à des fins thérapeutiques n'est pas dépourvue de danger et expose au risque de surdosage et de nombreux cas d'intoxication ont déjà été signalés chez les animaux et les humains (Mahmoudian *et al.*, 2002 ; Achour *et al.*, 2012).

Peganum harmala contient des alcaloïdes de type β -carboline dont les plus importants sont l'harmine, l'harmaline, l'harmol et l'harmalol et quinazolines qui sont responsables des effets toxicologiques et pharmacologiques (Pulpati *et al.*, 2008 ; Beyer *et al.*, 2009; Herraiz *et al.*, 2010).

Deux types d'extraction ont été réalisés, le premier est une extraction par macération dans le méthanol a pour but de préparer les extraits bruts des graines et des feuilles. Les rendements ont été de 13.44% ; 10.52% respectivement pour l'EBG et l'EBF. L'obtention d'un bon rendement de ces extraits peut être expliquée à l'utilisation de méthanol qui 'était un meilleur solvant parce que le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006). Le deuxième est une extraction liquide- liquide des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* qui a permis d'obtenir un extrait de couleur rouge brique avec un rendement 2.11 %. Ce rendement est en accord avec celui obtenu par Mahdeb *et al.* (2013) sur la même espèce.

L'analyse qualitative des extraits bruts des graines et des feuilles, par CCM sur gel de silice, a permis de noter la présence de constituants sous UV et à fluorescences à 366 nm.

La CCM réalisé pour les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs spots, sous UV et à fluorescences à 366 nm. La révélation avec le réactif de Bouchardât, a permis de montrer l'existence de 4 spots correspondants probablement aux alcaloïdes β carboline tels que, harmine, harmaline,

harmalol, harmol, harman, tétrahydroharmine et harmalidine (Mahmoudian *et al.*, 2002 ; Lamchouri *et al.*, 2013) et la présence des alcaloïdes majoritaires correspondant à l'harmine et l'harmaline, dont les spots sont clairement plus importants que les autres. Ce résultat est compatible avec les données bibliographiques de Herraiz *et al.* (2010) qui ont indiqué que l'harmine et l'harmaline s'accumulent dans les graines sèches entre 4,3 à 5,6%, respectivement.

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les feuilles et les graines de *Peganum harmala* en utilisant des solvants différents et des réactifs spécifiques de révélation. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau de la plante comprenant les trois groupes chimiques, les tannins, les alcaloïdes, les stérols et stéroïdes dans les feuilles et les graines de *Peganum harmala*. Ces résultats sont en accord avec le dépistage phytochimique qualitatif sur les graines et les feuilles réalisé par Benbott *et al.* (2013). Dans les feuilles nous avons noté la présence des saponosides avec l'absence des anthocyanines et des coumarines. Cependant, nous notons quelques différences entre nos résultats et ceux obtenus par Behidj-Benyounes *et al.* (2013) qui ont indiqué la présence des anthocyanines et des coumarines dans des feuilles de *Peganum harmala*. Quant aux anthocyanines et coumarines, ils sont présent dans les graines et absent dans les feuilles de *Peganum harmala*. Ce résultat peut être expliqué par l'utilisation de même plante mais appartenant à deux régions géographiques différentes.

Dans des études antérieures, les flavonoïdes jouent un rôle important dans la coloration des végétaux. Ils sont utilisés dans la chimio taxonomie végétale. Ils jouent le rôle des marqueurs de la maturation des fruits (Allilou *et al.* , 2014). La présence des alcaloïdes expliquent l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle et la diversité de leurs activités biologiques. Elle a été employé pendant longtemps pour soulager les douleurs et comme agent antiseptique (Derakhshanfar *et al.*, 2010), antibactérien (Shahverdi *et al.*, 2005), antifongique (Falahati *et al.*, 2011), antiviral, antidiabétique, antitumoral , antileishmanial , insecticide , et cytotoxique (Khademalhosseini *et al.*, 2015). Quant aux terpènes, ils servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques. Selon Mabry et Ulubelen, (1980), les coumarines sont parmi les composés responsables des propriétés anti-inflammatoires. Ce sont des protectrices vasculaires et des anti-œdémateuses. Cette étude a été effectuée à afin de prospecter les différents métabolites secondaires existants dans cette plante caractérisant la région de Bourdj bou Arreridj.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits a été réalisée par deux techniques chimiques (le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer). La méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité (Bortolomeazzi *et al.*, 2007). L'activité antioxydante des différents extraits de *Peganum harmala* envers du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical (Majhenic *et al.*, 2007).

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012; Ranga *et al.*, 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Les résultats obtenus ont révélé une importante activité anti-radicalaire des extraits envers le DPPH. L'EBG présente l'extrait le plus actif 35.83±0.13 µg/ml puis l'EBF et EAT avec d'IC₅₀ de 12.96±0.55 µg/ml et 107.91± 0.3, respectivement. Ce résultat peut être expliqué à la présence des alcaloïdes β-carbolines basée sur l'effet piègeur des radicaux libres par le noyau indolique en produisant un radical indolyl stable (Crespo *et al.*, 2002 ; Moura *et al.*, 2007). La meilleure activité d'EBG peut être probablement lié non seulement aux alcaloïdes mais à la complexité de ce extrait en substances actives comme les tanins, les coumarines, anthocyanes et la synergie entre eux, montre une meilleure activité antioxydante (Vermerris et Nicholson, 2006). Le screening phytochimique réalisée confirme le résultat obtenu. D'un autre coté tous les extraits ont montré en effet, une faible activité inhibitrice, qui est inférieure à celle obtenue par l'antioxydant de référence qui est l'acide ascorbique (IC₅₀=4.24 µg/ml).

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée aussi en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain, 1996). Il est universel, et peut être appliqué pour différents extraits organiques et aqueux (Li *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits (Ozturk *et al.* , 2007 ; Su *et al.* , 2008 ; Liuk *et al.* , 2009). Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celles du produit de référence (acide ascorbique).

L'EBG est généralement le plus actif avec une densité optique maximale de 0,667 nm à la concentration 800µ/ml, suivis de l'EAT et EBF avec des absorbances respectives : 0,5820 nm et 0,304 nm. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec la méthode de piégeage du radical libre DPPH, qui montre qu'EBG possède la meilleure capacité antioxydante.

Le pouvoir réducteur d'une plante est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker., 2007).

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des extraits naturels des plantes.

Tous les extraits testés (EBG, EBF, EAT) semblent avoir une activité sur toutes les souches testées (Gram+ et Gram -) avec des diamètres des zones d'inhibition plus importants (variant entre 26 à 33mm). Selon Biyiti *et al.* (2004), un extrait est considéré comme actif s'il enduit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Ainsi, ces résultats sont en concordance avec les données bibliographiques de Darabpour et ses assistants (2011), Benbott et ses collègues (2012), Akbary *et al* (2015), Mohsenipour et Hassanshahian (2016) qui ont tous révélé une importante activité de différents extraits de *Peganum harmala*.

L'EBG a montré une meilleure activité antibactérienne pour *Bacillus cereus* (33mm). Ces résultats sont en accord avec ceux de Behidj-benyounes *et al.* (2013) qui ont indiqué une action fortement inhibitrice contre les *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Subtilus* qui sont des Gram positifs. Par contre, les bactéries Gram négatifs (*E.coli*) sont moins sensibles à l'effet des extraits de *Peganum harmala*. Ils montrent que l'hypersensibilité de la souche peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram positifs aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels. Et surtout l'absence de la membrane externe qui la rend extrêmement sensible. Selon Essawi et Srour, (2000) l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés. Ce résultat confirme celui de Prashanth et John,(1999); Darabpour *et al.* (2011) qui ont déjà démontré un effet antimicrobien remarquable de l'extrait des graines de *Peganum harmala* sur les bactéries Gram+ comprenant *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria Monocytogènes*, et des Gram - incluant *Pseudomonas Aeruginosa*, *Brucella melitensis*, *Proteus mirabilis*, *S. typhimurium*, *Escherichia coli* et *Klebsiella Pneumoniae*.

On a utilisé les paramètres de CMI et CMB pour l'évaluation du potentiel antibactérien des extraits. Les valeurs de CMI obtenues sont d'ordre de 1.56 à 3.125 mg/ml pour l'EGF et de 1.56 mg/ml pour l'EBG. Edziri *et al.* (2010) ont trouvés des valeurs de CMI d'extrait méthanolique obtenu par macération pendant cinq jours des feuilles de *Peganum harmala* de 2.5 mg/ml à 1.25 mg/ml avec les souches d'*E.coli* et *S.aureus*. Mohsenipour et Hassanshahian (2016) ont trouvé des valeurs de CMI de l'extrait méthanolique des graines

avec les tiges d'ordre de 1.56 mg/ml et 0.39 mg/ml pour *Bacillus aureus*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*.

D'une autre part, Bouabedelli *et al.* (2016) ont signalé qu'elles sont d'ordre de 50 mg/ml pour *E.coli* et *S. aureus* de l'extrait flavonoïdique des feuilles et d'ordre de 3.125 et 50 mg/ml pour les même souches de l'extrait flavonoïdique des graines. Des valeurs différentes de CMI ont été notée, selon Loziene et ses collaborateurs (2005), l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : la partie utilisée de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries.

L'EAT a montré une valeur de CMI d'ordre de 0.78 mg/ml. Ce résultat est en accord avec ceux de Benbott *et al.* (2012).

S'agissant des pouvoirs antibactériens de nos extraits, les résultats enregistrés indiquent que le rapport d'activité CMB/CMI est inférieur ou égal à 4 pour chaque extrait donné. D'après Berche *et al.* (1991), lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance est inférieur ou égal à 4, cette substance est jugée bactéricide tandis qu'elle est dite bactériostatique, si ce rapport est supérieur à 4. Ce résultat affirme que tous les extraits testés sont bactéricides contre les souches bactérienne testées. A l'exception l'EAT et l'EBF semblent avoir respectivement un effet bactériostatique sur *Bacillus aureus* et *S. typhimurium*.

Les champignons et les levures causent de graves pathologies qui touchent l'homme, parmi lesquelles on peut citer les mycotoxicoses (causés par *Aspergillus* et *Fusarium*). Dans notre étude nous sommes testés l'activité antifongique des extraits contre deux champignons : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

Les résultats montrent que l'action des extraits bruts des feuilles et des graines de *Peganum harmala* est plus importante sur *Aspergillus niger* (75,42%) et (55,10%) alors que l'extrait alcaloïdique s'est montrée plus faible (47%) à 200 mg/ml. Des travaux antérieurs de Sarker *et al.* (2005), montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. En plus nos résultats sont en accord avec ceux de Diba *et al.* (2011), qui ont montré un effet plus important de l'extrait alcoolique de *Peganum harmala* sur la sporulation de la levure *candida* et la plupart des espèces de genre *Aspergillus*. Pour les mycéliums fongiques, la croissance peut être réduite ou totalement inhibée (Cristani *et al.*, 2007), dans cette étude aucune inhibition totale est observée. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules ayant de différentes activités biologiques avec un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols (Seidel, 2005).

L'activité antifongique des extraits pour *Fusarium oxysporum* a montré un taux d'inhibition plus important pour l'EAT à 200 mg /ml. Ce dernier a inhibé fortement la croissance mycélienne pour des concentrations décroissantes (100 à 6.25mg /ml). En parallèle, les autres extraits (EBG, EBF) ont montré une activité très distante et modeste contre la même souche en comparaison avec l'extraits alcaloïdique pour les concentrations comprises entre 100 à 6.25mg /ml. Ces résultats est en accords avec ceux obtenues par Nenaah, (2010) qui a évalué l'activité antifongique (*Aspergillus niger* et *Candida albicans*) des alcaloïdes β -carbolines extraits des graines de *Peganum* et des alcaloïdes commerciaux et leurs effets de combinaison. Il a résultats indiqué que l'activité des alcaloïdes est efficace pour les souches fongiques testées lorsqu'ils ont été testés à titre binaire ou totales. Singh *et al.* (2001) ont obtenu des résultats similaires concernant les deux alcaloïdes berbérine et santonine isolé des rhizomes de *Berberis aristata* et des fleurs d'*Artemisia maritima*, respectivement. Ils ont constaté que ces alcaloïdes ont bloqué de manière significative la germination des spores à des différentes concentrations.

Peganum harmala est une plante très utilisée en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles tel que emménagogue, abortif, stérilité féminine, dermatoses (eczémas), brûlures, conjonctivites purulentes, blépharites, et alopécie. (Hammiche et Merad, 1997). Cependant, de nombreuses études publiées ont rapporté des effets toxiques potentiels de cette plante chez l'homme et les animaux (Lamchouri *et al.*, 2002 ; Frison *et al.*, 2008). Il est nécessaire de caractériser les effets de cette plante sur les systèmes biologiques, y compris ses effets toxicologiques.

La carte clinique des souris de deux sexes traités par les alcaloïdes totaux s'est caractérisée par une excitabilité, tremblement, une respiration accélérée, des yeux saillants. Les signes rapportés concordent parfaitement avec ceux décrits dans la littérature par Mahmoudian *et al.* (2002); Lamchouri *et al.* (2002) indiquant que tous les animaux domestiques sont susceptibles d'être empoisonnés par cette plante, les symptômes enregistrés comprennent des troubles digestifs tels que hyper-salivation, vomissements et diarrhée, tandis que les syndromes nerveux sont l'excitabilité, le tremblement, la respiration accélérée, la perte d'agitation de coordination et dans certains cas la paralysie. Ces effets sont expliqués par l'action anticholinergique centrale des alcaloïdes β -carbolines (Hammiche et Merad, 1991). Selon Aarons *et al.* (1977), harmane, harmine et harmaline exercent aussi un blocage direct des récepteurs cérébraux GABA énergiques et donc de leur médiation inhibitrice, produisant un effet stimulant qui serait responsable de l'élévation du tonus musculaire et au maximum de

convulsions. En plus selon, (Tahri *et al.*, 2004) harmaline et harmine sont des antagonistes de la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué dans le mode d'action des hallucinogènes indoliques. La harmaline et la harmine prennent la place de la sérotonine dans les mécanismes enzymatiques en raison de la ressemblance des structures. Ceci serait à la base de l'effet stimulant du système nerveux central.

L'étude de la toxicité aiguë (détermination de la DL₅₀ des alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*) a permis de calculer les valeurs de la DL₅₀ de **363.07** mg/kg et de **372.72** mg/kg chez les souris femelles et de **377.57** mg/kg, **377,48 mg/kg** chez les souris mâles respectivement par la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon et la méthode de probits-Méthode des moindres carrés. Ces résultats sont en concordance avec ceux qui ont été déterminés par Benbott *et al.* (2013) dont les valeurs de DL₅₀ sont estimées à 350 mg/kg et à 328.48 mg/kg respectivement par la méthode de probit (méthode des moindres carrés et méthode de Finney) Au regard des résultats des DL₅₀ ($50 \text{ mg/kg} \leq \text{DL}_{50} \leq 500 \text{ mg/kg}$), les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* sont classés dans la catégorie des produits modérément toxiques selon la classification des produits chimiques de Frank (1992).

Les résultats d'étude de la sensibilité de sexe aux alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* ont montré que les deux courbes des DL₅₀ sont analogues donc l'effet léthal pourrait être identique chez les souris mâles et femelles.

Dans les conditions de la toxicité aiguë des souris traitées (femelles et mâles) par les alcaloïdes totaux des graines *Peganum harmala* avec la dose de 118 mg/kg, et après 24 h et 5^{ème} jours de l'application, aucun signe physique de toxicité, et aucune mortalité n'a été observé en comparaison avec le groupe témoin .

L'examen macroscopique des organes *in situ* (rein, foie, poumons, cerveau, rate, cœur et testicules) des souris de deux sexes traitées par les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala*, n'a révélé aucun changement morphologique en comparaison avec celui des souris témoins.

Dans les études de la toxicité, le poids relatif des organes est un indicateur très important du statut physiologique et pathologique des animaux et pour confirmer si ces organes ont été exposés aux dommages ou pas. Le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les organes les plus affectés par les réactions métaboliques provoquées par les molécules toxiques (Dybing *et al.* , 2002).

La masse relative du cœur et du cerveau des souris femelles traitées indique une augmentation significative après le 1^{er} jour du traitement. On a enregistré aussi une

diminution significative de la masse relative des reins avec toujours une augmentation significative de cerveau respectivement après le 5^{ème} jour du traitement. Aucun changement significatif n'a été signalé dans la masse relative des organes des souris mâles dans les conditions de la toxicité aigue. Selon Xin *et al.* (2016) l'augmentation de la masse relative des organes indique soit une congestion, œdèmes ou hypertrophie, alors qu'une diminution de la masse relative des organes indique l'atrophie des organes et d'autres changements dégénératifs. Les coupes histologiques de tissu cérébrale montrent la présence des œdèmes, ce qui pourrait expliquer l'augmentation significative de la masse relative du cerveau.

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et est un index plus important du statut physiologique et pathologique chez l'homme et les animaux (Kulkarni et Veeranjanyulu, 2012). L'analyse des paramètres sanguins est pertinente pour l'évaluation des risques, puisque tout un changement dans le système hématologique est une excellente valeur prédictive pour la toxicité humaine, lorsque les données sont extrapolées à partir des études sur les animaux (Chandra *et al.*, 2012).

Les paramètres hématologiques ont montré une diminution significative de volume corpusculaire moyen (MCV) avec une augmentation significative de la concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (MCHC) après le 5^{ème} jour du traitement chez les souris femelles traitées, tandis qu'ils n'ont révélé aucun changement notable chez les souris mâles traités dans les mêmes conditions de la toxicité aigue.

Les MCV, MCHC sont des paramètres très importants comme des indexes des GR pour le diagnostic d'anémie (Voigt, 2000). En plus le paramètre MCV fournit des informations sur la taille et le statut des érythrocytes alors que les paramètres MCH et MCHC reflètent la teneur d'hémoglobine des RBCs (Nussey *et al.* , 2006). Cependant la différence non significative dans les paramètres RBC, Hb (le nombre des globules rouges et le taux d'hémoglobine) a suggéré que les alcaloïdes de *Peganum harmala* n'aient pas affecté le taux des RBCs. Par extension ces alcaloïdes n'ont pas d'effet hémolytique direct sur les érythrocytes. D'après les résultats obtenus, on peut déduire que les alcaloïdes totaux n'ont pas d'effet anémique sur le système sanguin.

Le foie est l'organe cible présenté dans les vertébrés et qui joue un rôle principal dans le métabolisme (Thophon *et al.*, 2003). IL est le plus exposé à la toxicité des produits chimiques, surtout lorsqu'ils sont absorbés au niveau de l'intestin grêle. Le foie pourrait métaboliser ces substances étrangères en composés hépatotoxiques (Geubel et Rahier, 2006 ; Rhiouani *et al.*, 2008).

Le suivi des taux des enzymes hépatiques sériques (ALT, AST et ALP) est très important pour détecter des endommagement et des lésions hépatiques (Hor *et al.*, 2012; Gad *et al.*, 2013). Alanine aminotransferase (ALT) est une enzyme cytoplasmique qui se trouve à des concentrations très élevée dans le foie, et une augmentation sérique significative de niveau de cette enzyme suggère des lésions hépatocellulaires. L'aspartate aminotransférase (AST) se trouve dans le cytoplasme et les mitochondries de différents tissus du foie, cœur, muscles, reins et du cerveau (Gad *et al.*, 2013; Ekeanyanwu et Njoku, 2014), tandis que la phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme hydrolase qui se trouve dans toutes cellules du corps, mais elle est significativement plus élevée dans les conduits biliaires, le foie, l'os, le placenta, les reins et l'intestin (Singh *et al.*, 2011).

Une augmentation significative des paramètres biochimiques a été notée en particulier de phosphatase alcaline (PAL) des souris femelles traitées par les alcaloïdes totaux après le 5^{ème} jour du traitement en comparaison avec les témoins. Chez les souris mâles aucun changement significatif d'AST, ALT, PAL n'a été observé. Bien que des niveaux élevés de (PAL) soient associés à des maladies osseuses, il est également un indicateur d'une jaunisse obstructive et d'une cholestasis intra-hépatique (Adebayo *et al.*, 2001) et pourrait aussi signaler une dégénérescence légère dans le foie comme il a été observé dans les coupes histopathologique de la présente étude.

Les alcaloïdes des graines de *Peganum harmala* causent une augmentation significative du taux d'urée après le 5^{ème} jour du traitement avec aucun changement notable du taux de créatinine chez les souris traitées pour les deux sexes.

L'urée est le produit final du métabolisme des protéines, et sa concentration est influencée par le taux d'excrétion, alors que la créatinine est un dérivé du métabolisme de la créatine du muscle squelettique. Elle est librement filtrée par le glomérule, et n'est en théorie ni réabsorbée, ni synthétisée, ni métabolisée dans le rein (Dirk *et al.*, 2010). Il est aussi un marqueur plus précis de la fonction rénale que l'urée et n'importe quelle élévation des niveaux de créatinine indique des dommages marqués à la fonction des néphrons (Saidu *et al.*, 2010). Ce résultat suggère que les alcaloïdes n'ont pas affecté la fonction rénale. L'augmentation significative de l'urée et de la réduction non significative de créatinine chez les souris traitées indique que l'extrait n'a eu aucun effet délétère sur les reins (Olufunsho *et al.*, 2015). Ces résultats biochimiques (augmentation significative d'urée et d'AST) avec une augmentation de la masse relative du cœur et du cerveau chez les souris traités par rapport aux témoins pourraient expliquer l'effet des alcaloïdes sur le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques. Des études ont indiqué que l'effet principal des alcaloïdes β carbolines

s'exerce sur le système nerveux central entraînant un cortège de signes neurologiques et neuromusculaires (Aarons *et al.*, 1977).

Les coupes histologiques des reins des souris traitées dans les conditions de la toxicité aiguë avec la dose (118 mg / kg) n'ont montré aucune destruction de l'architecture chez les deux sexes, cette observation confirme les données biochimiques d'évaluation de la fonction rénale.

L'étude histologique du foie des souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë a révélé la présence d'une surcharge hépatocytaires (ground-glass hepatocyte) qui est caractérisé par un cytoplasme large et homogène des hépatocytes. Selon Bejarano *et al.*, (2006) la surcharge hépatocyttaire pourrait être due à certains types d'hépatite ou à des cas pathologiques comme la maladie de Lafora (myoclonus epilepsy), l'hépatite B, la glycogénose de type IV, la thérapie par aversion à l'alcool, fibrinogénose, le carcinome hépatocellulaire et des changements liés à l'utilisation des drogues. Chez les souris mâles une congestion sanguine hépatique a été notée.

L'existence des œdèmes au cerveau des souris femelles traitées pourrait être due à une perturbation des échanges cellulaires c.-à-d. à un problème de circulation qui pourrait être provoqué par les alcaloïdes ou ces métabolites.

L'étude de la toxicité subaiguë avec des doses répétées a été appliquée dans diverses études a pour but de mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives et de déterminer les organes cibles (Frank, 1992).

La carte clinique s'est caractérisée par une agressivité des souris femelles et mâles traitées à partir de la 2^{ème} semaine jusqu'aux derniers jours d'application. Ces modifications de comportement peuvent être expliquées que ces alcaloïdes qui ont en commun un noyau indole présentant une analogie structurelle avec la molécule de sérotonine connue pour son rôle important dans le fonctionnement du système nerveux central. Il est probable que l'activité hallucinogène, trémogène et modificatrice du comportement de ces substances soit en rapport avec cette structure indolique. Il est noté aussi que harmine et harmaline exercent une action anticholinergique centrale pouvant expliquer la crise d'agitation et les manifestations digestives observées (Aarons *et al.*, 1977). Des études cliniques que précliniques, sur des modèles animaux associés aux comportements agressifs montrent que ces derniers sont associés à un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo- hypophyso-surrénalien en rapport avec des anomalies de divers systèmes de neurotransmission

impliquant notamment les monoamines, le GABA, le glutamate et des neuropeptides, en particulier l'arginine-vasopressine et le CRF. Parmi les monoamines, la sérotonine semble être un acteur clé dans le contrôle de l'impulsivité/agressivité (Hamon *et al.*, 2008).

Le suivi de la variation du poids corporel des souris mâles n'a enregistré aucun changement significatif pendant toute les semaines d'expériences en comparaison avec les témoins (une évolution normale du poids). Le poids corporel des souris femelles a connu une baisse significative à la 2^{ème} semaine puis, il a marqué une récupération pour la 3^{ème} et la dernière semaine. Une diminution ou une augmentation du poids corporel sont liés aux effets toxiques des produits chimiques et des drogues. Cependant, plusieurs chercheurs confirment que ces changements du poids corporel sont accompagnés avec une accumulation des graisses et une réponse d'adaptation physiologique aux extraits des plantes plutôt qu'aux effets toxiques de produits chimiques ou drogues qui mènent à une diminution d'appétit par conséquent, abaisser l'apport calorique par l'animal (Kifayatullah *et al.*, 2015).

La masse relative des organes des souris femelles traitées au cours de l'expérience de la toxicité subaiguë par les alcaloïdes totaux en comparaison avec les témoins a montré une augmentation significative de la masse relative du cerveau. Ce résultat est en accord avec celle qui a été signalé dans l'étude de la toxicité aiguë et on a expliqué cette observation par la présence des œdèmes. L'existence des œdèmes péri-vasculaires dans les groupes traités pourrait être due à une perturbation des échanges cellulaires c.-à-d à un problème de circulation qui pourrait être provoqué par les alcaloïdes ou ces métabolites. Cependant la masse relative des organes des souris mâles a montré une augmentation significative des reins, du poumon, du cœur et de la rate. Alors que, le foie, le cerveau et les testicules n'ont montré aucun changement notable. Selon Xin *et al.* (2016) l'augmentation de la masse relative des organes indique soit une congestion, œdèmes ou hypertrophie, alors qu'une diminution de la masse relative des organes indique l'atrophie des organes et d'autres changements dégénératifs.

L'étude des paramètres hématologiques chez les souris femelles et mâles traitées par les d'alcaloïdes totaux de *Peganum harmala* n'a montré aucun changement significatif en comparaison avec les témoins, suggérant que les alcaloïdes ne sont pas toxiques pour le système sanguin. Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Muhi-eldeen et ses collaborateurs en 2008 qui ont été évalué la toxicité des alcaloïdes totaux de même plante chez des rats par administration intramusculaire à

l'exception une augmentation significative du nombre de WBC a été observé cela est dus à la réponse inflammatoire locale dans les muscles à l'emplacement de l'injection.

Les paramètres biochimiques ont montré une augmentation significative d'ALT et AST des souris femelles traitées par rapport aux témoins. Il est évident que le signe des dommages hépatiques est la fuite d'enzyme cellulaire dans le plasma. Quand la membrane plasmatique des hépatocytes est endommagée, une variété d'enzymes normalement situés dans le cytosol est libérée dans le sang, leurs évaluation dans le sérum est un marqueur utile pour l'ampleur et le type de dommages hépatocellulaires (Kumar *et al.*, 2004). Tandis que ces paramètres n'ont montré aucun changement significatif chez les souris mâles traités dans les mêmes conditions de la toxicité subaiguë.

Le dysfonctionnement rénal peut être évalué par des mesures simultanées de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique et leurs niveaux normaux reflètent une probabilité réduite de problèmes rénaux (Palm et Lundblad, 2005). Dans la présente étude, aucun changement significatif n'a été observé des taux sérique d'urée et de la créatinine chez les souris (les deux sexes) suggère que les alcaloïdes n'affecte pas la fonction rénale dans les conditions de la toxicité subaiguë.

Les coupes histologiques du foie et des reins des souris traitées des deux sexes ont montré une congestion du parenchyme rénal dans les conditions de la toxicité subaiguë par alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* ce qui explique l'augmentation significative de la masse relative des reins du groupes traités des souris mâles en comparaison avec les témoins. Alors que les coupes réalisées sur le tissu cérébral chez les souris traitées dans les mêmes conditions n'ont montré aucun changement notable dans les deux sexes.

Malgré que cette plante soit administrée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle due à sa richesse en nombreuses substances chimiques qui montrent diverses activités pharmacologiques. Son emploi à des fins thérapeutiques expose au risque de surdosage et d'intoxication conduisant parfois à une issue fatale.

Conclusion

D'après la recherche bibliographique, la plante *Peganum harmala*, appartient à la famille de zygophyllacées, est l'une des plantes la plus importante dans la flore algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des tanins, des alcaloïdes, des stérols et triterpènes dans les feuilles et les graines de la plante ainsi que la présence des anthocyanes et les coumarines que dans les graines et des saponosides dans les feuilles .

Les métabolites secondaires sont à l'origine des effets pharmacologiques intéressants pour cela différentes activités biologiques ; antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de différents extraits de *Peganum harmala* ont été examinées, permettant de justifier et de confirmer les indications thérapeutiques traditionnelles. Ces activités importantes mais variables sont en relation avec la composition structurale des différents constituants qu'ils contiennent.

Dans les conditions de la toxicité aiguë par les alcaloïdes totaux des graines de *Peganum harmala* des symptômes de toxicité sont enregistré : excitabilité, accélération du rythme cardiaque, des convulsions, des tremblements, arrivant jusqu'à la mort. Ces effets dus à l'action directe des alcaloïdes sur le système nerveux central.

Toutefois la toxicité aiguë et subaiguë montrent que ces alcaloïdes agissent sur la masse relative des quelques organes, et perturbent aussi quelques paramètres hématologiques et biochimiques liés à la fonction hépatique et rénale surtout chez les souris femelles. L'observation histologique s'est caractérisée par des altérations hépatiques (surcharge hépatocytaires, congestion sanguine) et rénales (congestion sanguine).

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être approfondis par des études suivantes:

- L'isolement, caractérisation et l'identification des composés actifs par des méthodes spécifiques.
- Une étude de la toxicité chronique de cette plante étudiée est indispensable afin de déterminer leurs effets toxiques dans une longue durée.
- Etude d'autres activités biologiques antalgiques, anti-inflammatoire, cytotoxicité...

Références bibliographiques

- Aarons DH, Rossi GV, Orzechowski RF.** 1977. Cardiovascular actions of three harmala alkaloids: Harmine, harmaline, and harmalol. *J. Pharm. Sci* 66:1244–8.
- Abdulmajed K, McGuigan C, Heard CM.** 2005. Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free. Radic. Res* 39: 491-498.
- Achour S, Aadi H , Turcnt A, Banani A, Mokhtari A, Soulaymani A, Soulaymani Bencheikh R.** 2012 Intoxication au Peganum harmala L. et grossesse : deux observations marocaines. Peganum harmala L. poisoning and pregnancy: two cases in Morocco. *Med. Sante . Trop* 22 : 84-86.
- Adebayo AH, Abolaji AO, Opatá TK, Adegbenro, IK.** 2010. Effects of Ethanolic Leaf Extract of Chrysophyllum albidum G. on Biochemical and Haematological Parameters of Albino Wistar Rats. *Afr. J. Biotech* 9(14):2145-50.
- Adrian J, Frangne R.** 1991. La science Alimentaire de A à Z, Ed Lavoisier, Paris.
- Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Anwar S, Basir A.** 2012. DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (Silybum marianum L.). *Toxicol. Ind. Health* 28: 83–89.
- Akbary P, Fereidouni M S , Akhlaghi M.** 2015. In vitro antibacterial activity of *Peganum harmala* (L) extract to some fish pathogenic bacteria. *Iran. J. Aquatic. Anim. Health* 1(1) 7-16.
- Akhtar MS, Iqbal Z, Khan MN, Lateef M.** 2000. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo±Pakistan subcontinent. *Small. Rumin . Res* 38:99–107.
- Alilou H, Bouchaib B, Hassani LM I, Barka N.** 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d’*Asteriscus graveolens* subsp. *Odorus. Afr. sci* 10(3) :316 – 328.
- Amar MB, Louis L .**2002. Les psychotropes: pharmacologie et toxicomanie. PUM, 920 p.
- Antov G, Zaikov C, Bouzidi A, Mitova S, Michaelova A, Halkova J, Choumkov N.** 1991. Biochemical and histological changes after acute oral poisoning with the acetanilide herbicide acetochlor. *J. toxico. Clini. Expér.* 11: 349-356.
- Aqel M, Hadidi M.** 1991. Direct relaxant effect of *Peganum harmala* seed extract on smooth muscles of rabbit and guinea pig. *Pharm. Biol* 29:176–82.
- Arab Radhia.** 2008. Effet insecticide des plantes melia azedarach l. et *Peganum Harmala* L. sue l’insecticide des céréales stochées tribolium castaneum herbest (coleoptera, tenebrionidae). mémoire, option de valorisation des ressources végétales, universite Ferhat Abbas-Sétif. Pp: 20-22, 33-37.
- Asgarpanah J, Ramezanloo F.** 2012. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 6:1573-1580.
- Asghari G, Saidfar G, Mahmudi S.** 2004. Biotransformation of aromatic aldehydes by cell cultures of *Peganum harmala* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Iran. J. Pharm. Res* 2: 127-130.

- Astulla A, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Ekasari W, Widyawaruyanti A, et al.** 2008. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *J. Nat. Med* 62:470–2.
- Aude LF.** 2017. L'Ayahuasca : usages traditionnels, pratiques modernes et perspectives thérapeutiques d'une boisson hallucinogène. Thèse d'exercice / université de rennes 1 *sous le sceau de l'Université Bretagne Loire* Thèse en vue du diplôme d'état de docteur en pharmacie.
- Baudin B.** 2017. Exploration biochimique du foie en 2017. 2017. *Revue francophone des laboratoires*, N°490, 25-33 p.
- Baytop T.** 1999. Herbal treatments in Turkey, (Past and Present) 2. Baski, [Tükiye'de Bitkilerle Tedavi (Gecmiste ve Bugün)] Nobel Tip Kitapevleri Ltd. Sti., Istanbul Turkey, (In Turkish). 35-90
- Beaudeau J L, Durand G.** 2011. Biochimie médicale. Marqueurs actuels et perspectives, 2^{ème} Ed lavoisier msp.
- Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E.** 1991. Role of uric acid as and endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest* 100 (3):176S-181S.
- Behera J.N, Rao J.** 2006. A Ni²⁺ (S = 1) Kagome Compound Templated by 1,8-Diazacubane *Ameri. Chem. Society* 128 (29):9334 -9335.
- Behidj-Benyounes N, Dahmane T, Aknouche F, Demmouche K.** 2013. Screening phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* récoltées dans la région de M'sila. *Sci et Techno* 38 : 27-37.
- Bejarano PA, Monica T G, Maria M R, Phillip R, Andreas GT.** 2006. Liver glycogen bodies: ground-glass hepatocytes in transplanted patients. *Virchows Arch* 449:539–545.
- Bellakhdar J.** 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Saint Etienne, 764 p.
- Benbott A, Yahyia A, Belaidi A.** 2012. Assessment of the antibacterial activity of crude alkaloids extracted from seeds and roots of the plant *Peganum harmala* L. *J. Nat. Prod. Plant. Resour* 2 (5):568-573.
- Benbott L, Bahri L, Boubendir A, Yahia A.** 2013. Study of the chemical components of *Peganum harmala* and evaluation of acute toxicity of alkaloids extracted in the Wistar albino mice. *J. Mater. Environ. Sci* 4 (4):558-565.
- Benzie IFF, Strain JJ.** 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Anal. Biochem* 239:70–76.
- Berche P, Gaillard JL, Simonet M.** 1991. Les bactéries des infections humaines. Ed Flammarion, Médecine et Sciences, 660 p.
- Bernard L.** 2013. Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue francophone des laboratoires* 451 : 25-37.
- Berthélémy S.** 2015. Le bilan rénal. Actualités pharmaceutiques. n° 549, Biologie fiche Elsevier Masson SAS, 55-58 p.

- Bertholle F, Bibette J.** 2010. Milli-fluidique digitale pour la microbiologie. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie UPMC, Paris VI.
- Beyer J, Drummer OH, Maurer H H.** 2009. Analysis of toxic alkaloids in body samples. *Forensic Sci Int* 185: 1-9.
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M.** 2005. Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India. Ch. 4, 237 p.
- Bismuth C, Baud F, Fréjaville PP, Garnier R.** 1987. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris pp:956.
- Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzc V, Amvam ZPH.** 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr* 13 :11-20.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A.** 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes. Metab* 10:33–50
- Bortolomeazzi R, Sebastianutto N, Toniolo R, Pizzariello A.** 2007. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food. Chem* 100: 1481-1489.
- Bouabedelli F, Missoun F, Benhamimed E, Djebli N.** 2016. Phytochemical and antimicrobial study of the seeds and leaves of *Peganum harmala* L. against urinary tract infection pathogens. *Asian. Pac. J. Trop. Dis* 6 (10): 822-826.
- Boullard B.** 2001. Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris, ESTEM, 636 p.
- Bruneton J.** 1993. Pharmacognosie et Phytochimie des Plantes médicinales. 2^{ème} Ed Lavoisier paris.
- Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed Lavoisier Paris, 199-388 p.
- Butura A.** 2008. Drug and alcohol induced hepatotoxicity. Stockholm, Sweden. ISBN 978 - 91 -7409 -055-0.
- CASFM: Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Recommandations. 2012. Consulter le 17/06/2013 sur: <http://www.sfm-microbiologie.org/>
- Chandra P, Sachan N, Kishore K, Ghosh AK.** 2012. Acute, sub-chronic oral toxicity studies and evaluation of antiulcer activity of Sooktyn in experimental animals. *J. Adv. Pharm. Technol. Res* 3(2):177-123.
- Cheeseman KH, Slater TF.** 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull* 49: 481-493.
- Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, et al.** 2005 Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *Int. J. Cancer* 114:675–82.
- Chopra C, Abrol BK, Handa KL.** 1960. Les plantes médicinales des régions arides. Recherche sur les zones arides. Ed UNESCO, Rome ,97p.

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

Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli ., Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food. Chem* 55: 6300–6308.

Cronin RE, Henrich WL. 2005. Toxic Nephropathies, in Hillal G, Albert C, Vallee M..Mecanismes impliqués dans la néphrotoxicité. *Ann. Biol. Clin. Quebec* 42 (3):29.

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. J* 10: 252-263.

De Smet PAGM. 1993. An introduction to herbal pharmacoepidemiology. *J. Ethnopharmacol* 38:197–208.

Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. 1971. Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N8).

Deepali P, Supriya K, Neeta B, Meena K, Aditi M, Yashwant I, Varsha D. 2013. Antioxydant defence system. *OMP. J* 4(1):309-315.

Delattre J., Beaudoux J L., Bonnefont R. 2005. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Ed Lavoisier, Paris, 587p.

Delignette-muller M.L. 1992. Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes, Thèse de doctorat, p 118-15.

Derakhshanfar A, Oloumi MM, Mirzaie M. 2010. Study on the effect of *Peganum harmala* extract on experimental skin wound healing in rat: pathological and biomechanical findings. *Comp. Clin. Pathol* 19(2): 169-172.

Dewick PM. 2002. Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach. 2nd Ed, John Wiley & Sons Ltd, 346 p.

Diba K, Gerami Shoar M, Shabatkhoori M, Khorshivand Z. 2011. Anti fungal activity of alcoholic extract of *Peganum harmala* seeds. *J. Med. Plants. Res* 5(23): 5550-5554.

Dirk PB, Yolanda BR , Wim C H, Karlien C, Eiske MD. 2010. Reference values for serum creatinine in children younger than 1 year of age. *J. Pediatr. Nephrol* 25: 2107–2113.

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

Dulger B, Gonuz A. 2004. Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan J biology sci* 7 (9):1559-1562.

Dussol B. 2011. Méthodes d'exploration de la fonction rénale : intérêt et limites des formules permettant d'estimer la fonction rénale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 26, 6-12 p.

- Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J.** 2002. Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food. Chem. Toxicol* 42: 237-282.
- Edziri H, Mastouri M, Matieu M, Zine M, Gutman L, Aouni.** 2010. Biological activities of *Peganum harmala* leaves. *Afr. J. Biotechnol* 9(48):8199-8205.
- Ekeanyanwu RC, Njoku OU.** 2014. Acute and subacute oral toxicity study on the flavonoid rich fraction of *Monodora tenuifolia* seed in albino rats. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed* 4(3):194-202.
- El Bahri, L, Chemli, R.** 1991. *Peganum harmala* L. A poisonous plant of North Africa. *Vet. Hum. Toxicol* 33: 276-277.
- El Gendy MA, El-Kadi AO.** 2013. *Peganum harmala* L. Differentially modulates cytochrome P450 gene expression in human hepatoma HepG2 cells. *Drug. Metab. Lett* 3:212–6.
- Epifano F, Genovese S, Menghini L, Curini M.** 2007. Chemistry and pharmacology of oxy prenylated secondary plant metabolites. *Rev. Phytochem* 68: 939 -953.
- Essawi T, Srour M.** 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* 70: 343-349.
- Falahati M, Fateh R, Kiani J.** 2011. Evaluation of antifungal effects of *Peganum harmala*. *Qom. Univ. Med. Sci J* 5: 14-17.
- Fan ZR, Yao XS.** 1992. Studies on the constituents and pharmacological effects of *Peganum*. *J. Shenyang. Coll. Pharm* 9, 144-151.
- Fandohan P, Gbenou J, Gnonlofin B.** 2004. Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food. Chem* 52: 6824-6829.
- Farzin D, Mansouri N.** 2006. Antidepressant-like effect of harmaline and other beta-carbolines in the mouse forced swim test. *Eur. Neuro. Psycho. pharmacol* 16:324–8.
- Favier A.** 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr* 64 : 390-396.
- Fendri C, Mechri A, Khiari G, Othman A, Kerkeni A, Gaha L.** 2006. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie : rev littérature. *L'Encéphale* 32: 244-52.
- Finaud J, Lac G, Filaire E.** 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports. Med* 36: 327-358.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ.** 2009. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic. Med* 8: 1-25.
- Franck C L.** 1992. Toxicologie donnees generales, procedures d'evaluation, organes cibles, evaluation du risque.(ed.). Masson pp: 177, 179
- Frison G, Favretto D, Zancanaro F, Fazzin G, Ferrara SD.** 2008. A case of β -carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic. Sci. Int* 179, e37–e43.

- Gad MME, Mohammad YS, Mohammad TGM.** 2013. Acute and repeated-doses (28 Days) toxicity of Thymol formulation in male albino rats. *Aust. J. Basic. Appl. Sci* 7(10): 594-601.
- Georgieva S, Boyadzhiev L, Angelov G.** 2010. Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Rev. gen. industriel* (5):124-132.
- Geubel AP, Rahier P.** 2006. Toxicité hépatique des médicaments : le point de vue du clinicien..., et du pathologiste. *Act. Endoscop* 36(3):315-323.
- Gilbert J, Hamide Z, Şenyuva, Herraiz T.** 2017. Bioactive compounds in foods. Wiley-Blackwell, 432 p.
- González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H.** 2010. Beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food. Chem. Toxicol* 48:839-45.
- Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C.** 2012. Physiologie rénale. *Bull. Cancer* 99 (3) :237-249 p.
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C.** 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact* 168:66-73.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne OJ, Charlier C, Chapelle JP.** 2007. Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege* 62 (10): 628-638
- Hamden K, Carreau S, Ayadi F, Masmoudi H, El Feki A.** 2009. Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepato-toxicity in aged rats. *Biomed. Environ. Sci* 22:381-7.
- Hammiche V, Merad R, Azzouz M.** 2013. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Paris, Springer, 447P.
- Hammiche V, Merad R.** 1997. *Peganum harmala* L. Laboratoire de botanique médicale, INESSM d'Alger. Ed MO Rambourg Schepens.
- Hamon M, Bourgoin S, Martin P.** 2008. Neurobiologie de l'impulsivité, de l'agressivité et de la violence. *La lettre du psychiatre* 4 (3-4) :91-102.
- Hamsa TP, Kuttan G.** 2010. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol* 649: 64-73.
- Hartmann T.** 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochem* 68 :2831-2846.
- Hartmann A, Niess AM.** 2000. Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Amsterdam: Elsevier; 195-217 p.
- Herraiz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán, V. J, Guillén H.** 2010. Beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food. Chem. Toxicol* 48(3): 839-45.
- Hesse, M.** 2002. Alkaloids – Nature's Curse or Blessing, VHCA, Zürich.

- Hmamouchi M.** 1998. Bibliographic research in the countries of the Maghreb. *Part II Medusa Newsletter* 2:7–12.
- Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Yam, MF, Hashim AK, Lim CP, Sadikun A, Asmawi MZ.** 2012. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): Acute and subchronic toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharm* 63(1): 106-114.
- Horn F, Lindenmeier G, Grillhosl C, Moc I, Berghold S, Schneider N, Munster B.** 2005. Biochimie humaine. (ed.). Médecine-sciences. Flammarion Pp: 512.
- Hua S, Xiaoli H, Yuanming Z, Chi Z.** 2013. Main Alkaloids of *Peganum harmala* L. and Their Different Effects on Dicot and Monocot Crops. *Molecules* 18 :2623-2634.
- Hubert J.** 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour de Doctorat à l'institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.
- Iserin P.** 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres, 143, 225, 226 p.
- Jinous A, Fereshteh R.L.** 2012. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afri. Pharma. Pharmacology* 6(22) :1573-1580.
- Kanoun K.** 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister en Biologie. universite aboubekr belkaid tlemcen. 30-48 p.
- Khademalhosseini AA, Tabatabaei A, Akbari P, Fereidouni MS, Akhlaghi M.** 2015. Comparison of *in vivo* antiseptic and *in vitro* antimicrobial effects of *Peganum harmala* L. seeds ethanolic extract with Betadine. *J. Coast. Life. Med* 3:70-77.
- Kifayatullah M, Mohd S M, Pinaki S, Moklesur MRS, Arindam D, Sreemoy KD.** 2015. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *J. Acute. Dis* 4(4): 309–315
- Kirschvink N, De Moffarts B, Lekeux P.** 2008. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet. J* 177: 178–191.
- Koehlin-Ramonatxo C.** 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutri. clin. métab* 20: 165-177.
- Koniaris L.G., McKillop I.H., Schwartz SI, Zimmers TA.** 2003. Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg* 197:634- 659.
- Kubab N, Hakawati I, Alajati-Kubab S.** 2006. Guide des examens biologiques. Collection Les Fondamentaux. 4e édition. Rueil-Malmaison: Lamarre
- Kulkarni YA, Veeranjanyulu A.** 2012. Toxicological Evaluation of the Methanol Extract of *Gmelina arborea* Roxb. Bark in Mice and Rats. *Toxicol. Int* 19(2):125-31.
- Kumar G, Sharmila B, Vanitha PP, Sundararajan M, Rajasekara PM.** 2004. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *J. ethnopharmac* 92: 37-40.

- Laliberte J, Labbe S.** 2008. The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast. *Med. Sci* 24(3): 277-283.
- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, El Hamidi M, Tligui N, Lyoussi B, Hassar M.** 2002. Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds. *Ann. Pharm. Fr* 60, 123–129.
- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Hassar M, Zemzami M, Arif N, Nadori EB, Zaid A, Lyoussi B.** 2000. *In vitro* cell toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell lines. *Fitoterapia* 71: 50-54.
- Lamchouri F, Zemzami M, Jossang A, Abdellatif A, Israili ZH, Lyoussi B.** 2013. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. *Pak. J. Pharm. Sci* 26 (4):699-706.
- Lamers WH, Geerts WJ, Jonker A, Verbeek FJ, Wagenaar G.T., Moorman A.F.** 1997. Quantitative graphical description of portocentral gradients in hepatic gene expression by image analysis. *Hepatology* 26:398-406.
- Landis GN, Tower J.** 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Aging. Dev* 126: 365–379.
- Lebham.** 2005. Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Université de Bretagne Occidentale (UBO). P65
- LeBlanc GA.** 2010. Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th Ed John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 125-236 p.
- Lemaoui CE, Layaida H, Badi A, Foudi N.** 2017. Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *J. Anttianf* . xxx : xxx-xxx.
- Leporatti M, Ghedira k.** 2009. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J. Ethnobiol ethnomed* 5-31.
- Leriverend H, Annaix V, Faure S.** 2016. La fonction rénale, une donnée essentielle. Actualités pharmaceutiques. Elsevier Masson SAS, n° 557, 20- 22 p.
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Feng C.** 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensm Wiss Technol* 41(3):385–390.
- Li YK.** 2005. Study on the chemical constituents of above ground of *Peganum harmala* L. Master Dissertation. Northwest Agriculture Forestry University, Shanxi.
- Lichfield JT, Wilcoxon FA.** 1949. A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 96:99-113.
- Liuk, L, Sun, Y, Laura, T, Liang, X, Ye, H, Zeng, X.** 2009. Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J.Tseng. *Food. Chem* 112: 35-4.
- Lorand L, Loux N, Allain JE, Di Rico V, Weber A, Franco D, Capron F, Vons C.** 2000. Effet de la ligature portale partielle sur la régénération hépatique chez le rat. *Ann Chir* 125 : 144–8.

- Loziene K, Venskutonis PR.** 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol* 33:517-525.
- Ma ZZ, Hano Y, Qiu F.** 2007. Triterpenoids from *Peganum nigellastrum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res* 9, 575-578.
- Mabry TJ, Ulubelen A.** 1980. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem* 28(1980)188 : 196.
- Mahdeb N, Mayouf S, Boukhari F, Souilah S and Bouzidi A.** 2013. Hemolytic effect of total alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* *in vitro* on erythrocytes of ruminants: Sheep, cattle and goats. *Asian. J. Plant. Sci. Res* 3(6): 53-59.
- Mahmoudian M, Jalipour H, Dardashti, PS.** 2002. Toxicity of *Peganum harmala*: review and a case report. *Iran. J. Pharmacol. Ther* 1, 1-4.
- Maire R.** 1993. Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord, n°3, Mission du Hoggar II, Alger, 361 p.
- Majhenic L, Kerget MS, Knez Z.** 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food. Chem* 104:1258-1268.
- Malecky M.** 2005. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech, 9- 13-19, 20, 27p.
- Mansouri A, Guendez E, Kokkalou E, Kefalas P.** 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*) . *Food. Chem* 89: 411- 420.
- Mars Brigitte,** 2009. The Desktop Guide to Herbal Medicine. Publisher ReadHowYouWant, 492 p.
- Mazandarani M, Koushan SS, Behzad B, Vahid K.** 2012. Autecology, Phytochemical and Antioxidant Activity of *Peganum harmala* L. Seed Extract in North of Iran (Tash Mountains). *J. Med. Plants. By-products* 2: 151-156.
- McKenna DJ, Towers GHN, Abbott F.** 1984. Monoamine oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and b-carboline constituents of ayahuasca. *J. Ethnopharmacol* 10 : 195–223.
- Meinguet C, Wouters J.** 2015. Les dérivés de l'harmine, nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses : de la conception aux études *in vivo*. *Chimie nouvelle* 120 : 26-30.
- Michel-Briand Y.** 1986. Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques. Collections de Biologie moléculaire. EdMasson, 370 p.
- Milane H.** 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
- Mina CN, Mohammad H F, Gholamreza.** 2015. Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *J. Tradit. Chin. Med* 35(1): 104-109.

- Moffarts De B, Kirschvink N, Pincemail J, Lekeux P.** 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vet* 149:1-9
- Mohsenipour Z, Hassanshahian M.** 2016. Antibacterial activity of Espan (Peganum harmala) alcoholic extracts against six pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. *Int. Res. J. Biol. Sci* 4(16):109–20.
- Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Hossein A M, Shayegh J.** 2013. Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacogn. Rev* 7(14): 199–212.
- Moslen MT.** 1994. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D. (Eds), Free radicals in diagnostic medicine: a systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. Ed Plenum Press, New York, 17-26 p.
- 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.
- Muhi-eldeen Z, Kassim J A, Tawfik M A, Elham N A, Ali M A, Hassan I.** 2008. Acute Toxicological Studies on the Extract of Iraqi Peganum Harmala in Rats. *Eur. J. Sci. Res* 22 (4): 494-500.
- Nenaah G.** 2010. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia* 81:779–82.
- Newman DJ, Price CP.** 2005. Renal Function and Nitrogen Metabolites dans Hilal G, Albert C, Vallee M. 2005. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité. *Ann. Biol. Clin. Québec* 42(3) :29.
- Nussey GJ, Van Vuren JHJ, Du Preez HH.** 1995. Effects of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambicus tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol* 111:369-380.
- Olufunsho A, Kennedy I A, John A, Majeti NVP.** 2015. Toxicological evaluations of the aqueous stem bark extract of *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae) in rodents. *Interdiscip. Toxicol* 8(2): 89–98.
- Oyaizu, M.** 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan. J. Nutr* 44: 307-315.
- Ozenda P.** 1991. Flore et végétation du Sahara 3^{ème} édition, augmentée. Ed CNRS, Paris, 662 p.
- Ozturk M, Aydogmus-Ozturk F, Duru M E, Topcu G.** 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food. Chem* 106:1264-1270.
- Palm, M, Lundblad A.** 2005. Creatinine concentration in plasma from dog, rat, and mouse: A comparison of 3 different methods. *Vet. Clin. Pathol* 34: 232–236.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C.** 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six

distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food. Chem* 50: 6882–90.

Parekh J, Chanda SV. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turk. J. biology* 31 : 53-58.

Paris R, Moysse H. 1969. Précis de matière médicinale. Ed Masson Paris .

Parsons WT, Cuthbertson EG. 1992. Noxious Weeds of Australia. Ed Inkata Press, Melbourne, 692p.

Pelmont. 2005. Bactéries pour les Technologies de l'environnement. EDP Sciences, 706-726 p.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev Génie Industr* 4: 26-39.

Prashanth D, John S. 1999. Antibacterial activity of Peganum harmala. *Fitoterapia* 70(4): 438-439.

Pulpati H, Biradar YS, Raiani M. 2008. High performance thin layer chromatography densitometric method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine, and vasicinone in *Peganum harmala*. *J. AOAC. Int* 91: 1179-1185.

Qurat UA. 2013. Isolation, Characterization and Pharmacological screening of major ingredients from a medicinally important plant, *Peganum harmala*. Master of philosophy in chemistry. University of Kashmir Srinagar. Indiapp: 36 p .

Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 Vol, CNRS, Paris, 1170p.

Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants; *Phytochem. Anal* 2: 199-203.

Rahman I, Morrison D, Donaldson K, Macnee W. 1996. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med* 154:1055-1060.

Randerath K. 1971. *Chromatographie sur couches minces*. Ed Gauthier-Villars, Paris, 337-339 p.

Ranga RR, Tiwari AK, Prabhakar RP, Suresh BK, Ali AZ, Madhusudana K, Madhusudana RJ. 2009. New furanoflavanoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem* 17: 5170-5175.

Rharrabe K, Bakrim A, Ghailani N, Sayah F. 2007. Bioinsecticidal effect of harmaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera Pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol* 89:137-45.

Rhiouania H, El-Hilalya J, Zafar H I, Badiia L. 2008. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J. Ethnopharmacol* 118:378–386.

- Richet G.** 1988. Nephrologie.(ed.). Ellipses/ Aupelf , 361 p.
- Rizk AM.** 1982. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia* 52 (2): 35-42.
- Roché C.**1991. African rue (*Peganum harmala* L.). In Weeds, A Pacific Northwest Extension Publication, Washington State University Cooperative Extension, Oregon State University Extension Service, University of Idaho Cooperative Extension System, USDA, PNW369.
- Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ.** 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food. control* 19: 681-687.
- Saadabi AM.** 2006. Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine. *Asian J Plant Sci* 5:907–9.
- Sadasivam S, Thayumanavan B.** 2003. Molecular host plant resistance to pests. Books in soils, plants and the environment. *CRC Press*, 221 p.
- Saeed SA, Farnaz S, Simjee RU, Malik A.**1993. Triterpenes and B-sitosterol from piper betle: Isolation, antiplatelet and anti-inflammatory effects. *Biochem. Soc. Trans* 21:462S.
- Saidu Y; Nwachukwu F C; Bilbis LS; Faruk UZ; Ab bas AY.** 2010. Toxicity Studies of the Crude Aqueous Root Extract of *Albizia chevalieri* Harms in Albino Rats. *Nig. J. Basic. Appl. Sci* 18(2): 308-314.
- Salah NB, Amamou M, Jerbi Z, Salah FB, Yacoub M.** 1986. Un cas de surdosage en *Peganum harmala* L. *J. Toxicol. Clin. Exp* 6:319-322.
- Sarker SD, Latif Z, Gray AI.** 2005. Natural products isolation. Humana Press (Totowa) Pp: 1-23.
- Seidel V.** 2005. Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Ed Humana Press, (Totowa) , 27-37 p.
- Shahverdi AR, Monsef-Esfahani HR, Nickavar B, Bitarafan L, Khodae S, Khoshakhlagh N.** 2005. Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. *Z Naturforsch C* 60: 707-710.
- Shapira Z, Terkel J, Egozi Y, Nyska A, Friedman J.**1989. Abortifacient potential for the epigeal parts of *Peganum harmala*. *J. Ethnopharmacol* 27 : 319-25.
- Sharaf M, El-ansari MA, Stephen A M , Nabel AMS.** 1997. Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. *Phytochemisrry* 44 :(3), 533-536.
- Sheahan MC, Chase M.** 1996. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R. Br. based on morphological anatomical and rbcL DNA sequence data. *Bot. J. Linn. Soc* 122: 279-300.
- Shi CC, Chen SY, Wang GJ, Liao JF, Chen CF.** 2000. Vasorelaxant effect of harman. *Eur. J. Pharmacol* 390:319–25.
- Shi CC, Liao JF, Chen CF.** 2001. Comparative study on the vasorelaxant effects of three harmala alkaloids *in vitro*. *Jpn. J. Pharmacol* 85:299–305.
- Siddhuraju P, Becker K.** 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seed extracts. *Food. Chem.* 10-19.

- Siddiqui S, Khan OY, Faizi S, Siddiqui B S.** 1988. Studies in the chemical constituents of the seeds of *Peganum harmala*: Isolation and structure elucidation of two β -carboline lactams, harmalanine and harmalacidine. *Heterocycles* 27: 1401-1410.
- Sincich F.** 2002. Bedouin Traditional Medicine in the Syrian Steppe. Ed FAO, 146 p.
- Singh A, Tej KB, Sharma, OP.** 2011. Clinical biochemistry of Hepatotoxicity. *J. Clin. Toxicol* 4: 1-19.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.** 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free. Radical. Biol. Med* 33: 575-586.
- Su MS, Shyu YT, Chien, PJ.** 2008. Antioxydant activities of vtrus herbal product extracts, *Food. Chem* 111: 892-896.
- Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y.** 2006. Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J. Food. Compos. Anal* 19: 348-353.
- Szymanowicz A, Danel V.** 2005. Toxicological biomarkers in acute intoxications. *Immunoanal. Bio. Special* 20: 144-160.
- Tahri N, Rhalem N, Soulaymani A.** 2004. L'intoxication au Harmel, *Peganum harmala* L. *Esperance. Med* 101: 5-7.
- Tahrouch S, Rapier S, Belahsen Y, Bessiere JM, Andary C.** 1998. Volatile constituents of *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*). *Acta. Bot. Gallica* 145 (2): 121-124.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB.** 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharma. Res* 7 (3):1089-1099.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S.** 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut* 121: 307-320.
- Trease E, Evans WC.** 1987. Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London pp: 61-62.
- Tuliaganov N, Sadritdinov FS, Suleimanova GA.** 1986. Pharmacological characteristics of desoxypeganine hydrochloride (Abstract). *Farmakol Toksikol* 49: 37-40.
- Valéry Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, Abderrahim Lomri.** 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74:636-643.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol. Inter* 160:1-40.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato M, Kubota LT .** 2007. Espécies reactivas de oxigénio et de nitrogénio , antioxydants ,marcadores de dano oxidative em sangue humano : principais métodos analiticoa parasua determinação .*Quim. Nova* 30(5) : 1323-38
- Vasconselos ALS, Franca AS, Gloria MBA, Mendonca JCF.** 2000. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food. Chem* 01: 26-32.

- Vermerris W, Nicholson R.** 2006. Phenolic compound chemistry. Ed Springer, 1-70 p.
- Vetagro SC.** 2011. Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Univ Lyon , 36 p.
- Viala A.** 2007. Définition, domaine de la toxicologie, notions sur la toxicité dans Viala A., Botta A. Toxicologie, éditions Tec et Doc et éditions Médicales Internationales 6 p.
- Voigt GL.** 2000. Anemias and Polychythenias. In Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians. Ed Iowa State University Press, U.S.A , 95 – 101 p.
- Volker V.** 2003. Tubuloglomerular Feedback and the Control of Glomerular Filtration Rate. *News. Physiol. Sci* 18: 169- 174.
- Waki H, Park KW, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz DC.** 2007. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR γ expression. *Cell. Metab* 5:357–70.
- Wang X, Wang H, He A.** 1996. Study on the antitumor effect of total harmala. *J. China. Med. Univ* 25:240–2.
- Weckesser W.** 2013. First record of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) in Val Verde County, Texas, and subsequent eradication treatment. *Phytoneuron* 71: 1–5.
- Xin Rh , Wen-jing P, Xiao-lei L, Yong-jiang L, Gui-bo W, Chao-ying L, Jia-sheng X, Jin-yu L, Ge L, Ji-fang Z.** 2016. Evaluation of the acute and subchronic toxicity of *Ziwan aibu tang*. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med* 13(3):140-149.
- Young B, Lowe J S., Stevens A, Heath J W.** 2008. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. 2ème édition. DeBoeck. Pp: 288, 294, 402.
- Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi A.** 2009. The effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. *Iran. J. Parasitol* 4: 40-47.
- Zhao T, Wang Z T, Branford-White CJ .et al.** 2011. Classification and differentiation of the genus *Peganum* indigenous to China based on chloroplast *trnL-F* and *psbA-trnH* sequences and seed coat morphology. *Plant. Biol* 13, 940-947.
- Zharekeev B, Khashimov K, Telezhenetskaya M, & Yunusov S.** 1974. New alkaloids from *Peganum harmala*. *Chem Nat Compd* 10: 282-283.
- Zutshi U, Rao PG, Soni A, Gupta OP, Atal CK.** 1980. Absorption and distribution of vasicine a novel uterotonic. *Planta Med* 40 : 373-7.

Annexes

1. Tests d'identification des métabolites

➤ Les tanins

Nous avons introduit dans un tube à essai 2 ml d'infusé à 5% ; puis nous avons ajouté quelques gouttes de solution FeCl_3 à (5% dans l'éthanol). En présence de tanins il se développe une coloration brune verte qui révèle la présence des tanins

➤ Les alcaloïdes

Nous avons introduit de la poudre végétale (10 g) dans un erlenmeyer de 250 ml à laquelle nous avons ajouté 50 ml de H_2SO_4 dilué au 1/10 (50 ml). Ce mélange a été agité et macéré pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Nous avons filtré sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat. Puis on divise le filtrat en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes

Réaction de caractérisation

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

➤ Les anthocyanes

Deux millilitres d'infusion sont ajoutés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. L'apparition d'une coloration rose qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes

➤ Les coumarines

1g de poudre végétal est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué (10%), et sont portés à l'ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV.

➤ **Les stérols et triterpènes**

Elle se fait sur une macération de 24h à 5% d'éther, l'extrait est ensuite évaporé à sec et repris avec 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides.




▪ **Test de libermann-Burshard**


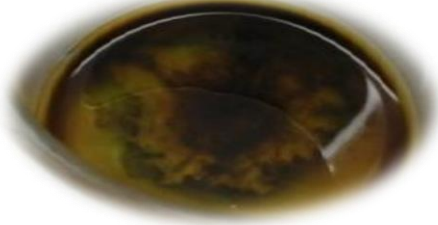

Deux millilitres d'infusion sont ajoutés à trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement, ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré, le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la présence des triterpènes.

➤ **Les saponosides**

Dans un tube à essai, 2g de poudre de la plante est mélangé avec 80 ml d'eau distillée puis portés à l'ébullition pendant 5 min , on filtre l'extrait et ensuite refroidit et agité vigoureusement pendant 2min , la formation d'une masse plus au moins important indique la présence des saponosides.

Screening phytochimique des graines des *Peganum harmala*.

Métabolites secondaires	Réactifs chimiques	Résultats	Photos
Tannins	solution FeCl ₃ à (5% dans l'éthanol	Coloration brune verte) +++	
Alcaloïdes	Bouchardat-Mayer Wagner	Un précipité blanc ou brun +++	
Anthocyanes	Acide chlorhydrique 2N + ammoniac	coloration rose +	

Coumarines	NaOH + examen sous UV	Ffluorescence jaune +	
Stérols et triterpénes	Anhydride acétique+ chloroforme	un anneau rouge- brunâtre ou violet +	
Saponosides	Indice de mousse	La formation d'une masse -	

2. Activité antioxydante

➤ Effet scavenger du radical DPPH

✚ Mode opératoire

La solution de DPPH• est préparée par solubilisation de 1mg de DPPH• dans 25 ml de méthanol. Un volume de 1,5 ml des solutions d'extraits ou de standard (acide ascorbique) de différentes concentrations (2,5-100 µg/ml pour l'EBG, 25-250 µg/ml pour l'EBF et 5-250 µg/ml pour l'EAT) sont mélangés avec 0,5 ml d'une solution méthanolique de DPPH• .Après l'incubation à milieu obscurité 30 minutes à température ambiante, l'absorbance est suivie à 517nm. On a utilisé un control contient uniquement le DPPH• et du méthanol qui remplace l'échantillon par un volume égale et le banc contient le méthanol et l'échantillon. L'inhibition du radical libre DPPH• par la vitamine C a été également analysée à différente concentrations de 0,5-8µg/ml pour la comparaison. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH• a été calculé comme suite :

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs control}} \times 100$$

➤ **Test de réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)**

✚ **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). En effet, 2,5 ml de différentes concentrations de chaque extrait (mg/ml) dilué dans le méthanol est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

3. Activité antibactérienne

➤ **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit : Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

➤ **Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Acute and Subacute Toxicity Evaluation of Alkaloids of *Peganum harmala* L. in Experimental Mice

Hassina Guergour^{1,2*}, Rima Allouni², Nadia Mahdeb², Abdelouahab Bouzidi²

¹Department of Biology, Faculty of natural sciences and life, University Elbachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arridj 34000, Algeria.

²Department of Biochemistry, Faculty of natural sciences and life, University Ferhat Abbas, Setif 19000, Algeria.

Received: 16th July, 17; Revised 24th Aug, 17, Accepted: 14th Sept, 7; Available Online: 25th Sept, 17

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the acute and subacute toxicity of total alkaloids seeds of *Peganum harmala* in female mice. All morphological, biochemical, hematological, histopathological changes, in addition to mortality and bodyweight changes were recorded. After acute intraperitoneal administration of dose 118 mg/kg, there were no any remarkable changes in general appearance and mortality. After 24h, a significant increase in relative weights of heart and brain with no change in hematological, biochemical parameter compared to the normal group. For 5 days a significant reduction in the relative weights of the kidneys and increase of brain with significant change in hematological (MCHC, MCV) and biochemical parameter (AST, ALP and Urea). Subacute study of dose (18 mg/kg) for 28 days showed no remarkable changes in general appearance and deaths occurred in experimental group. A significant increase in relative weight of brain compared to the normal group was observed. In biochemical parameters, a significant increase was seen in both ALT and AST enzyme activities. There was no significant change in hematological parameters. Histopathological examination revealed a ground glass appearance of hepatocytes and the vascular congestion. Alkaloids seeds of *P.harmala* showed significant toxicity in female mice.

Keywords: *Peganum harmala*; acute toxicity; subacute toxicity; mice; alkaloids

INTRODUCTION

Peganum harmala L. known locally as “harmel” in Algeria¹ is a wild-growing flowering plant that belongs to the Zygophyllaceae family and is considered an important medicinal plant². The pharmacologically active compounds of this plant include a number of β -carboline (such as harmine, harmaline, harman and harmalol) and quinazoline alkaloids (vasicine and vasicinone) responsible of its pharmacological and toxicological effects³. Its root has been used as a parasiticide to kill body lice and leaves are used for treating rheumatism and nervous conditions where as seeds are used externally in the treatment of haemorrhoids and baldness⁴.

The alkaloids in the seeds have pharmacological activities which including: antibacterial effects, vasorelaxant, anticancer, antinociceptive, antitumor and finally antiprotozoal effects. In addition to the therapeutic effects, harmal also has some toxicity. There were several reports of human and animal intoxications induced by the plant^{5,1}. There have been some toxic symptoms reported in different human cases following ingestions of its seed extract or infusion, such as neuro-sensorial symptoms, visual hallucinations, and cardiovascular disorders such as bradycardia and lowblood pressure, psychomotor agitation, diffuse tremors, ataxia and vomiting^{6,7}. The aim of the present study was therefore, to investigate the acute

and subacute toxic effects of the total alkaloids seeds of *Peganum harmala* in mice.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extraction

The seeds of *Peganum harmala* were collected in the month of August, in the region Bordj Bou Arridj (north-east of Algeria). The plant was identified on the basis of its morphological characteristics.

Total alkaloids extraction

Hundred gram of Air dried powdered of seeds was defatted with petroleum ether under reflux. The defatted dry powder was alkalized with 40 ml of NH₄OH (0.5 N) for 8 hours and were extracted to exhaustion with dichloromethane using a soxhlet apparatus for 6 h. The organic extract (containing free alkaloids and lipophilic impurities) is washed three times with 150 ml aqueous sulphuric acid (0.5 N).

The solution obtained is treated with NH₄OH (0.5 N) to pH 9 to liberate the free alkaloids then are separated three times by extraction with 3 x 150 ml diethyl ether and then dried with Na₂SO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain crude alkaloids⁸.

Animals

Female Swiss albino mice (25-30g), obtained from the animal house of the Pasteur Institute in Algiers, were used

Figure 1: *Peganum harmala*.Figure 2: Seeds of *Peganum harmala*.Table 1: Relative organ's weight of female mice treated with (118 mg/kg) of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds. Results were expressed as the mean \pm S.E.M.

Organ	Control	Group 1 st day	Group 5 th day
Liver	0.051 \pm 0.002	0.051 \pm 0.003	0.058 \pm 0.002
Kidneys	0.0142 \pm 0.002	0.0092 \pm 0.0003	0.0087 \pm 0.0004*
Spleen	0.0041 \pm 0.0002	0.0168 \pm 0.008	0.0047 \pm 0.0003
Heart	0.0049 \pm 0.0002	0.0145 \pm 0.0003***	0.0045 \pm 0.0001
Lungs	0.0095 \pm 0.001	0.139 \pm 0.006	0.0067 \pm 0.0001
Brain	0.0129 \pm 0.0004	0.0148 \pm 0.0003*	0.149 \pm 0.0004*

* Significantly different at P< 0.05

Table 2: Effect of acute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds (118 mg/kg) on some hematological parameters .Results were expressed as the mean \pm S.E.M.

Parameters	Control	Group 1 st day	Group 5 th day
RBC 10 ⁶ /mm	7.737 \pm 0.292	7.914 \pm 0.270	7.39 \pm 0.180
MCV fL	45,90 \pm 0,511	44,42 \pm 0,760	42,05 \pm 0,424**
HCT %	35 \pm 1	37 \pm 2	31 \pm 0.9
WBC 10 ³ /mm	6,233 \pm 0,6412	6,371 \pm 0,8676	6,980 \pm 1,877
PLT 10 ³ /mm	249 \pm 41.43	412.7 \pm 50.06	413.7 \pm 56.77
HGB g/dl	12,83 \pm 0,306	13,65 \pm 0,433	12,57 \pm 0,260
MCH pg	16,68 \pm 0,439	16,53 \pm 0,413	17,07 \pm 0,525
MCHC g/dL	36.33 \pm 0.73	37.05 \pm 1.51	40.63 \pm 1.27*

* Significantly different at P< 0.05

for the acute and subacute toxicity study. They were housed in hanging transparent plastic cages (55 x 33x19cm) in the animal room. The litter was renewed every 3 days. They were fed with a standard pellet and tap water *ad libitum*.

All animals were kept in standard environmental. Each mouse was identified by body marks using 1% picric acid solution. All experimental procedures were conducted in accordance with the guide for care and use of laboratory animals and in accordance with the scientific council of the Faculty of Natural Sciences and Life of the University Ferhat Abbas, Setif 1 – Algeria.

Acute toxicity

The total alkaloids of *P.harmala* to be tested is dissolved in methanol and diluted by normal saline solution (v/v 0.9%).

The mice were grouped into three groups of 10 mice each. Two groups were given single dose (118 mg/kg of total alkaloids of seeds of *Peganum harmala* by intraperitoneal route.

The control group (10 mice) received saline water. At the end of all experimental periods, the first group was sacrificed after 24 hour of treatment, the second and control groups after 5 days⁹.

Subacute toxicity

The female mice (20–25 g) were divided into two groups of 15 animals each and were placed under standard

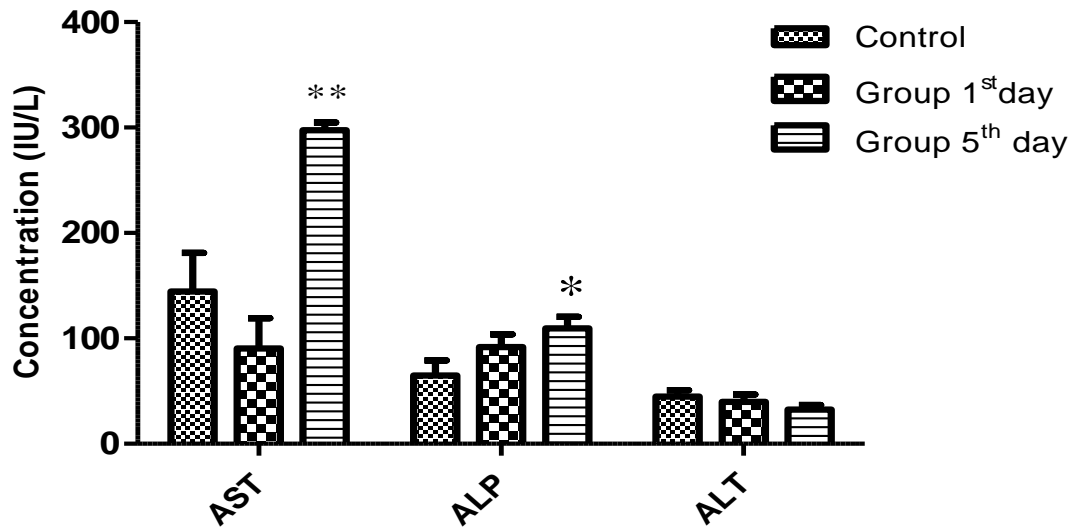


Figure 3: Effect of acute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds (118 mg/kg) on some biochemical parameters (hepatic function) of female mice. Results were expressed as the mean \pm S.E.M.* significantly different at $P < 0.05$.

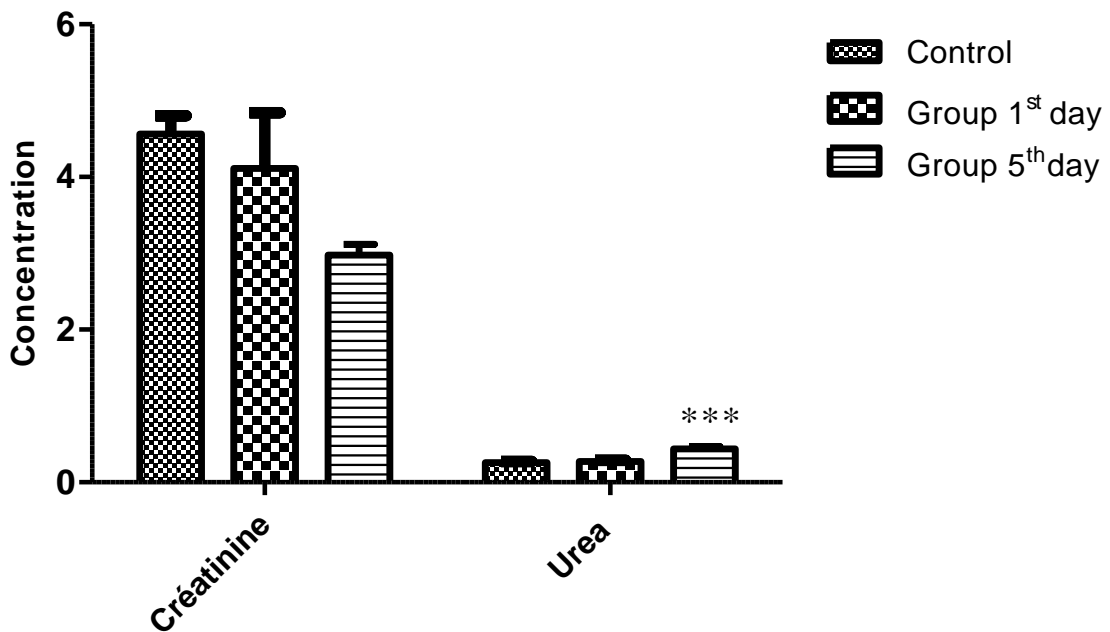


Figure 4: Effect of acute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds (118 mg/kg) on some biochemical parameters (renal function) of female mice. Results were expressed as the mean \pm S.E.M.* significantly different at $P < 0.05$.

conditions. Tested group received (18 mg/kg) of alkaloids for 28days and control received vehicle at the same volume. The animals were weighed on the first day of the experiment and thereafter were then weighed each week, to note any weight variation.

Determination of hematological and serum biochemical parameters

The hematological and serum biochemical parameters were determined. Hematological parameters assayed included red blood cell (RBC) count, leukocyte (WBC) count, haemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume(MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT) ,Serum was

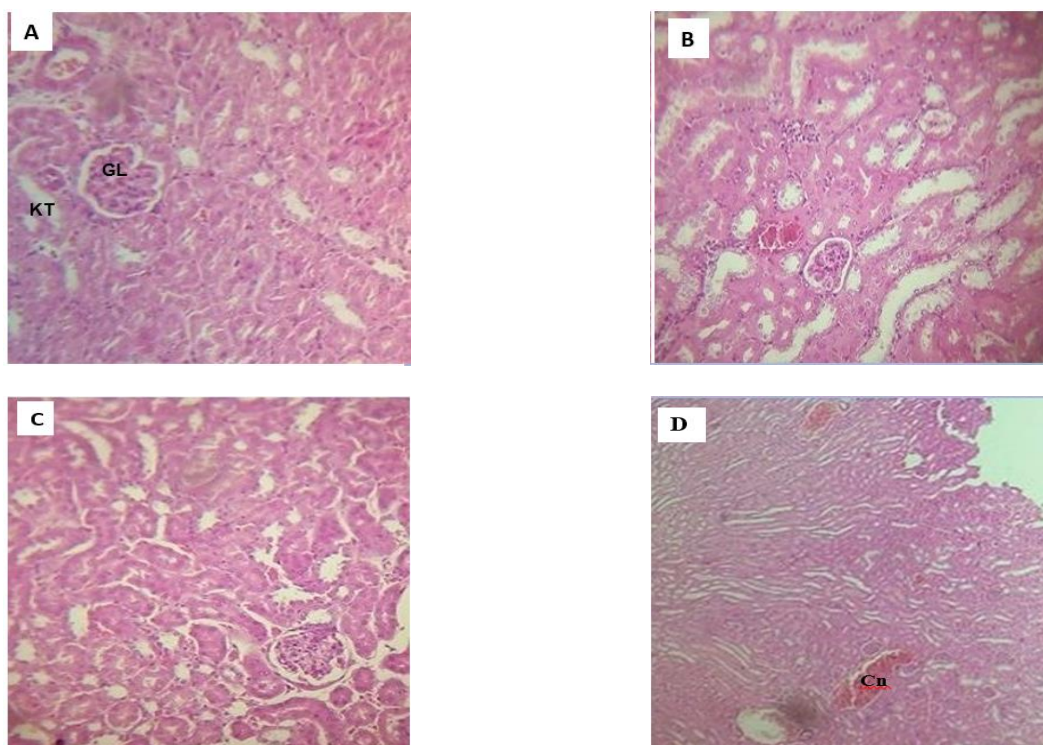


Figure 5: Histological section of kidney tissue with a single dose of (118 mg/Kg) : (A): control group. Treated groups; (B): After 24h; C: After 5 days; (D): After 28 days. (Hematoxylin/eosin stain). **GL**: glomerulus, **KT**: kidney tubes, **Cn**: Congestion. **X40**.

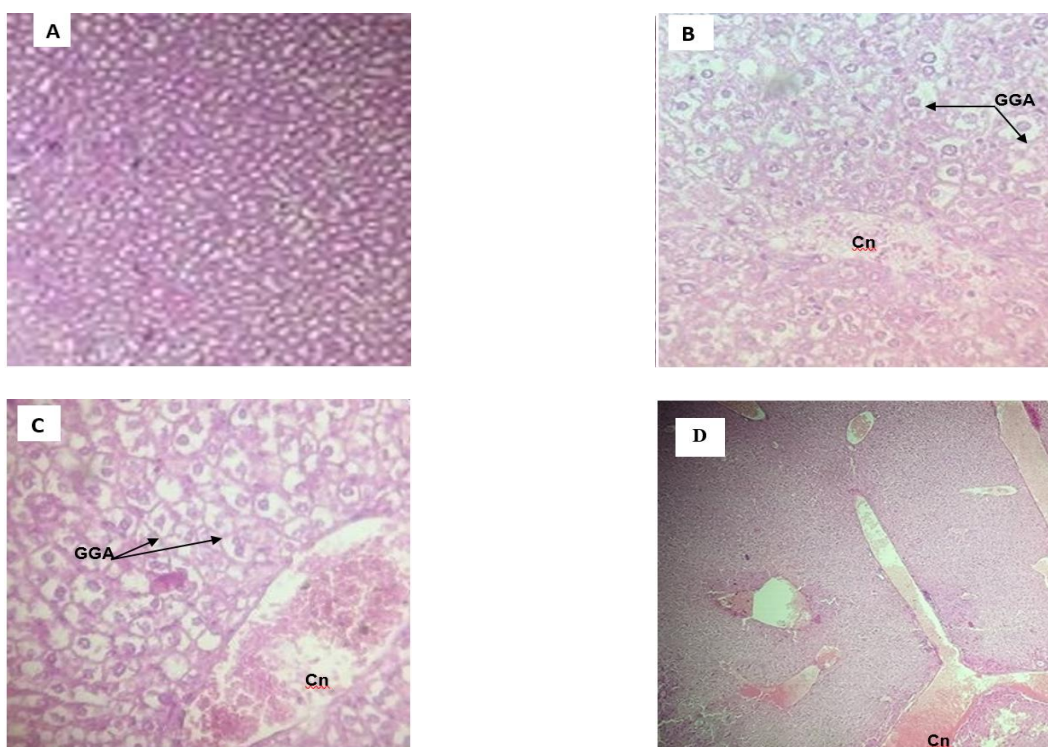


Figure 6: Histological sections of liver tissue with a single dose of 118 mg/kg: control group (A), treated groups; (B): After 24h ;(C): After 5 days; (D): After 28 days. **Cn**: Congestion; **GGA**: Ground Glass Appearance of hepatocytes. **X40**.

assayed for creatinine, urea, (AST),(ALT), (ALP). For the determination of hematological parameters was used medonic hematology analyzer systems (M-series), for the biochemical parameters was used an Advia 1800 Chemistry Analyzer, Siemens.

Histopathology

Immediately after collection of blood samples by cardiac puncture, animals were sacrificed. After autopsy, all tissues were examined grossly and major's organs (liver, brain, heart, kidneys, Spleen, and lung) were weighted.

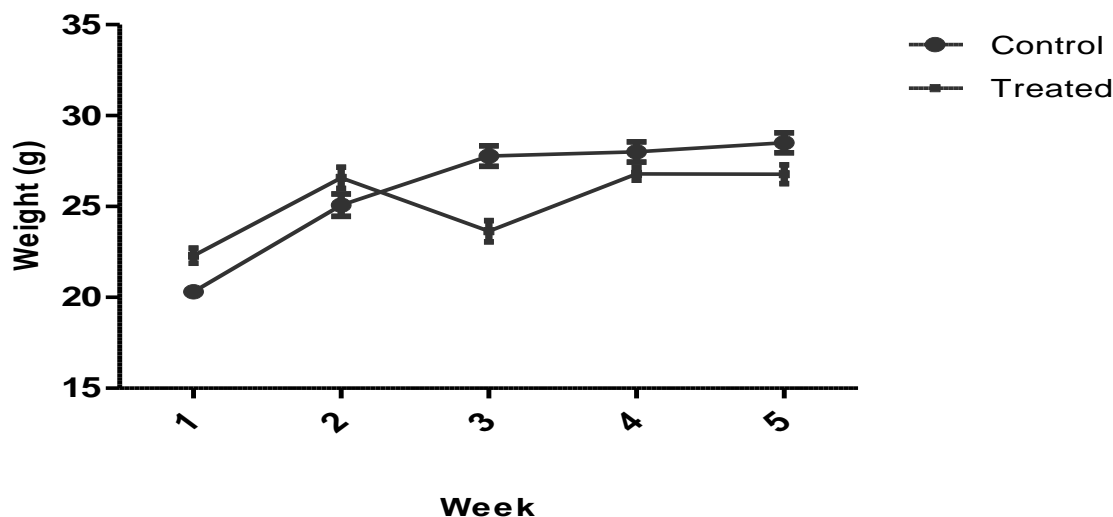


Figure 7: Effect of subacute administration of total alkaloids on body of female mice, values are Mean± SEM.

Table 3: Relative organ weights (g) of mice in the subacute toxicity study treated with 18 mg/kg of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds. Results were expressed as the mean ±S.E.M.

Group	Control	Treated for 4 weeks
Liver	0,051± 0,0030	0,046±0,0016
Brain	0,014 ± 0,0004	0,031 ± 0,016***
Kidney	0,0107± 0,0005	0,0099 ± 0,0003
Lungs	0,0068 ± 0,0003	0,0077 ± 0,0004
Heart	0,0050 ± 0,0002	0,0047 ± 0,00018
Spleen	0,0057 ± 0,0002	0,0052 ± 0,0003

* Significantly different at P< 0.05

Table 4: Effect of subacute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds (18 mg/kg) on some hematological parameters .Results were expressed as the mean ±S.E.M.

Parameters	Control	Treated for 4 weeks
RBC 10 ⁶ /	07,820 ± 0,2474	08,471 ± 0,2194
MCV fL	53,50 ± 0,5000	51,57 ± 0,7825
HCT %	43,78 ± 2,082	43,61 ± 1,232
WBC	7,017 ± 0,9148	6,043 ± 0,9614
10 ³ /mm		
PLT 10 ³ /mm	924,8 ± 80,16	1009 ± 121,9
HGB g/dl	13,52 ± 0,2701	14,31 ± 0,2040
MCH pg	17,30 ± 0,3445	16,96 ± 0,3221
MCHC g/dL	32,35 ± 0,4759	32,97 ± 0,6171

* Significantly different at P< 0.05

The relative organ weight of control and treated was calculated. Tissues from liver and Kidneys of all animals were fixed in 10% buffered formalin solutions then embedded in paraffin and cut with a microtome set at 5µm, stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy for histopathological changes.

Statistical analysis

Comparisons among different groups were performed by One-way ANOVA and t² Student test using the software Graphpad Prism version 5.01. All data are expressed as mean± (SEM); Differences between groups were considered significant at p<0.05 levels.

RESULTS

Acute toxicity of total alkaloids

No signs of toxicity in general appearance observed after intraperitoneal administration of single dose tested (118mg/kg). None of the mice in all treated groups died during the course of the experiment.

The macroscopic examination of various organs *in situ* did not show any morphological changes in organs of treated animals compared with those of control.

The relative weights of heart and brain after first day were significantly increased compared to control. The group sacrificed after 5 days of treatment has presented a significant reduction in the relative weights of the kidneys and increase of brain compared to control group (Table 1). The results of the hematological tests are summarized in (Table 2). All the tested hematological parameters were within normal limits compared to control group for the first day of treatment with total alkaloids seeds of *Peganum harmala*. No toxicologically significant differences between treated animals and control were found (Table 2).The group sacrificed after 5 days of treatment has presented significant decrease in MCHC and increase in MCV when compared with control (Table2).

The results of the various biochemical tests on the experimentally treated animals and control group are summarized in (Fig.3.4). Intraperitoneal administration of total alkaloids seeds of *Peganum harmala* did not cause significant changes in serum biochemical parameters such as Urea, Creatinine, AST, ALT and ALP levels when compared to control group for the first day of treatment, However, AST, ALP and Urea were significantly increased in treated animals when compared to control group after 5 days of treatment (Fig3.4).

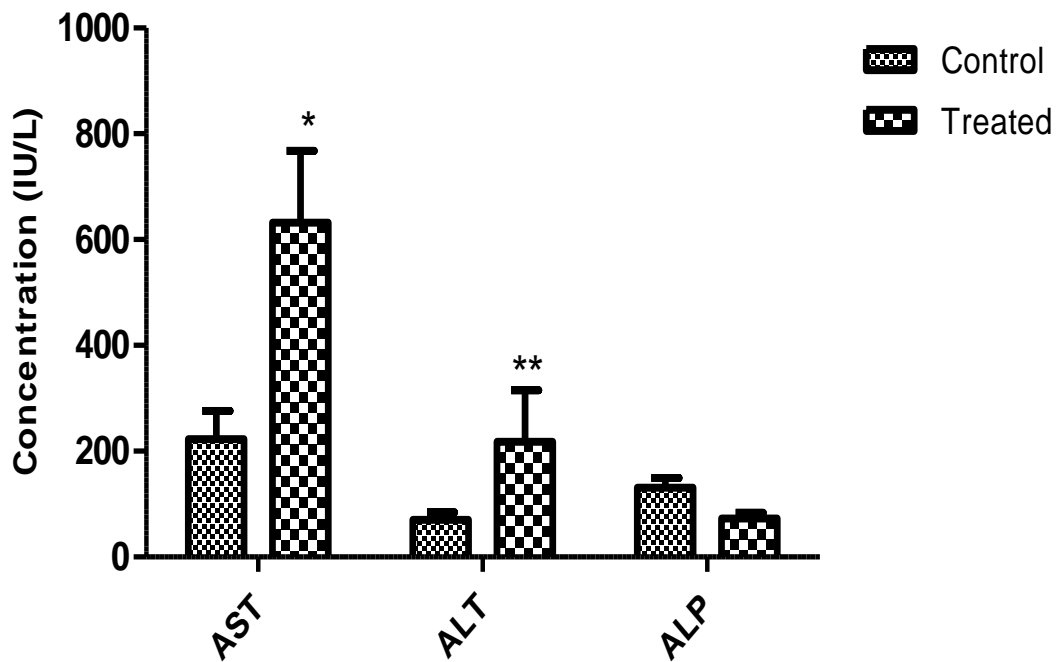


Figure 8: Effect of subacute administration of alkaloids of *Peganum harmala* seeds (18 mg/kg) on some biochemical parameters (hepatic function) of female mice. Results were expressed as the mean \pm S.E.M.* significantly different at $P < 0.05$.

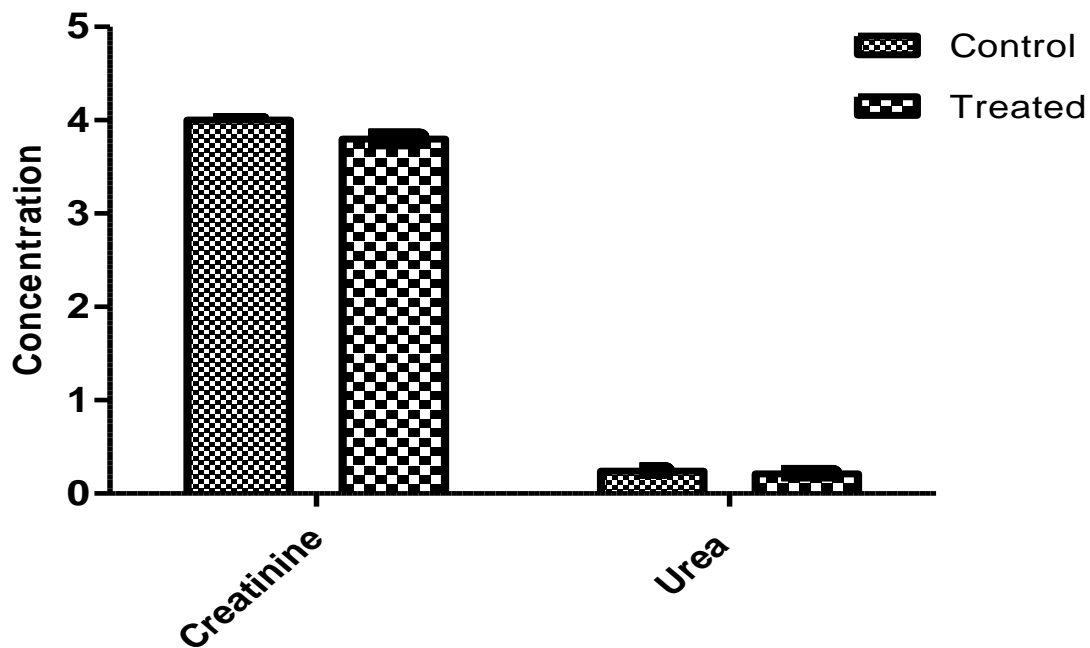


Figure 9: Effect of subacute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* seeds (18 mg/kg) on some biochemical parameters (renal function) of female mice. Results were expressed as the mean \pm S.E.M.* significantly different at $P < 0.05$.

The histological examination of liver and kidneys from female mice were performed in both control and treated groups. The results of the kidneys at the dose applied (118 mg/kg) revealed no destruction architecture (Fig.5). However, histological examination of the liver in the treated animals after 24^h and 5th days of treatment revealed

a ground glass appearance of hepatocytes, and the vascular congestion (Fig.6).

Subacute toxicity

No clinical toxicity signs were observed in the treated group compared to the control group. None of the mice in the treatment or control groups died during the course of

the experiment. The saline and total alkaloids of *P.harmala* did not cause any gross morphological abnormality in various organs of the animals. There were no significant differences in the final body weight of the animals when compared with controls. The relative weight of organs showed no significant difference except of brain where an increase was observed compared to the control. The results of the hematological tests are summarized in Table 6. All the tested hematological parameters were within normal limits compared to control group.

The results of the various biochemical tests on the experimentally treated animals for 28 days and control group are summarized in (Table7). Significant differences in treated animals for AST and ALT levels when compared to control group.

DISCUSSION

In the toxicity study, organ weight is an important indicator of physiological and pathological status of animals. The relative organ weight is fundamental to confirm whether the organ weight was exposed to the injury or not. Increased in the heart, liver, kidney, spleen and lungs are the primary organs affected by metabolic reaction caused by toxicant¹⁰. We observed a significant increase in heart (1stday), brain (1st and 5th day) and significant decrease in kidneys (5th days) of treatment at a dose 118 mg/kg, may indicate that the extract might have toxic potential on these organs. It could be argued that these changes may be toxicologically significant, as they were corroborated by the biochemical and histomorphology findings. Therefore, this study indicates that total alkaloids of *Peganum harmala* cause acute toxicity effects at the dose tested¹¹.

Haematopoietic system is one of the most sensitive targets of toxic compounds and is an important index of physiological and pathological status in man and animals¹². A significant decrease in mean corpuscular volume (MCV), but increase in means corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) after 5thdays of treatment were observed. These parameters are useful as the RBC indices for differential diagnosis of anaemia¹³.In addition the MCV has been reported to provide information on the size and status of erythrocytes, MCH and MCHC reflect the haemoglobin content of RBCs¹⁴. However the non-significant difference on the RBC, Hb (red blood cell counts and haemoglobin concentration) suggested that the total alkaloids of *Peganum harmala* did not affect a change in the average size of RBCs. By extension, it did not induce anemia¹⁵.

Transaminases such as AST (SGOT), ALT (SGPT) are well known good indicators of liver function and used as biomarkers to conclude the probable toxicity of drugs and xenobiotics¹⁶. Significant increases in the levels of some biochemical parameters, particularly ALP, were observed in the female mice treated with total alkaloids after 5th days of treatment, as compared with the control. Moreover a hepatic alkaline phosphate is found histochemically in the microvilli of bile canaliculi and on the sinusoidal surface of hepatocytes¹⁷. Although elevated levels of (ALP) have been associated with bone diseases, it is also an indicator for obstructive jaundice and intra-hepatic cholestasis¹⁸

could signal mild degeneration as observed in the histopathology part of the present study.

The total alkaloids of *Peganum harmala* seeds causes a significant increase in serum urea and AST without adversely affecting the serum levels of creatinine (non-significant reduction in creatinine).AST is mostly present in the myocardium, skeletal muscle, brain and kidney¹⁹. Urea, the end product of protein metabolism, and its concentration is influenced by the rate of excretion, while creatinine is the waste product of muscle metabolism. The significant increase in the serum levels of urea and the non-significant reduction in creatinine in the extract-treated mice is an indication that the kidney is able to clear the waste products from the system; this is also indicative that the extract had no deleterious effect in kidney²⁰. Moreover the increase in Urea and AST levels could be explained the effect of alkaloids on the heart, brain or skeletal muscle. Studies have reported the effect of harmel on the brain and heart in humans^{6, 21,22}.

In the subacute toxicity study in female mice given the alkaloids, there were no significant changes in weight of body and organs except in increase of brain. All the animals exhibited a normal increment in body weight without drastic difference between both control and treated groups.

Sub-acute administration of total alkaloids of *Peganum harmala* did not cause significant changes in the haematological profile of female mice when compared with control, suggesting that the alkaloids may not be toxic to the blood system. For biochemical parameters the observed significant increase in ALT and AST activity in the test group compared to control may signify liver injury as seen in liver dysfunction, damage and liver diseases. Because the transaminases (AST and ALT) are well known enzymes used as biomarkers to predict possible toxicity, generally damage to liver cells will result in elevation of both these enzymes in the serum¹⁶. Increase in the activities of AST and ALT in the treated groups indicates that alkaloids of *Peganum harmala* have capacity to induce liver damage under conditions of subacute toxicity. Renal dysfunction can be assessed by concurrent measurements of urea, creatinine and uric acid and their normal levels reflect at reduced likelihood of renal problems²³.

In the present study, the insignificant changes in serum levels of urea and creatinine in female mice suggest that subacute administration of alkaloids does not affect the kidney function.

Histological changes in the kidney and liver of the animals were also examined. The histology slides of the kidneys at dose (118 mg/kg) showed no destruction to kidney architecture this observation as further confirmed by the biochemical biomarkers for renal function but on congestion was observed in subacute administration. The liver histology results revealed a ground glass appearance of hepatocytes (hepatocytes show enlarged and pale-staining cytoplasm) in acute toxicity and the vascular congestion in under conditions of acute and subacute toxicity.

CONCLUSION

In summary, acute and subacute toxicity study of *Peganum harmala* indicated that the total alkaloids seeds extract at the dose studied produce significant changes of biochemical parameters and histopathology of internal organs. Further studies to determine the chronic toxicity of this extract on animal are needed.

REFERENCES

- Mahmoudian M, Jalilpour H, Salehian P. Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a case report. *Iran J Pharmacol Ther* 2002; 1:1–4.
- Berdai MA, Labib S, Harandou M. *Peganum harmala* L. Intoxication in a Pregnant Woman. *Case Reports in Emergency Medicine* 2014 .Article ID 783236.
- Edziri H, Mastouri M, Matieu M, Zine M, Gutman L and Aouni. Biological activities of *Peganum harmala* leaves. *Afr. J. Biotechnol* 2010; 9(48):8199-8205.
- Asgarpanah J, Ramezanloo F. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African J. Pharmacy and Pharmacology* 2012; 6:1573-1580.
- El Bahri L; Chemli R. *Peganum harmala* L: A poisonous plant of North Africa. *Vet. Hum. Toxicol.* 1991; 33: 276–277.
- Frison G, Favretto D, Zancanaro F, Fazzin G, Ferrara SD. A case of β -carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Sci. Int* 2008; 179, e37–e43.
- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, El Hamidi M, Tligui N, Lyoussi B, Hassar M. Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds. *Ann. Pharm. Fr* 2002; 60, 123–129.
- Bruneton J. *Pharmacognosie. Phytochimie, Plantes médicinales* 3e éd., 1999.Lavoisier, Paris.
- Bouzidi A, Mahdeb N, Kara N. Acute toxicity study of alkaloids of *Datura stramonium* seeds in rat. *Roavs* 2011; 1(8): 482-488.
- Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J. Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food Chem. Toxicol* 2002; 42: 237-282.
- Kwan Y P, Ibrahim D, Yeng C, Subramaniam S, Sreenivasan S. Acute and Subchronic Toxicity Study of *Euphorbia hirta* L. Methanol Extract in Rats. *BioMed Research International* 2013; 14:1–14.
- Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musangacecropioides* in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 374-379.
- Voigt GL. Anemias and Polychythenias. In *Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians*. Iowa State University Press, U.S.A.2000.pp 95 – 101.
- Nussey GJ, Van Vuren JHJ, Du Preez HH. Effects of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambicus tilapia, *Oreochromismossambicus* (Cichlidae). *Comp Biochem Physiol* 1995; 111:369-380.
- Narhari D, Durajan G, Sharif Hasan MD, Sheikh Z R. Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of Terminaliacitrina leaves in Sprague Dawleyrats. *J Acute Disease* 2015; 4(4): 316–321.
- Rahman MF, Siddiqui MK, Jamil K. Effects of Vepacide (*Azadirachtaindica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a sub chronic study with rats. *J Hum Exp Toxicol* 2001; 20: 243–249.
- Thapa BR, Anuj W. Liver Function Tests and their Interpretation. *Indian J of Pediatrics* 2007;74 :663-671.
- Adebayo AH, Abolaji AO, Opata TK, Adegbenro, IK. Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Chrysophyllumalbidum* G. on Biochemical and Haematological Parameters of Albino Wistar Rats. *Afr J.Biotech* 2010 ; 9(14):2145-50.
- R. A Sacher, R. A. Mepherston. *Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test,* 3rd ed., FA Davis Company; Pennsylvania, U.S.A, 1991.
- Olufunsho A, Kennedy I A, John A, Majeti NVP .Toxicological evaluations of the aqueous stem bark extract of *Brideliaferruginea* (Euphorbiaceae) in rodents. *InterdiscipToxicol* 2015; 8(2): 89–98.
- Moshiri M, Etemad L, Javidi S, Alizadeh A. *Peganum harmala* intoxication, a case report. *Avicenna J Phytomed* 2013; 3(3): 288-292.
- Nasehi M, Piri M, Nouri M, Farzin D, Nayer-Nouri T, Zarrindast M R. Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmane-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *Eur J Pharmacol* 2010; 634:77–83.
- Palm, M, Lundblad A. Creatinine concentration in plasma from dog, rat, and mouse: A comparison of 3 different methods. *Vet. Clin. Pathol* 2005; 34, 232–236.