

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ferhat Abbas, Sétif

Faculté des Sciences, Département de Biologie

## Mémoire de Magister

Spécialité : Biologie et Physiologie végétale

Option: Valorisation des ressources végétales

### Thème

---

Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques  
extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif

---

Présenter par:

M<sup>lle</sup> BOUSSAHEL Soulef

Devant le jury:

Président: Pr. Laouer Hocine Prof. Université de Sétif

Encadreur: Dr. Seraiche-Dahamna Saliha M.C Université de Sétif

Examineur: Dr. Bounechada Mustapha M.C Université de Sétif

Dr. Belhattab Rachid M.C Université de Sétif



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ferhat Abbas, Sétif

Faculté des Sciences, Département de Biologie

## Mémoire de Magister

Spécialité : Biologie et Physiologie végétale

Option: Valorisation des ressources végétales

### Thème

---

**Etude biochimique et histologique de l'effet de quelques  
extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif**

---

Présenter par:

M<sup>lle</sup> BOUSSAHEL Soulef

Devant le jury:

Président: Pr. Laouer Hocine  
Encadreur: Dr. Seraïche-Dahamna Saliha  
Examineur: Dr. Bounechada Mustapha  
Dr. Belhattab Rachid

2010/2011

*A mes chers parents*  
*A la pensée de mes grands parents*  
*A mon frère unique*  
*A mes sœurs et leurs enfants*  
*A toute ma famille*  
*A mes amis et mes collègues*  
*A tous ceux qui aiment la nature*

## REMERCIEMENTS

Remerciement et Louage à Dieu Seigneur des Mondes.

Mes vifs remerciements s'adressent:

A vous, lumière de ma vie, le plus beau don de dieu, avec vous je partage le plus sacré lien spirituel et affectif : mes parents ; que dieu vous garde;

A Monsieur Adel Chaker professeur a l'université Ferhat Abbas (Faculté des Sciences de la nature et de la vie, département de biologie et physiologie végétale), pour avoir proposé des postes de graduations nous donnant ainsi l'occasion d'y participer et d'arriver jusque là;

A Mme Seraiche née Dahamna Saliha pour avoir accepté de m'encadrer. Son dynamisme, sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils, m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Un remerciement particulier, pour ses grandes qualités humaines et son soutien permanent, tout au long de ces trois années;

A Monsieur le Professeur Laouer Houcine pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance. Au Dr. Belhattab Rachid et Dr. Bounechada Mustapha d'avoir accepté de juger mon travail de magister;

Aux professeurs Harzallah Daoud, Baghiani Abderrahmane, Laouer Houcine et Arrar Lekhmici et aux docteurs Bouriche Hamama, et khennouf Seddik, qui ont toujours été à mes côtés dans le laboratoire ce qui m'a permis de profiter de leurs connaissances scientifiques, leurs expériences et leur soutien.

Sans oublier Mr. Madoui Amar, Pr. Bouzerzour Hamenna, Melle Ait-Moussa Samira et Dr. Mansouri Housseem qui m'ont dirigée lors de mon travail. Leurs soutiens et leurs enseignements m'ont été d'une grande aide;

Mes sentiments de reconnaissance vont également aux doctorants : Garmouni Meriem, Amor Loubna, Belhadj Hani, Guendouz Ali, Oulmi Abd-El-Malek, Gaamoune Sofian pour leur aide et leur disponibilité;

Aux personnel du laboratoire Central de l'Hôpital universitaire de Sétif pour leur aide, en particulier Pr. Touabti Abd-El-Rezak et Youcef;

Aux techniciens: Nouioua Wafa, Guemmache Abd-El-Rezak, Dakhise Nacer, de l'animalerie de l'université Ferhat Abbas, pour leur gentillesse et leur soutiens;

Aux forestiers de la conservation des forêts à Ain Azel qui n'ont pas hésité à m'accompagner lors de mes sorties sur terrain.

A Mr le maire de l'APC de Ain Azel et mon chef de bureau au sein de la commune pour leur compréhension, ainsi qu'à mes collègues de travail en particulier ceux du bureau d'hygiène pour leur bonne humeur et leur soutien moral;

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail;

Ce mémoire est le témoignage de ma reconnaissance et de mon estime envers ces personnalités.

## RÉSUMÉ

**R**etama sphaerocarpa (L.) Boisse est une plante médicinale appartenant au genre Retama largement utilisée dans les pays méditerranéens et en particulier en Algérie. Dans la présente étude le rendement de l'extraction de cette plante par le méthanol et l'eau distillée en matière sèche est respectivement de 15.86% et 18.68%. Les résultats du dosage des flavonoïdes étaient plus élevés dans l'extrait méthanolique ce dernier a révélé une prépondérance de la présence des isoflavones par la technique HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS, alors que la technique GC/MS a démontrée la présence des alcaloïdes quinolizidiniques dans l'extrait aqueux. La méthode au DPPH indique une IC<sub>50</sub> égale à 0.14±0.0014mg/ml et 0.46±0.010 mg/ml pour l'extrait aqueux et méthanolique respectivement. Le premier a démontré une plus grande activité antioxydante que le second. Dans le test du β-carotène/acide linoléique les résultats du pourcentage d'inhibition été acceptables étant de 79.075±3.916% pour l'extrait aqueux et 71.694±1.203% pour l'extrait méthanolique. D'autre part l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux par voie orale sur des rats mâles et femelle Albino Wistar a démontré des symptômes graves de toxicité présentée par des problèmes respiratoires, des tremblements, comas, et des paralysies entraînant la mort. La DL<sub>50</sub> était de: 2488.86±870.23 mg/kg par la méthode graphique et de: 3333.33mg/kg par calcul. Selon nos résultats, Retama sphaerocarpa (L.) Boisse pourrait être classée dans la catégorie des plantes faiblement toxiques, toutefois l'étude de la toxicité subaiguë a révélée des perturbations dans la croissance normale des animaux et dans quelques paramètres hématologiques (GB, GR, HGB, CCMH, PLT, VGM) et biochimiques (PAL, AST, CPK, LDH, GLUC), ainsi que des altérations hépatiques et rénales.

**Mots clés :** Retama sphaerocarpa (L.) Boisse, alcaloïdes, antioxydant, DPPH, β-carotène, DL<sub>50</sub>, paramètres hématologiques, biochimiques, altérations histopatologiques.

## ABSTRACT

**R**etama sphaerocarpa (L.) Boisse is a medicinal plant belonging to the genus Retama widely used in Mediterranean countries and especially in Algeria. In this study the extraction efficiency of this plant by methanol and distilled water is respectively: 15.86% and 18.68%. The results of the determination of flavonoids was higher in the methanolic extract, this one revealed a preponderance of the presence of isoflavones by HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS method, while the GC/MS test demonstrates the presence of quinolizidines alkaloids in the aqueous extract. DPPH method specifies an IC<sub>50</sub> equal to: 0.14±0.0014mg/ml and 0.46±0.010mg/ml for aqueous and methanolic extract respectively, the first showed greater antioxidant activity than the second one, whereas In the test of β-carotène/acid linoleic, the percentage of inhibition was acceptable for the two extract being of: 79.075±3.916% for the aqueous extract and 71.694±1.203% for the methanolic one. On the other hand, the study of acute toxicity of aqueous extract orally to *Wistar albino* males and females rats showed serious symptoms of toxicity such as the respiratory disfunction, tremor, coma, paralysis leading to the death, the LD<sub>50</sub> was: 2488.86±870.23mg/kg by the Graphic method and: 3333.33 mg/kg by the calculated one, these data allow to classify *Retama sphaerocarpa* in low toxicity plants category, however the sub acute toxicity studies revealed disruption in the normal animal growth and in some hematological (WBC, RBC, HGB, MCHC, PLT, MCV), biochemical (ALP, AST, CPK, LDH, GLUC) parameters, as well as hepatic and kidney alterations.

**Keywords :** *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse, alkaloids, antioxidant, DPPH, β-carotene, LD<sub>50</sub>, hematologicals, biochemicals, histopathologicals alterations.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA%	Le pourcentage de l'activité antioxydante.
Abs	Absorbance.
ALT	Alanine aminotransférase.
AST	Aspartate aminotransférase.
BHT	Antioxydant synthétique.
C	Dégréé Celsius.
CSF	Colony stimulating factor
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.
CHOL	Cholestérol.
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance.
CPK	Créatine PhosphoKinase.
CRE	Créatine.
DAD	Détecteur à barre diode.
DL <sub>n</sub>	Dose létale qui tue n% d'une population.
DME	Indication de la dose maximale sans effet toxique.
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EAG	équivalents d'acide gallique.
EBr	Extrait brut.
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique.
EPO	Erythropoietin
EQ	Equivalent quercétine.
ER	Equivalent rutine.
ERO	Espèce réactive de l'oxygène.
ES	Erreur standard.
ESI	L'ionisation par électronébuliseur.
FID	Détecteur à ionisation de flamme.
FL/cell	Femtolitre /cellule.
g	Gramme.
g/dl	Gramme/décilitre.
GB	Globules blancs.
GC	Chromatographie gazeuse.
GLUC	Glucose.
GR	Globules rouges.



HCT	Hématocrite.
HGB	Hémoglobine.
I%	Pourcentage d'inhibition.
IC <sub>50</sub>	Concentrations qui inhibent 50% du radical.
IE	Electrons impact.
LDH	Lactate déshydrogénase.
M	Moyenne.
M[%]	Pourcentage de mortalité
MeOH	Methanol.
mg/l	Milligramme/litre.
ml	Millimètre.
MS	Spectre de masse.
Mw	Masse moléculaire
n	Répétition.
N	La normalité.
P	Probabilité.
PAL	Phosphatase alcaline.
pg	Picogramme/cellule.
PLT	Plaquettes.
PT	Protéines totales.
SD	Standard deviation.
SEM	Erreur standard de la moyenne.
t/min	Tour par minute
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.
TEA	Trethylamine
TPO	Thrombopoietin
U/l	Unité/litre.
UV-vis	Ultra violet-visible.
V	Volume.
VGM	Volume globulaire moyen.
%	Pourcentage.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Arbre phylogénique de <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boisse .	6
<b>Figure 2 :</b>	L'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boisse.	8
<b>Figure 3 :</b>	Structure chimique de la lysine.	13
<b>Figure 4 :</b>	Squelette de base des flavonoïdes.	16
<b>Figure 5 :</b>	<i>Retama sphaerocarpa</i> .	23
<b>Figure 6 :</b>	Protocole de préparation de l'extrait aqueux.	25
<b>Figure 7 :</b>	Protocole de préparation de l'extrait méthanolique.	26
<b>Figure 8 :</b>	La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	27
<b>Figure 9 :</b>	La courbe d'étalonnage de la Quercétine et de la Rutine.	28
<b>Figure 10:</b>	Forme libre et réduite du DPPH.	30
<b>Figure 11:</b>	Injection de l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> par gavage orale.	33
<b>Figure 12 :</b>	Identification des pic présent sur le chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> visualisées à 260 nm	42
<b>Figure 13 :</b>	Profils des pics de l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	44
<b>Figure 14 :</b>	Représentation de l'inhibition du radical DPPH par l'estimation des valeurs de l'IC <sub>50</sub> des différents extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> et des composés phénoliques.	47
<b>Figure 15 :</b>	Activité antioxydante des extraits brut et aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> ..	49
<b>Figure 16 :</b>	Courbe exprimant la mortalité des rats (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée.	52
<b>Figure 17 :</b>	Les signes de toxicité aiguë apparentes sur les rats.	57
<b>Figure 18 :</b>	Structures chimique de quelques agonistes. L'ACh est le neurotransmetteur endogène.	58
<b>Figure 19 :</b>	Changement du poids corporel des rats dans les conditions de toxicité subaiguë.	60
<b>Figure 20 :</b>	Variation des valeurs de la masse relative des organes des rats au cours du traitement subaiguë.	62
<b>Figure 21 :</b>	Photomicrographies sélectionnées du foie des rats.	68
<b>Figure 22 :</b>	Photomicrographies sélectionnées des reins des rats.	69

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de <i>Retama sphaerocarpa</i> . _____	41
<b>Tableau 2 :</b> Composés contenus dans l'extrait méthanolique de <i>Retama sphaerocarpa</i> .. _____	43
<b>Tableau 3 :</b> Alcaloïdes identifiés dans l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> . _____	45
<b>Tableau 4 :</b> Les concentrations des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> et des composés phénoliques qui inhibent 50% du radical DPPH. _____	46
<b>Tableau 5 :</b> Effet antioxydant des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> par le test du $\beta$ -carotène/ acide linoléique après 24 heures. _____	50
<b>Tableau 6 :</b> Les doses injectées et la transformation en pourcentage du nombre de morts dans chaque lot. _____	51
<b>Tableau 7 :</b> Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits. _____	52
<b>Tableau 8 :</b> L'effet d'une dose unique de <i>Retama sphaerocarpa</i> sur les rats. _____	55
<b>Tableau 9 :</b> Représentation des pourcentages de diminution du poids corporel des rats durant les 28 jours du traitement subaiguë par l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> . _____	61
<b>Tableau 10 :</b> Analyses hématologiques des rats après traitement subaiguë de l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> . _____	63
<b>Tableau 11 :</b> Analyses biochimiques des rats traités par l'extrait aqueux de <i>Retama sphaerocarpa</i> . _____	65

# TABLE DE MATIÈRES

Introduction .....	1
<b>Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique</b> .....	<b>4</b>
1. Généralité .....	5
2. L'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	5
2.1 Systématique .....	5
2.2 La famille des Fabaceae .....	7
2.3 Description de l'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	7
2.4 Ecologie de l'espèce .....	9
2.5 Utilisation .....	10
2.6 Données phytochimiques .....	11
2.7 Données pharmacologiques .....	11
2.8 Données toxicologiques .....	12
2.9 Substances toxiques de <i>Retama sphaerocarpa</i> (Les alcaloïdes) .....	12
3. Les radicaux libres et les antioxydants .....	13
3.1 Les radicaux libres, une conséquence du métabolisme de l'oxygène .....	14
3.2 Dommages liés aux radicaux libres .....	14
3.3 Les antioxydants .....	14
3.3.1 Test antioxydant .....	15
3.3.2 Les sources d'antioxydants .....	15
3.3.3 Les végétaux sources d'antioxydants naturels .....	15
4. La toxicité .....	17
4.1 La toxicité aiguë .....	18
4.1.1 La détermination de la dose létale (DL <sub>50</sub> ) .....	18
4.1.2 Différentes méthodes de détermination de la DL <sub>50</sub> .....	19
4.2 La toxicité subaiguë .....	19
4.3 La toxicité à long terme .....	19
4.4 Manifestation de la toxicité .....	19
4.4.1 L'absorption .....	20
4.4.2 La distribution .....	20
4.4.3 La biotransformation .....	20
4.4.4 L'excrétion .....	21
<b>Chapitre 02 : Matériels et Méthodes</b> .....	<b>22</b>
1. Matériels .....	23
1.1 Matériel végétal .....	23
1.2 Matériel animal .....	24

1.3 Produits chimiques .....	24
2. Méthodes .....	24
2.1 Préparation des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	24
2.1.1 Extrait aqueux.....	24
2.1.2 Extrait méthanolique .....	25
2.1.3 Calcul du rendement.....	26
2.2 Dosage des métabolites des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	27
2.2.1 Dosage des polyphénols .....	27
2.2.2 Dosage des flavonoïdes .....	27
2.3 Analyses des extraits de l'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> par HPLC/IV-vis-DAD/ ESI-MS et GC/MS.....	28
2.3.1 Analyse de l'extrait méthanolique .....	29
2.3.2 Analyse de l'extrait aqueux.....	29
2.4 Activité antioxydante.....	30
2.4.1 Méthode au 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	30
2.4.2 Méthode au $\beta$ -carotène .....	31
2.5 Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de <i>Retama spaerocarpa</i> .....	32
2.5.1 Méthode graphique ou méthode de Miller et Tainter .....	33
2.5.2 Méthode par le calcul ou méthode de Dragstedt et Lang .....	34
2.6 Evaluation de la toxicité subaiguë de l'extrait aqueux de <i>Retama spaerocarpa</i> .....	35
2.6.1 Les animaux de l'expérience.....	35
2.6.2 Méthode d'observation et d'examen.....	35
2.6.2.1 Prélèvement sanguin.....	35
2.6.2.2 Examen hématologique .....	36
2.6.2.3 Examen biochimique .....	36
2.6.2.4 Réalisation des coupes histologiques .....	36
2.7 Analyses statistiques.....	37
<b>Chapitre 03 : Résultats et Discussion</b> .....	38
1. Evaluation des techniques d'extraction.....	39
2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes .....	40
3. Identification par HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS des métabolites secondaires de l'extrait méthanolique de <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	41
4. Identification des alcaloïdes des extraits aqueux et méthanolique de <i>Retama sphaerocarpa</i> par GC/MS .....	44
5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>Retama sphaerocarpa</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger) .....	46
6. Test de $\beta$ -carotène/acide linoléique .....	48
7. Etude de la toxicité aigu .....	50
7.1 Détermination de la DL <sub>50</sub> .....	50

7.1.1 Méthode par le calcul ou méthode de Dragstedt et Lang .....	51
7.1.2 Méthode graphique ou méthode de Miller et Tainter .....	52
7.2 Effet d'une dose unique sur la vie et le comportement générale des rats .....	54
8. Etude de la toxicité subaiguë.....	59
8.1 Les signes généraux.....	59
8.2 Chronologie de l'évolution pondérale.....	59
8.3 La masse relative des organes .....	61
8.4 Données hématologiques.....	63
8.5 Données biochimiques.....	64
8.6 Histopathologie .....	67
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>71</b>
<b>Références .....</b>	<b>74</b>

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes.

Selon les estimations de l'OMS, (2002) (Organisation mondiale de la santé) plus de 80 % de la population en Afrique utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. La toxicité des produits chimiques, le coût élevé des médicaments chimiques, l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural qui limite une prise en charge véritable des problèmes de santé publique, tous ont favorisé le recours à cette pratique. L'Algérie ne fait pas exception et l'utilisation des plantes médicinales en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire. Les cas de toxicité à cause de l'utilisation de ces plantes reconnues médicinales ne cessent d'augmenter.

De nombreux extraits de plantes ont montré une activité biologique. Les aliments et les produits d'origine végétale sont une source riche d'une variété de composés biologiquement actifs. Ces composés sont des métabolites secondaires impliqués dans des fonctions écologiques pour améliorer la survie des plantes au cours des stress environnementaux (Winkel-Shirley, 2002). Ils possèdent des activités biologiques diverses, notamment le potentiel antioxydant. Parmi ces métabolites citons les polyphénols que l'on trouve en abondance dans l'alimentation riche en fruits et légumes. Ce sont des composés bioactifs avec des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Surh *et al*, 2001).

Si les plantes sont faciles à utiliser, certaines d'entre elles sont d'un emploi souvent délicat et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins néfastes pouvant dans certains cas entraîner la mort. L'intoxication liée aux plantes se fait généralement par l'ingestion directe des plantes. Dans la majorité des cas l'individu utilise une plante qu'il croit comestible ou qu'il perçoit comme bénéfique pour sa santé. Il est donc indispensable de connaître la



composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme et il est recommandé de n'utiliser une plante que sur les conseils d'un spécialiste car mal dosée cette dernière peut devenir hautement toxique. Cependant lorsqu'un traitement à base de plantes est suivi correctement, les risques d'effets secondaires sont fort limités.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel consiste à l'étude phytochimique et biologique (activité antioxydante, toxicité) de *Retama sphaerocapa* afin de valoriser *in vivo* et *in vitro* les ressources de cette espèce. Le choix de cette plante est justifié, en partie, par son utilisation en Algérie pour préparer une drogue communément appelée "chemma" et pour soigner la rage chez les animaux et chez l'homme, alors que ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques sont encore peu étudiées.

Deux extraits aqueux et méthanolique ont été préparés à partir de la poudre des rameaux de *Retama sphaerocara* afin de réaliser les objectifs suivants:

- L'analyse du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits;
- Détermination des principaux métabolites dans l'extrait méthanolique par la méthode HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS;
- Identification des principaux alcaloïdes dans l'extrait aqueux par la méthode GC/MS;
- L'évaluation du pouvoir antiradicalaire par la méthode au DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) et de l'effet anti-péroxydation par le test du  $\beta$ -carotène/acide linoléique des deux extraits;
- L'évaluation de la toxicité aiguë apparente de l'extrait aqueux sur des rats Albino Wistar;
- La détermination de la  $DL_{50}$  dose létale qui tue 50% d'une population après traitement par voie orale;
- L'étude des effets sur les paramètres physiques, biochimiques et hématologiques, ainsi que l'évaluation des effets sur le foie et les reins des animaux traités après une suivie de toxicité subaiguë par voie orale.

## Chapitre 01

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre 01

# Synthèse Bibliographique

### 1. Généralité

La pharmacopée traditionnelle regorge d'une multitude de recettes à base de plantes pour prévenir, guérir, soulager ou améliorer le bien-être de l'homme. Ces utilisations sont facilitées par une longue tradition d'extraction et de distillation, ainsi que par un cumul d'expérience d'utilisation des plantes. Dans ce contexte, beaucoup de travaux de recherches restent à entreprendre pour démontrer l'intérêt thérapeutique de ces plantes, leur principe actifs, leur mode d'action et même leur probable toxicité. L'augmentation du nombre d'utilisateurs qui s'oppose à la rareté des preuves scientifiques sur l'innocuité des plantes médicinales soulève des préoccupations au sujet de la toxicité et des effets néfastes de ces remèdes (Saad *et al.*, 2006). Ceci est vrai pour l'espèce objet de notre étude qui contiendrait plusieurs principes bioactifs possédant le potentiel de causer des effets bénéfiques ou néfaste.

### 2. L'espèce *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse.

- Nom scientifique: *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse.
- Noms locaux:

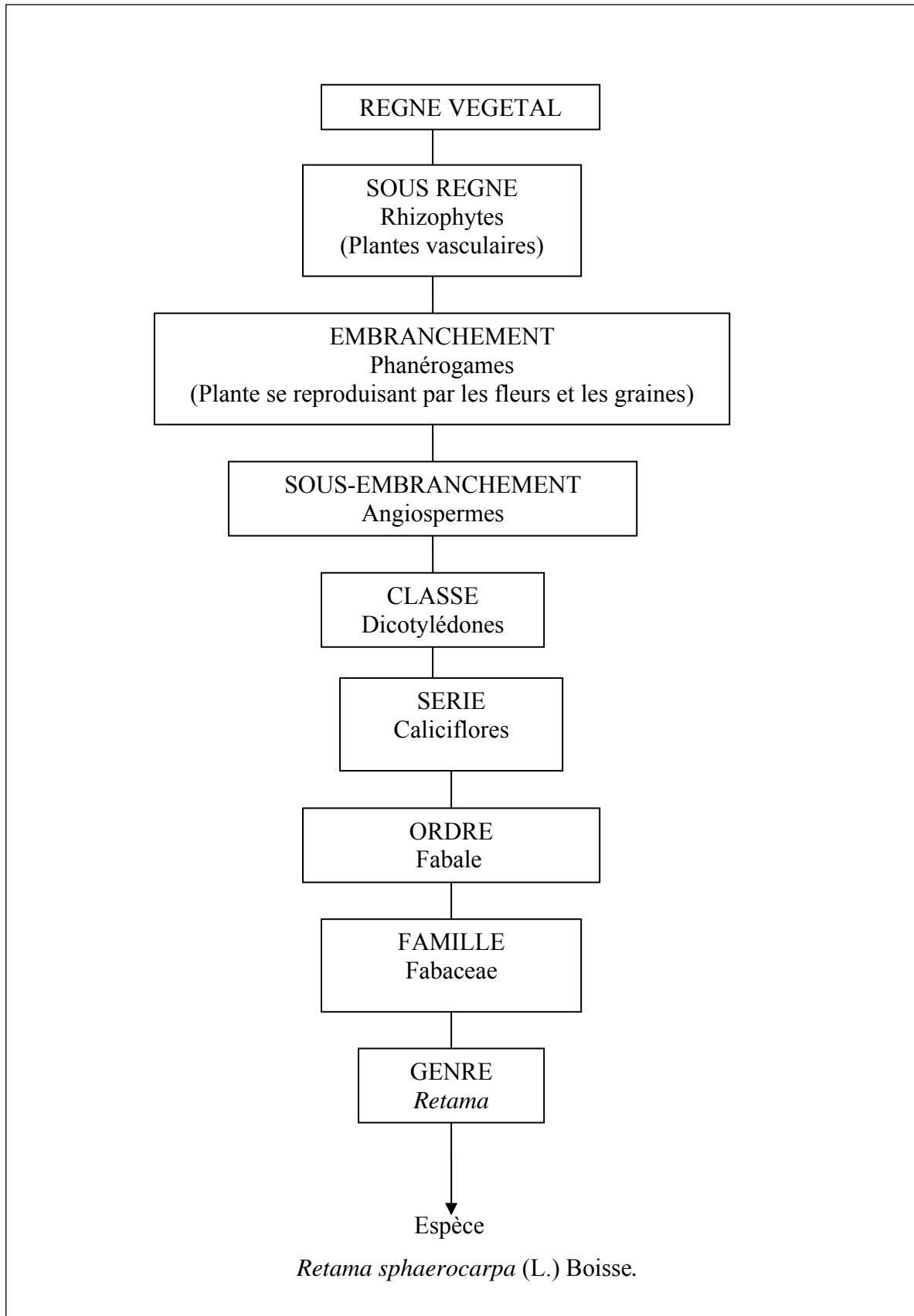
Arabe: Rtem. (Quezel et Santa, 1962-1963);

Berbère: Tillugwât, îllugwât, allugût, talggût. (Bellakhdar, 1997);

Français: Rétam. (Quezel et Santa, 1962-1963).

#### 2.1 Systématique

La classification botanique de cette plante est résumée sous forme d'arbre phylogénique donnée en figure 1.



**Figure 1** : Arbre phylogénique de *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse (Quezel et Santa, 1962-1963).

## 2.2 La famille des Fabaceae

La grande famille des Fabaceae (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où le nom de légumineuses sous lequel cette famille est plus connue. La gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines exalbuminées. Les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées. Présence de nodules racinaires dans lesquels se trouvent les bactéries fixant l'azote atmosphérique (De Witt, 1963).

C'est une grande famille constituée de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres. Cette famille se divise en plusieurs tribus dans lesquelles les genres sont groupés selon le port de la plante, la forme des feuilles et le degré de fusion des étamines (Bhattacharyya et Johri, 1998).

C'est le plus grand ensemble angiospermien, cosmopolite, prédominant en individus et en espèces dans de nombreux biomes, et surtout en régions tropicales (Spichiger *et al.*, 2004).

En Algérie, les fabacées ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification. Les rétames (*Retama reatam*, *Retama monosperma* et *Retama sphaerocarpa*) sont un bel exemple de plantes occupant une place considérable dans les régions arides et semi-arides (Djabeur-Kaid-Harche *et al.*, 2007).

## 2.3 Description de l'espèce *Retama sphaerocarpa*

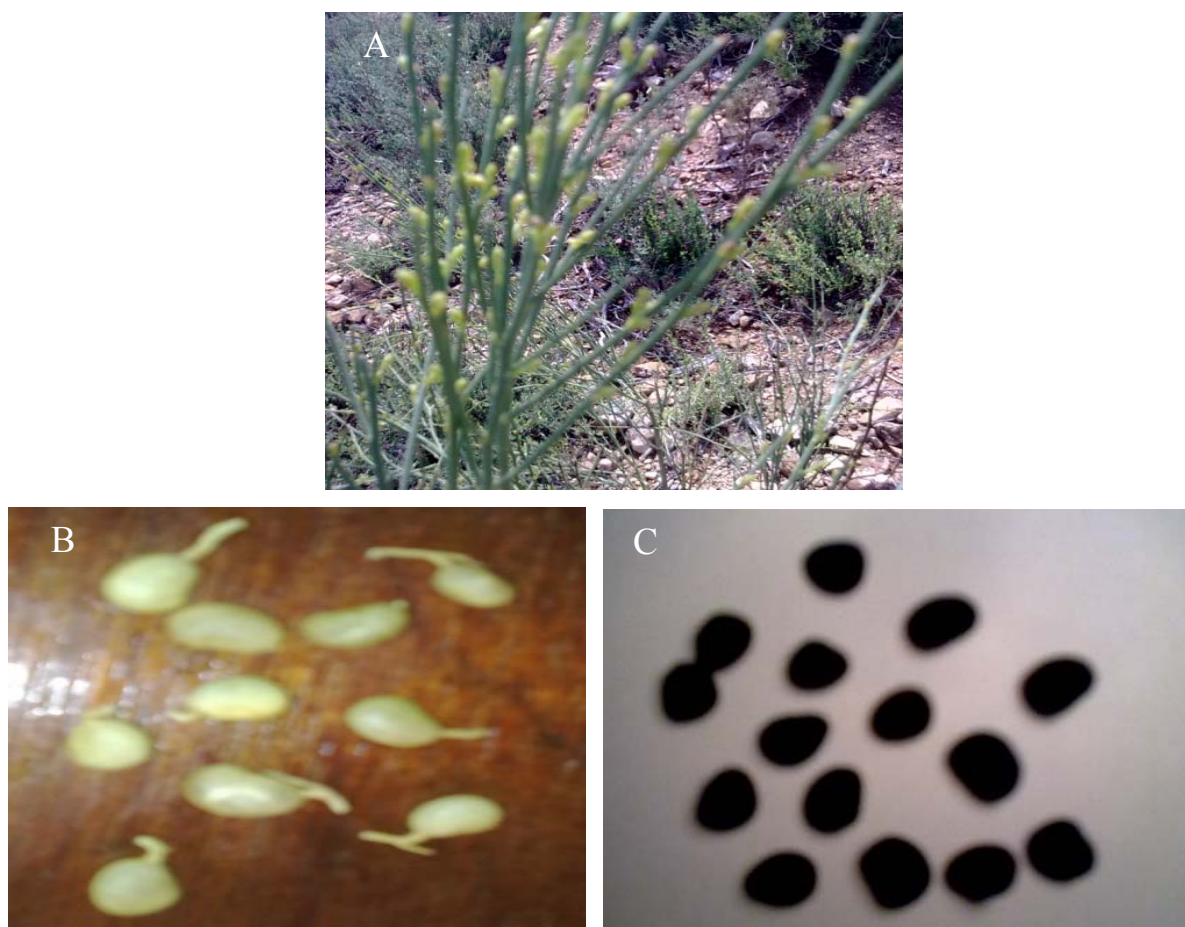
*Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse est une légumineuse arbustive vivace, de 1 à 2 m de haut, à rameaux pubescents plus au moins dressés. Elle porte un grand nombre de branches vertes de différentes longueurs donnant à l'espèce une structure ouverte, et représentant la majorité de sa biomasse aérienne. Les feuilles caduques sont très petites et les fleurs sont jaunes et très petites aussi (5-6 mm), en grappes latérales de 8 à 15 flores disposées sur les rameaux âgés. Les fruits sont couverts par une couche dure et germe en hiver (Janvier–

Février). C'est des gousses globuleuses, jaune brun (Fig. 2) (Domingo *et al.*, 1997; 1998; 1999).

La transpiration et la photosynthèse sont essentiellement assurées par des cladodes verts cylindriques, arrangés sur des tiges à orientation au hasard, les cladodes sont produits annuellement au niveau des bourgeons axillaires (Brenner *et al.*, 1995; Pugnaire *et al.*, 2006).

La plante produit, au printemps, dans chaque nœud de nouvelles pousses, des feuilles lancéolées sessiles, mais qui ne persistent que pendant 3 à 4 semaines, jusqu'à ce que leurs cladodes axillaires achèvent la croissance. L'arbuste devient donc dépourvu de feuilles, ces dernières contribuent ainsi à une part négligeable (<1%) de la photosynthèse pendant une courte période, au printemps (Haase *et al.*, 1999).

L'espèce est douée d'un système racinaire dimorphe, avec une racine principale pivotante, dépourvue de fines ramifications et pouvant dépasser 30 m de profondeur et des racines latérales ramifiées arrivant jusqu'à 15 mètres de profondeur (Haase *et al.*, 1996).



**Figure 2** : L'espèce *Retama sphaerocarpa*. (A) Fleurs. (B) Fruits. (C) Graines.

## 2.4 Ecologie de l'espèce

*Retama sphaerocarpa* est une espèce endémique du bassin méditerranéen elle est commun entre 0-1400m d'altitude et dans les divers climats (humides et arides) et les milieux ouverts, secs et ensoleillés des écosystèmes méditerranéens, notamment les dunes côtières, les maquis, et aussi les déserts, formant le couvert forestier principal dans de nombreuses régions semi-arides (Allen et Allen, 1981).

Elle est parmi les trois espèces appartenant au genre *Retama* trouvés en Algérie. Aujourd'hui, *Retama sphaerocarpa* se répand en raison de sa forte capacité à coloniser les champs agricoles abandonnés (Espigares *et al.*, 2004). Les zones arbustives de *Retama sphaerocarpa* sont traditionnellement utilisées comme un système sylvo-pastoral (Gómez-Sal *et al.*, 1999).

*Retama sphaerocarpa* est un élément clé pour prévenir les processus d'érosion et la désertification en zone semi-aride et aride (Caravaca *et al.*, 2003b; Requena *et al.*, 1997). L'arbuste a un couvert ouvert qui amortit les températures et le rayonnement qui atteint le sol, son système racinaire profond lui permet d'atteindre des sources d'eau profonde, il est donc capable de maintenir le potentiel relativement élevé de l'eau de son xylème et l'activité physiologique et biologique du canopée pour la plupart de l'année (Callaway, 1997; Lansac *et al.*, 1994).

Elle a la capacité de fixer l'azote en raison de sa symbiose au niveaux de ses racines avec les rhizobiums qui sont des bactéries du sol qui peuvent fixer le N<sub>2</sub> dans les nodules formés avec la plante, elle a la capacité aussi à développer des associations symbiotiques avec les champignons mycorhiziens ce qui lui permet d'augmenter sa survie sur des sites contaminés, de s'adapter aux régions à faible fertilité (déficit en azote) et de coloniser des zones soumise à un stress environnementale très élevé (Boulila *et al.*, 2009; Barea *et al.*, 1992). La résistance de l'espèce aux conditions environnementales extrêmes (la salinité, la sécheresse et les températures élevées) lui permette aussi de former ce qu'on appelle des «îlots de fertilités". Ainsi, cette espèce est utile pour la revégétalisation des écosystèmes et la restauration des milieux dégradés (Caravaca *et al.*, 2003a; Singh *et al.*, 2002; Moro *et al.*, 1997a).

Dans les zones arides et semi-arides, les arbres et les arbustes exercent une influence importante sur la strate herbacée (Vetaas, 1992; Belsky et Canham, 1994). L'arbuste *Retama sphaerocarpa* a des effets bénéfiques (édaphiques et physiques) sur la végétation sous étagée (Moro *et al.*, 1997a-b; Pugnaire et Lázaro, 2000).

C'est une source importante d'hétérogénéité spatiale en particulier dans les savanes (López-Pinter *et al.*, 2006; Moreno-Jiménez *et al.*, 2008). D'autre part, il y a une relation de mutualisme entre *Retama sphaerocarpa* et les herbes sous étagées; elle leur fournit un microenvironnement favorable et les herbes lui assurent une matière organique labile (Pugnaire *et al.*, 1996).

Ainsi, *Retama sphaerocarpa* et les légumineuses d'une manière générale agissent comme des premiers colonisateurs et sont utiles pour la restauration du couvert végétal et des écosystèmes dégradés et arides (Forti *et al.*, 2006; De Andrés *et al.*, 2007; Villar-Salvador *et al.*, 2008).

## 2.5 Utilisation

En Algérie, *Retama sphaerocarpa* est utilisée comme drogue nommée "chemma" préparée à partir des rameaux de l'espèce.

Selon Bellakhdar, (1997) l'espèce est utilisée traditionnellement sous des formes différentes:

- Les tiges et les feuilles, pillées avec du miel, absorbées par voie orale, sont utilisées comme vomitif. En lavements rectaux, la décoction des feuilles est administrée comme purgatif et vermifuge;
- La poudre des feuilles et des fleurs séchées de l'espèce est utilisée comme cicatrisant dans les circoncisions, comme vulnéraire, antiseptique et sédatif dans les soins locaux des plaies, blessures, ulcérations de la peau et boutons purulents;
- La plante, broyée dans du lait ou du beurre, est utilisée pour les mêmes indications et la décoction s'emploie, en frictions, contre le prurit et la gale humaine et animale;
- Les racines de cette espèce sont très utilisées, comme abortif, en fumigations ou en lavements vaginaux;
- l'infusé des feuilles et des fleurs peut être bu mais en raison des risques d'intoxication, qui sont connues de tous, cette forme d'utilisation est plutôt rare;
- La plante a été utilisée pour empoisonner les puits, pendant la guerre des tribus au Maroc;



- Au Sahara, les tiges de *Retama* sont employées pour faire des pointes de feu contre diverses algies dans la sciatique;
- La flagellation à l'aide des tiges de *Retama* intervient dans le traitement des enflures et de la folie pour chasser les mauvais esprits, responsables, d'après les croyances traditionnelles de la perte de raison.

En Algérie on prépare le pain à manger avec la tisane des branches de *Retama sphaerocarpa* pour guérir de la rage chez l'homme. Ces branches sont données à manger telles quelles aux animaux atteints de rage.

## 2.6 Données phytochimiques

De *Retama sphaerocarpa*, plusieurs alcaloïdes ont été isolés, entre autres la cytosine, la spherocarpine, l'anagyrine, la lupamine et la rétamine. El-Shazly *et al.*, (1996) ont pu isoler des alcaloïdes quinolizidiniques, des fleurs et des tiges de cette plante. La sparteine a été l'alcaloïde le plus abondant dans les tiges et l'anagyrine dans les fleurs. Plusieurs travaux ont révélé aussi la présence, dans la partie aérienne de *Retama sphaerocarpa*, des flavonoïdes tel que le rhamnasine (Louaar *et al.*, 2007).

## 2.7 Données pharmacologiques

Les études de López-Lázaro *et al.*, (2000) ont démontré l'activité cytotoxique de sept flavonoïdes isolés de 3 types d'extraits (chloroforme, éthyle acétate et butanol) obtenus à partir des parties aériennes de *Retama sphaerocarpa*, contre trois lignées cellulaires cancéreuses humaines. Le flavonoïde rhamnasine a été le plus cytotoxique. D'autre part les alcaloïdes de *Retama sphaerocarpa* sont connus par leurs effets pharmacologiques (ocytocique, hallucinogène) (El Shazly *et al.*, 1996). Toutefois l'activité antimicrobienne des feuilles de *Retama sphaerocarpa* a été observée contre *Staphylococcus aureus* (Louaar *et al.*, 2007).

## 2.8 Données toxicologiques

Les Rétames ont provoquées des intoxications humaines, dont quelques unes mortelles, par suite de leur emploi, par voie interne, comme abortif (Bellakhdar, 1997). C'est un pâturage généralement évité par les animaux. En dehors des fleurs que le chameau apprécie beaucoup, le bétail trouve les rameaux de *Retama sphaerocarpa* difficiles à ingérer (Martin *et al.*, 1993). L'ingestion excessive de cette plante cause, chez le chameau, la maladie dite mahsûr ou tahsîr qui se manifeste par une rétention urinaire grave suite à l'obstruction de l'urètre (Mullero, 1945; Bellakhdar, 1978). Cette maladie est identique à celle provoquée par *Genista saharae*. Si aucun traitement n'est mis en œuvre pour soulager l'animal, la mort survient en quelques jours. Quand elles viennent à être broutées, en période de sécheresse, ces espèces provoquent des avortements chez les chamelles, les brebis et les chèvres. De plus elles communiquent au lait une saveur très amère et une odeur désagréable. La partie de la plante la plus toxique est le fruit (Bellakhdar, 1997).

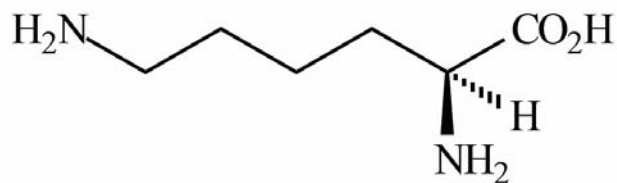
## 2.9 Substances toxiques de *Retama sphaerocarpa* (Les alcaloïdes)

Les alcaloïdes, de façon générale, contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes. Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante et la partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils sont synthétisés (Harborne et Herbert, 1995; Dewick, 2001).

Le rôle des alcaloïdes dans les plantes est souvent inconnu, et leur importance dans le métabolisme de la plante n'est pas très bien définie. Une plante peut contenir plus de cent alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes (Kutchan, 1995; Mann *et al.*, 1994).

En outre, les alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière ultraviolet (UV). Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Parfois, ils n'ont pas de rôle

précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal *Retama sphaerocarpa* est une espèce riche en alcaloïdes quinolizidiniques dont le précurseur est l'acide aminé lysine (Fig. 3) (Bhat, 2005).



**Figure 3** : Structure chimique de la lysine (Bhat *et al.*, 2005).

Ces alcaloïdes sont doués de propriétés toxiques. Ils provoquent des problèmes d'empoisonnement chez l'animal et chez l'homme. Ils peuvent entraîner l'hypoglycémie, l'hypotension et la dépression respiratoire. D'autre part, l'anagyrine et l'ammodendrine, qui sont des alcaloïdes de *Retama sphaerocarpa*, sont considérés comme étant des mutagènes (Keeler, 1976; El Shazly *et al.*, 1996).

### 3. Les radicaux libres et les antioxydants

L'oxygène est une molécule indispensable aux processus vitaux, à la respiration cellulaire et à la vie en générale. Le concept selon lequel cette molécule peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés activés tels que les radicaux libres, est encore mal perçu dans le milieu médical. Pourtant, de très nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont plus que suggéré le rôle de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le développement de nombreux processus pathologiques.

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes, de vitamines et de protéines. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO (Pincemail *et al.*, 2002).

### 3.1 Les radicaux libres, une conséquence du métabolisme de l'oxygène

Le métabolisme de l'oxygène peut générer des éléments réactifs appelés radicaux libres, notamment l'ion super oxyde ( $O_2^-$ ) et l'ion hydroxyle ( $OH^-$ ). Ces composés chimiquement instables sont porteurs d'électrons libres qui réagissent avec d'autres molécules, les déstabilisant à leur tour, et induisent ainsi une réaction en chaîne (Menvielle-Bourg, 2005).

### 3.2 Dommages liés aux radicaux libres

De part leur nature instable les radicaux libres sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants et induisant la dénaturation des protéines, l'inactivation des enzymes, l'oxydation du glucose. Ils peuvent causer des altérations au niveau de l'ADN, augmentant les possibilités de mutation. Les processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. C'est ainsi que certains radicaux libres semblent jouer un rôle dans les phénomènes de vieillissement, qui pourraient être la conséquence des dommages oxydants irréversibles accumulés tout au long de l'existence (Pincemail *et al.*, 2002).

### 3.3 Les antioxydants

Au sens large, un antioxydant est un composé qui inhibe ou retarde l'oxydation des substrats, même si le composé est présent en concentration plus faible de façon significative que le substrat oxydé. Les composés antioxydants peuvent être recyclés dans la cellule ou bien ils sont irréversiblement endommagés, mais leurs produits d'oxydation sont moins nuisibles, pouvant être convertis en substances inoffensives (Halliwell, 1995; Halliwell et Gutteridge, 2007; Matkowski, 2008).

L'intérêt porté aux antioxydants est grandissant. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler la production des ERO. Les antioxydants pourraient atténuer le stress oxydatif d'un tissu indirectement en renforçant les défenses naturelles des cellules et/ou directement par le scavenger des radicaux libres (Pincemail *et al.*, 2002).

### 3.3.1 Test antioxydant

Les tests antioxydants peuvent révéler différents mécanismes d'action en fonction des caractéristiques de l'essai particulier. On utilise des méthodes simples comprennent des radicaux libres "scavenging" artificiels, stables et colorés, tels que le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Re *et al.*, 1999; Molyneux, 2004).

### 3.3.2. Les sources d'antioxydants

Au niveau de l'organisme et de la cellule, la protection antioxydante est fournie par de nombreuses enzymes et antioxydants endogènes de petit poids moléculaire tels que l'acide ascorbique, le glutathion, l'acide urique, et plusieurs autres. De nombreux composés ont une activité anti-oxydante en plus de leurs fonctions physiologiques spécialisées. Outre les antioxydants produits par l'organisme pour sa défense, les sources sont diverses (Azzi *et al.*, 2004).

### 3.3.3 Les végétaux sources d'antioxydants naturels

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générale des composés phénoliques (Keïta, 2005). Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation diététique des antioxydants phénoliques naturels est en corrélation avec la réduction des risques de cancers, des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives, du vieillissement, de l'asthme et de l'inflammation (Aruoma, 1998; Triantaphyllou *et al.*, 2001).

### Les composés phénoliques (Les polyphénols)

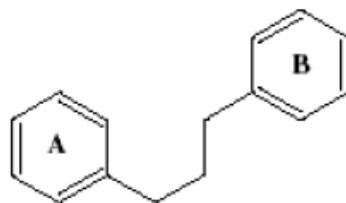
L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atome de carbone, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans le régime alimentaire. Leurs principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, les céréales, le chocolat, les boissons d'origine végétale tels que les jus de fruits, le thé, le café et bien

d'autres (Scalbert *et al.*, 2005). La plupart des polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes, à des divers degrés. Parmi les groupes de polyphénols antioxydants, il y a les flavonoïdes (Harborne, 2001; Matkowski, 2006). Ils constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels ayant une structure chimique commune. C'est une grande famille de métabolites secondaires polyphénoliques de faible poids moléculaire (Koes *et al.*, 1994). Ils sont quasiment universels chez les plantes vasculaires et leur nombre continue d'augmenter (Erlund, 2004; Harborne et Williams, 2000).

Les flavonoïdes se trouvent dans les fruits et les légumes. Ils existent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde (Di Carlo *et al.*, 1999).

- **Structure des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent une structure phenylbenzopyran tricycliques (Matkowski, 2008). Un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C<sub>6</sub> (A et B), reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (Fig. 4) (Bruneton, 1999).



**Figure 4 :** Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

- **Rôle des flavonoïdes dans les plantes**

Dans les plantes, les flavonoïdes jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que la pigmentation des fleurs, des fruits et légumes, pour attirer les pollinisateurs et disséminateurs de graines, la protection contre les rayons ultraviolets (UV), la défense des plantes contre les micro-organismes et la germination du pollen en agissant

comme des molécules de signalisation dans les interactions plantes-microorganismes (Havsteen *et al.*, 2002; Dixon et Paiva, 1995; Dooner et Robbins, 1991).

- **Les sous-classes des flavonoïdes**

Selon les modifications du cycle-C<sub>3</sub> les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes structurelles tel que les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols, les catéchines et les anthocyanidines (Bovy *et al.*, 2007). La grande diversité dans les structures des flavonoïdes est due à des modifications de leur squelette de base. Dans le règne végétal, et même au sein d'une seule espèce végétale, il y a une grande variation dans le taux et la composition des flavonoïdes (Forkmann et Heller, 1999; Hamza *et al.*, 2010).

#### **4. La toxicité**

L'étude de la toxicité concerne des domaines très variés. En effet, des médicaments aux armes chimiques en passant par les végétaux, les animaux, les produits industriels et bien d'autres. L'Homme est constamment exposé à la toxicité. Ainsi une étude réalisée en 1986 en France a montré que les réanimateurs et les médecins d'urgence occupent 20 à 90% de leurs activités à des effets toxiques. Tandis que d'autres études montraient que les intoxications aiguës représentent la première cause d'hospitalisation des pays développés et la deuxième cause de mortalité des individus de moins de 30 ans dans les pays en voie de développement (Bismuth *et al.*, 1987).

Pour qu'une drogue possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable. Les essais de toxicité accompagnent donc les essais d'activités biologiques au cours de la sélection de nouvelles molécules car dans certains cas l'absorption d'une substance a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme (Bismuth *et al.*, 1987).

#### 4.1. La toxicité aiguë

Elle représente la manifestation la plus spectaculaire de la nocivité d'un poison. Ce fait, qui conduit à considérer comme vénéneuse toute substance qui tue violemment, se traduit par la mort rapide de l'individu ou des populations contaminées. La toxicité aiguë peut donc se définir comme celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai suivant l'absorption par voie transtégumentaire, pulmonaire ou buccale, en une fois ou en plusieurs répétitions d'une dose assez importante d'un composé nocif (Ramade, 1979).

L'étude de la toxicité aiguë est aussi qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après l'administration de la substance active. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux. Elle permet:

- l'indication de la dose maximale sans effet toxique (DME), c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevée par rapport au lot témoin;
- la notation de la dose minimale pour laquelle la mort survient à tous les animaux de l'expérimentation;
- la détermination de la  $DL_{50}$  avec ses limites de confiance 95% (Ruckebusch, 1981).

##### 4.1.1 La détermination de la dose létale ( $DL_{50}$ )

La  $DL_{50}$  est dans sa forme la plus simple la dose d'un composé qui provoque une mortalité de 50% dans une population d'animaux mis en expérience. C'est-à-dire ayant reçu une administration unique d'un produit dans des conditions expérimentales bien définies. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien: mort ou survie des animaux. Le protocole expérimental consiste à expérimenter sur 5 à 6 lots de 10 à 20 animaux auxquels sont administrées des doses croissantes de la substance à essayer de manière que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100 %. Ceci parce qu'il est impossible d'obtenir immédiatement 50 % de morts à partir d'un seul group. La construction d'une courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose conduit à déterminer la dose qui serait la  $DL_{50}$  (Wallace Hayes, 2008).



#### **4.1.2 Différentes méthodes de détermination de la DL<sub>50</sub>**

On peut déterminer la DL<sub>50</sub> par deux méthodes de calcul, la Méthode de Dragstedt et Lang, (1957) et la méthode de Karber et Behrens, (1935). Ainsi qu'on peut la déterminer par deux méthodes graphiques qui sont la méthode de Miller et Tainter, (1944) et la méthode de Litchfield et Wilcoxon, (1949).

#### **4.2. La toxicité subaiguë**

Diffère de la précédente (toxicité aiguë) par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication, bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques se produisant à court terme sur des organes cibles, parfois réversibles et découlant de l'absorption répétée du toxique, mais à des dose plus faible que celle de la toxicité aiguë (Ramade, 1979).

#### **4.3 La toxicité à long terme**

C'est l'exposition à de très faibles concentrations, parfois même infimes, à des substances dont la répétition d'effets cumulatifs finit par provoquer des troubles beaucoup plus insidieux et irréversibles (Ramade, 1979).

Il est à signaler que des troubles de toxicité se manifestent souvent après une longue imprégnation de l'organisme. Des essais de toxicité par administration réitérée chez l'animal sont toujours effectués lorsqu'une molécule présente un éventuel intérêt thérapeutique (Wepierre, 1981).

#### **4.4 Manifestation de la toxicité**

L'effet d'un toxique sur l'organisme dépend essentiellement de la quantité du toxique ou des substances réactionnelles qu'il engendre (métabolites actifs, radicaux libres) qui se fixe au niveau du site d'action (enzyme, récepteur cytoplasmique, ADN...). Cet effet est fonction, non seulement de la quantité du toxique actif qui atteint le site d'action, mais aussi de son affinité pour ce site (Lauwerys, 2003).

Les quatre principaux facteurs biologiques influençant la concentration du toxique actif au niveau des récepteurs sont :

#### **4.4.1 L'absorption**

La voie d'exposition (cutanée, digestive, pulmonaire, parentérale) exerce une influence déterminante sur la fraction de la dose "externe" qui pénètre dans la circulation systémique et ainsi atteint l'organe cible. D'abord la perméabilité de ces différentes barrières peut varier considérablement pour une même substance. La voie d'absorption peut même conditionner l'organe cible. Contrairement à la substance absorbée par les voies cutanée et pulmonaire, les molécules absorbées par voie digestive doivent généralement passer par le foie avant d'être éventuellement diluées dans la circulation systémique. Il n'est dès lors pas surprenant que le foie soit fréquemment l'organe cible de toxiques ingérés, surtout lors d'intoxication aiguë car il se trouve sur la voie de transport obligatoire du toxique. Le degré d'absorption d'une substance étrangère par le tractus gastro-intestinal est lui-même soumis à diverses influences (Diamand *et al.*, 1970).

#### **4.4.2 La distribution**

Entre le moment où elle est absorbée et le moment où elle est excrétée, une substance chimique peut se distribuer dans divers tissus de l'organisme et subir de nombreuses transformations métaboliques. Certaines substances peuvent se stocker préférentiellement dans certains tissus qui ne constituent pas nécessairement le site principal d'action toxique (Lauwerys, 2003).

#### **4.4.3 La biotransformation**

Dans l'organisme, la majorité des substances étrangères subissent des transformations métaboliques. La cellule parenchymateuse hépatique constitue le principal site de métabolisation. En effet, si la majorité des transformations métaboliques donnent naissance à des composés aisément excrétables par les voies urinaires et biliaires, il arrive qu'un des produits de biotransformation soit plus réactionnel, capable de se fixer rapidement sur les molécules cibles (Saito, 1977).

#### **4.4.4 L'excrétion**

Les voies urinaires et biliaires représentent les principales voies d'excrétion des substances étrangères. L'importance relative des deux voies principales d'élimination est intimement liée aux transformations métaboliques que le toxique subit in vivo. Divers facteurs endogènes modifient les vitesses d'excrétion et ainsi la concentration du toxique au niveau de son site d'action (Reidenberg, 1974).

## Chapitre 02

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

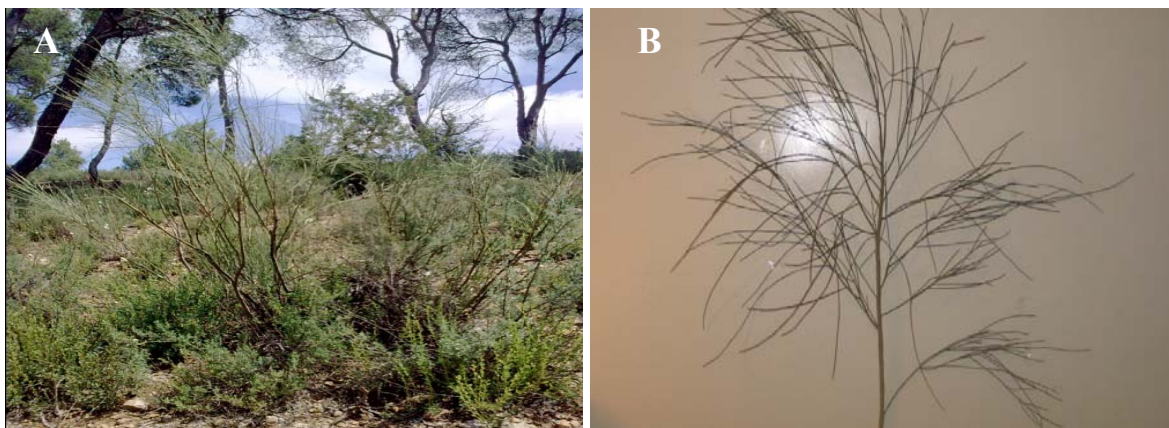
## Chapitre 02

# Matériels et Méthodes

## 1. Matériels

### 1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal comprend des rameaux de l'espèce *Retama sphaerocarpa* récoltés à El-gosbat Djebel Guetiane, Daïra de Ras-El-Aïoun, Wilaya de Batna (Fig. 5). Djebel Guetiane se situe à la limite sud de la Wilaya de Sétif et au Nord de la Wilaya de Batna. Les rameaux ont été récoltés en octobre 2009 et l'identification de l'espèce a été faite en se basant sur la flore de Quezel et Santa, (1962-1963) et validé par des enseignants du Département de Biologie de l'Université Ferhat Abbas de Sétif.



**Figure 5 :** *Retama sphaerocarpa*. (A) L'espèce dans son milieu naturelle. (B) Les rameaux de la plante.

## 1.2 Matériel animal

Le matériel animal choisi est le rat blanc *Albino Wistar*, mâles et femelles produits par l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats ont été utilisés pour l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*. Les femelles ont un poids moyen de  $180\pm 20$  g et  $200\pm 20$  g pour les mâles. Après l'expérience de la toxicité aiguë, un autre groupe d'animaux a été utilisé pour l'étude de la toxicité subaiguë, notamment des rats femelles de poids moyen de  $200\pm 30$  g et des mâles de  $150\pm 25$  g.

L'élevage des animaux est fait au niveau de l'animalerie du Département de Biologie, Université de Ferhat Abbas, Sétif, où la température moyenne varie entre 20-25°C, avec un cycle photopériodique de 12 heures de lumière/obscurité. Les rats sont logés dans des cages en plastique, chacune porte cinq rats du même sexe et recevant la nourriture et l'eau à volonté. La litière utilisée est la sciure, renouvelée deux fois par semaine pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

## 1.3 Produits chimiques

Les sels et les produits chimiques de grade analytique proviennent tous de Sigma. Les autres réactifs et solvants sont obtenus auprès de Prolabo, Aldrich, Organics et Janssen Chemica.

## 2. Méthodes

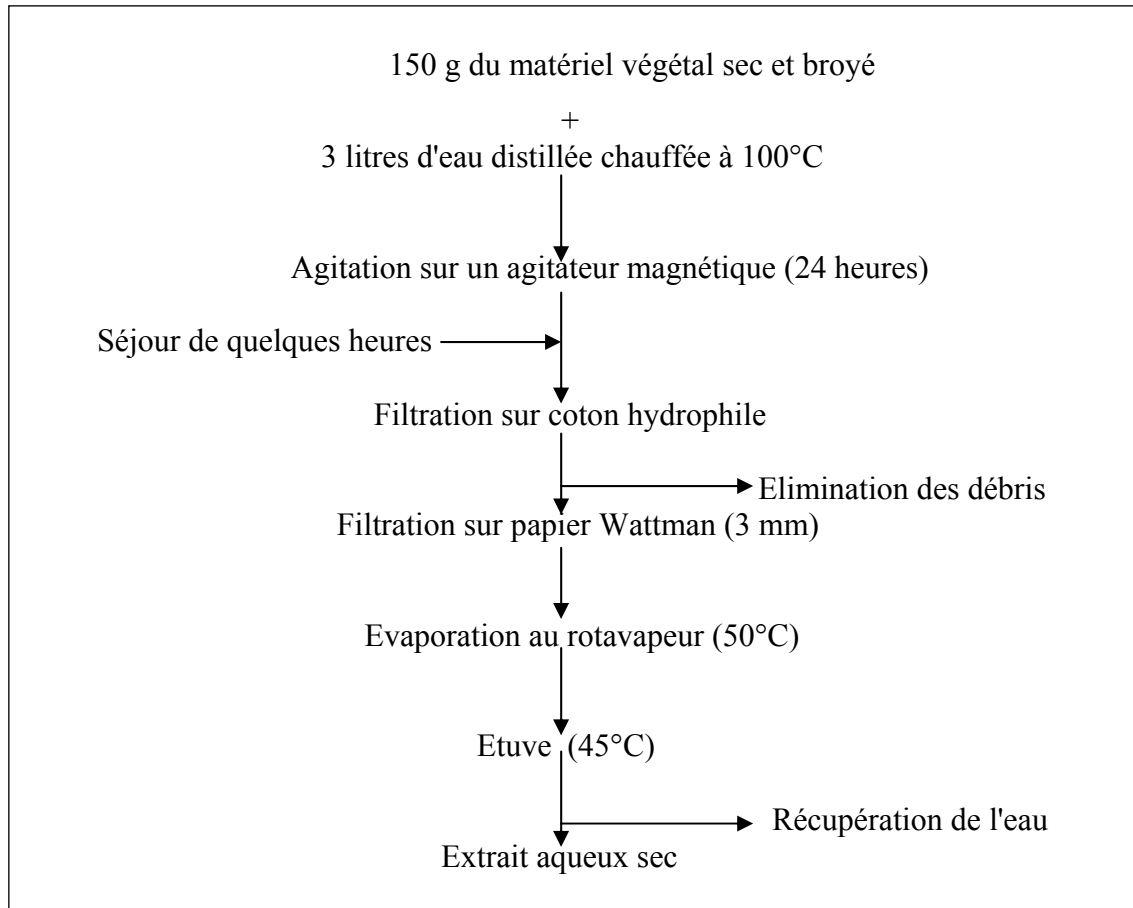
### 2.1 Préparation des extraits de *Retama sphaerocarpa*

Les rameaux de *Retama sphaerocarpa* ont été nettoyés des impuretés, séché à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, puis broyés à l'aide d'un mortier pour avoir une poudre à partir de laquelle les extraits ont été réalisés.

#### 2.1.1 Extrait aqueux

L'extrait aqueux de la plante a été obtenu à partir de 150g de poudre des rameaux infusée dans 3 litres d'eau distillée préalablement chauffée à 100°C. Ce mélange a été agité pendant 24 heures sur un agitateur magnétique. Après une période de décantation durant

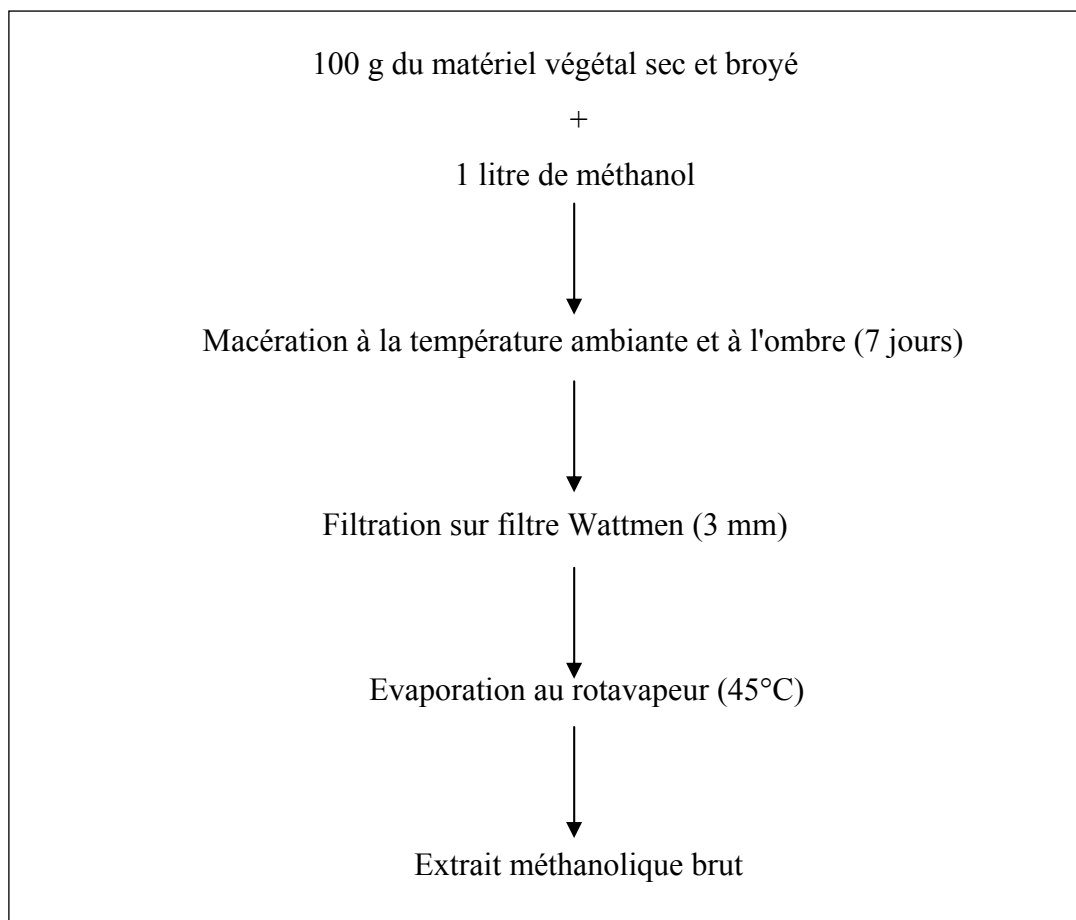
quelques heures, le surnageant a été filtré sur du coton hydrophile puis sur papier Wattman (3mm). L'eau de la solution a été évaporée à 50°C à l'aide d'un rotavapor de type BÜCHI, puis à l'aide d'une étuve (45°C). L'extrait sec obtenu a été conservé au congélateur jusqu'à son utilisation (Fig. 6) (Soro *et al.*, 2009a; Nene-Bi *et al.*, 2009, avec modification).



**Figure 6 :** Protocole de préparation de l'extrait aqueux.

### 2.1.2 Extrait méthanolique

L'extrait méthanolique des rameaux de *Retama sphaerocarpa* a été préparé à partir de 100g de poudre de rameaux qui a été mise à macérer dans 1 litre de méthanol, à la température ambiante et à l'ombre pendant 7 jours. Ensuite la solution a été filtrée sur filtre Wattman (3 mm) et le solvant a été récupéré du filtrat par évaporation dans un rotavapor de type BÜCHI, à une température de 45°C. L'extrait obtenu a été conservé au congélateur jusqu'à son utilisation (Fig. 7).



**Figure 7 :** Protocole de préparation de l'extrait méthanolique.

### 2.1.3 Calcul du rendement

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement qui est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante:

$$R = P_E / P_A \times 100.$$

Où

R= Rendement de l'extrait en pourcentage;

P<sub>E</sub>= Poids de l'extrait en gramme;

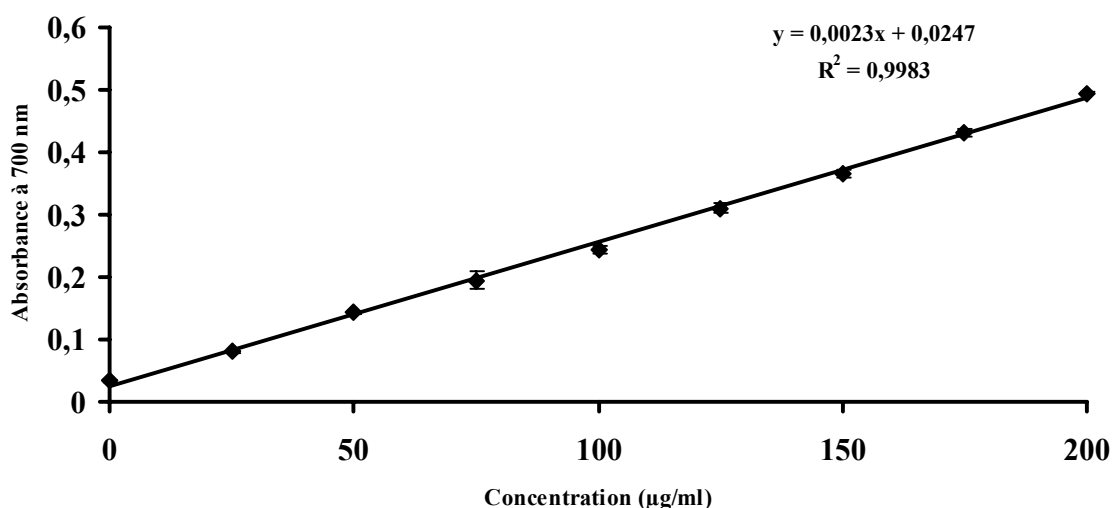
P<sub>A</sub>= Poids de la plante en gramme.



## 2.2 Dosage des métabolites des extraits de *Retama sphaerocarpa*

### 2.2.1 Dosage des polyphénols

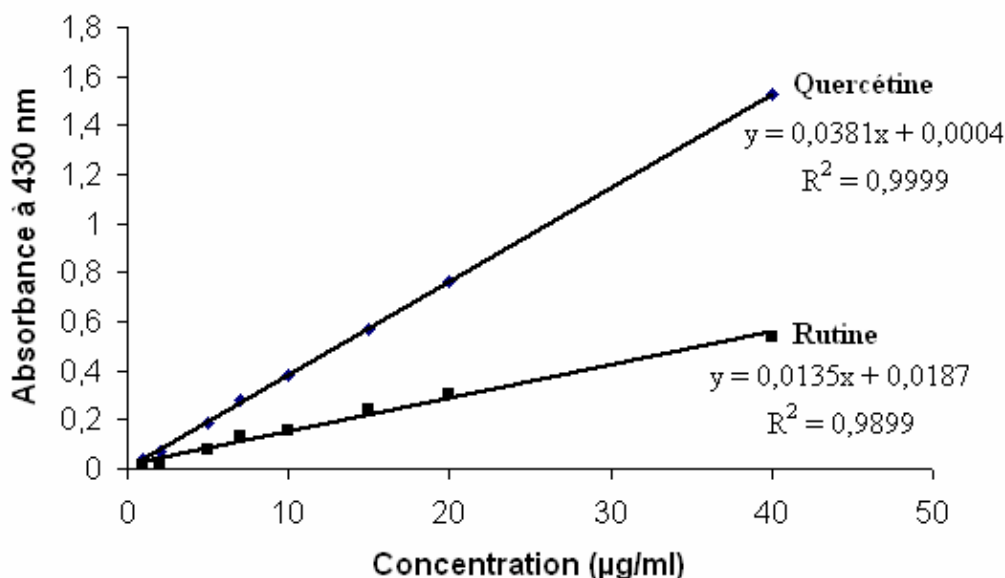
Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode au bleu de Prusse (Price et Butler, 1977) modifiée par Graham, (1992) qui est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) par les phénols pour donner des ions ferreux. Ces dernières réagissent avec le chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. A 0,1ml de chaque extrait dissous dans le méthanol ou l'eau distillée ajouter 3 ml d'eau distillée. Après agitation, 1ml du  $K_3Fe(CN)_6$  (0.016M) dissous dans l'eau distillée et 1ml du  $FeCl_3$  (0.02M) dissous dans HCL (0,1N) sont ajoutés. Incuber sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes, ensuite 5ml de la solution stabilisante (comprenant 30ml de la gomme arabique 1%, 30ml de l'acide phosphorique 85% et 90ml d'eau distillée) est ajoutée. La lecture s'effectue à 700nm et la concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200  $\mu g/ml$ ) (Fig. 8). Elle est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).



### 2.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de trichlorure d'aluminium; ( $AlCl_3$ ) (Bahorum *et al.*, 1996) à 1ml de chaque extrait (préparer avec des dilutions

convenables dans le méthanol ou l'eau distillée) en ajoutant 1ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est effectuée à 430nm. Le calcul de la concentration des flavonoïdes ce fait à l'aide des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (0-40  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 9) et elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine ou de rutine par gramme d'extrait (mg EQ/g).



**Figure 9 :** La courbe d'étalonnage de la Quercétine et de la Rutine (moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

### 2.3 Analyses des extraits de l'espèce *Retama sphaerocarpa* par HPLC/IV-vis-DAD/ ESI-MS et GC/MS

Les extraits méthanolique et aqueux ont été analysés à l'aide de deux techniques d'analyses; la chromatographie liquide haute performance couplée à la masse et à l'ultraviolet visible HPLC/IV-vis-DAD/ ESI-MS et la chromatographie gazeuse couplée à la masse GC/MS.

Ce sont des méthodes de séparation des constituants d'un mélange même très complexe. Elles utilisent un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Cette colonne peut être remplie ou capillaire. Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne ou il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne.

Si la phase stationnaire est bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont également retenus lors de la traversée de la colonne. Il résulte que les

constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme.

Dans les conditions chromatographiques données, le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. Les deux techniques chromatographiques (HPLC et GC) couplées à la masse nous permettent de caractériser les molécules du mélange à partir de la mesure de leur masse moléculaire (Romani *et al*, 2003; Wu *et al*, 2004).

### **2.3.1 Analyse de l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanoïque a été analysé à l'aide de la technique HPLC/UV-vis-DAD/ESI-MS. L'utilisation combinée de détecteurs DAD (détecteur à barre diode) et SM (spectrométrie de masse) nous a permis d'identifier une série de substances naturelles dont la plus importance est les isoflavones. (Wu *et al*, 2004).

### **2.3.2 Analyse de l'extrait aqueux**

Les alcaloïdes de l'extrait aqueux ont été identifiés à l'aide de la technique GC/MS.

- **Méthode expérimentale**

Les analyses par GC/MS ont été exécutés sur un appareil Hewlett-Packard 5890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et connecté à un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5971A, et à une source d'ionisation (IE).

- **Procédure analytique**

Les déterminations analytiques ont été effectuées en utilisant les conditions expérimentales suivantes :

Une colonne capillaire de Zebron ZB-5 (30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m); gaz hélium transporteur; injection (mode splitless); un injecteur et un détecteur de température ont été pré-réglés à 250°C et 300°C, respectivement. La température du four a été programmé comme suit: 0 min.

à 100°C, 1 min à 100°C, augmentation de la température de 100 à 150°C par pas de 5°C par min, stabilisation à 150°C pendant 2 min; puis élévation de 150°C à 300°C par pas de 3°C/min et enfin stabilisation à 300°C pendant 10 minutes (El-Shazly *et al.*, 1996).

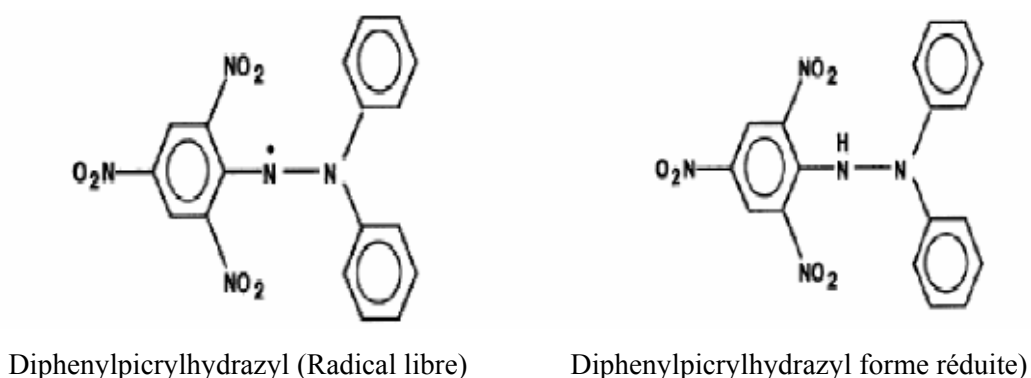
#### • Préparation de l'échantillon

Des aliquotes des échantillons lyophilisés (50 mg) ont été mis dans un flacon d'orange de 8 ml, 1 ml 0.5 N aq HCl a été ajouté. La solution a été agitée vigoureusement à 250 tr/min, pendant 10 minutes à température ambiante. Puis la valeur du pH a été portée à 8 avec le triéthylamine (TEA), 1 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a été ajouté, et les deux couches ont été maintenues pour séparation pendant 5 minutes. La couche organique a été enlevée puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pour l'analyse GC/MS, décrite ci-dessus, 4 µl de chaque échantillon ont été prises et injectés en l'état.

## 2.4 Activité antioxydante

### 2.4.1 Méthode au 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le pouvoir antioxydant de nos extraits qui s'exprime par la donation d'un électron ou d'un atome d'hydrogène a été mesuré par une méthode spectrophotométrique (Burits et Bucar, 2000). Le radical libre 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est utilisé comme un réactif (Fig. 10).



**Figure 10 :** Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

L'expérience a été effectuée selon la méthode décrite par Güllüce *et al.*, (2003). 50µl de différentes concentrations des extraits est ajouté à 5ml de la solution du DPPH d'une concentration de 4mg/ml dissoute dans 100 ml de méthanol. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 517nm.

Le contrôle négatif est représenté par la solution méthanolique du DPPH.

Le contrôle positif est représenté par le BHT.

L'activité antioxydant, qui exprime les capacités de piéger le radicale libre est estimé par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol (Inhibition % ou I%) suivant la formule:

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{control}}$$

Où:

**Abs<sub>control</sub>** : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm;

**Abs<sub>test</sub>** : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm.

La valeur IC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constitué de méthanol et de DPPH. Les valeurs IC<sub>50</sub> ont été calculées par la régression linéaire où l'abscisse est représenté par la concentration des composés testés et l'ordonné par le pourcentage d'inhibition (I%). (Mensor *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Méthode au β-carotène

Dans cette méthode l'activité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composées organiques volatiles et des hydroperoxydes à doubles liaisons conjuguées (diene conjugated hydroperoxides), qui apparaissent lors de l'oxydation de l'acide linoléique. (Dapkevicius *et al.*, 1998).

Le test du β-carotène a été effectué selon la méthode de Miller, (1971) modifier par Aslan *et al.*, (2006). Un mélange en solution a été préparé comprenant: 0,5mg de β-carotène (dissous dans 1ml de chloroforme), 25µl d'acide linoléique et 200mg de tween 40. Le chloroforme de la solution a été évaporé dans une rotavapor de type (BÜCHI) à 40°C, ensuite 100ml d'eau

distillée saturée d'oxygène est ajoutée, puis mettre dans les tubes à essai 2500µl de la solution et 350µl d'extraits ayant une concentration constante de 2g/l, même procédure pour les contrôles. Les absorbance ont été lue à 490nm, après 1heure, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h, et 48h d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité.

Le contrôle négatif est représenté par le méthanol et l'eau distillée;

Le contrôle positif est représenté par le BHT.

Le pourcentage d'inhibition des extraits antioxydant est mesuré comme suit:

$$AA\% = \text{Abs}_{\text{test}} / \text{Abs}_{\text{BHT}} \times 100$$

AA%: Le pourcentage de l'activité antioxydante;

Abs<sub>test</sub>: Absorbance en présence de l'extrait (test);

Abs<sub>BHT</sub>: Absorbance en présence du contrôle positif BHT.

### **2.5 Evaluation de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa***

Pour la détermination de la toxicité aiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par Rasekh *et al.*, (2008). Les rats ont été repartis au hasard en sept lots de dix mâles et femelles. Un lot est utilisé comme témoin et les autres lots sont traités chacun par une dose unique de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*. En début de l'expérience les femelles avaient un poids moyen de 180±20 et les mâles 200±20 g.

#### **• Administration**

Après avoir soumis les rats à jeun, pendant 12 heures, l'administration est réalisée sur des rats conscients par gavage oral à l'aide d'une sonde rigide. La technique repose sur le principe suivant: bien tenir le rat pour qu'il ne bouge pas lors de l'administration, puis lui faire avaler la sonde. Une fois le bout de la sonde arrive à son estomac la substance est injectée doucement (Fig. 11). Les doses administrées sont de 0, 500, 2000, 3000, 4000, 5000 et 6000 milligramme d'extrait par kilogramme de poids corporel de rat respectivement aux 7 lots de 10 rats chacun (5 mâles et 5 femelles). L'extrait a été repris avec de l'eau à un volume constant de 10 ml de solution par kilogramme de poids corporel de rat.



**Figure 11** : Injection de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* par gavage oral.

- **Observations**

Après l'administration de l'extrait, les rats sont surveillés en permanence pendant 10 heures avec prise de notes sur les signes de toxicité apparents. Pour le reste de la période de l'expérience qui est de 14 jours les rats sont surveillés quotidiennement pour signaler s'il y a eu des morts ou des changements dans l'alimentation et la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux ou cliniques supplémentaires de toxicité. Le jour J<sub>14</sub>, tous les rats restant sont sacrifiés à la fin de l'étude et le nombre des rats déjà morts est exprimé en pourcentage.

- **Expression des résultats**

La DL<sub>50</sub> exprimée en mg/kg de poids corporel est déterminée par la méthode graphique de Miller et Tainter, (1944) et la méthode par calcul de Dragstedt et lang, (1957).

### **2.5.1 Méthode graphique ou méthode de Miller et Tainter (1944)**

En général il se trouve dans chaque série d'essai une dose assez faible pour laisser en survie tous les animaux et une dose assez élevée pour tuer tous les animaux. Les pourcentages des rats morts dans chaque lot sont relevés et convertis en unités probits. Les doses correspondant à ces pourcentages sont déterminées en milligrammes par kilogramme de poids corporel. La courbe exprimant la mortalité des rats (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée (en milligrammes par kilogramme de poids corporel) est tracée. La linéarisation de cette courbe semi-logarithmique permet de déterminer la DL<sub>50</sub> qui est l'abscisse du point correspondant à 50 % de mortalité.

Pour l'estimation de l'écart type de la  $DL_{50}$ , on lit sur le graphique les doses correspondant respectivement à 16% et 84% de mortalité (probits 4 et 6); en soustrayant le premier du second, on obtient la valeur SE.

L'écart type approché est donné par :

$$SE = (\text{Log } DL_{84} - \text{Log } DL_{16}) / \sqrt{2N}$$

N étant le nombre total d'animaux dans les groupes

### 2.5.2 Méthode par le calcul ou méthode de Dragstedt et Lang (1957)

Cette méthode repose sur le postulat suivant :

- Tout animal ayant survécu à une dose qui lui aurait été administrée, survivra à toute dose inférieure à celle-ci ;
- Tout animal ayant succombé à une dose qui lui aurait été administrée, succombera à toute dose supérieure à celle-ci.

Ainsi, on peut calculer pour chaque dose le pourcentage de mortalité' (M [%]) en cumulant tous les morts observés aux doses inférieures et tous les survivants observés aux doses supérieures

$$M (\%) = \frac{\text{Nombre de morts cumulés}}{\text{Nombre de vivants cumulés} + \text{nombre de morts cumulés}} \times 100$$

La  $DL_{50}$  est calculée par interpolation :

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

$X_2$  : Dose supérieure encadrant la  $DL_{50}$ ;

$X_1$  : Dose inférieure encadrant la  $DL_{50}$ ;

$Y_2$  : Pourcentage de mortalité correspondant à  $X_2$ ;

$Y_1$  : Pourcentage de mortalité correspondant à  $X_1$ .



## 2.6 Evaluation de la toxicité subaiguë de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*

### 2.6.1 Les animaux de l'expérience

Pour la détermination de la toxicité subaiguë, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par Ramírez *et al.*, (2007). Vingt espèces de rats adultes de souche *Albino Wister*, ont été aléatoirement réparties en deux groupes (n=10), chacun comporte cinq femelles de poids égal à  $200\pm 29$ g et cinq mâles de poids égale à  $150\pm 25$ g. Les rats ont été logés selon le sexe dans des cages en plastiques.

Après le test préliminaire de la  $DL_{50}$ , les traitements ont été administrés oralement une fois par jour pendant 4 semaines. Le premier groupe d'animaux servant comme témoins recevait de l'eau à raison de 10ml par kg de poids de l'animale, alors que le deuxième groupe recevait l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* à une dose égale à 1/10 de la valeur de la  $DL_{50}$ , calculée par la méthode graphique. Les animaux reçoivent quotidiennement de l'eau du robinet et la nourriture pendant toute la période de l'essai.

### 2.6.2 Méthode d'observation et d'examen

Les rats ont été pesés et observés quotidiennement pour noter tous les changements physiologiques et/ou comportementaux. À la fin des 4 semaines tous les rats ont été euthanasies, examinés et les organes foie et reins prélevés.

#### 2.6.2.1 Prélèvement sanguin

La nuit du 29<sup>ème</sup> jour, tous les animaux sont mis à jeûne. Le lendemain et après le sacrifice de l'animal sous une anesthésie par l'éther diéthylique, les prélèvements sanguins sont effectués directement du cœur en utilisant une seringue. Les échantillons du sang, d'environ 3ml, sont recueillis dans 2 tubes différents; un tube à EDTA utilisé pour l'examen des paramètres hématologiques et l'autre contenant l'héparine utilisé pour les analyses biochimiques. Ce dernier tube a été centrifugé à 3000t/10min et le sérum obtenu est conservé à une température de  $-15^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation (Ben-Romdhane *et al.*, 2003).

### **2.6.2.2 Examen hématologique**

L'examen des paramètres hématologiques a été effectué par le Medonic (Beckman coulter-USA-) au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital Universitaire de Sétif. La formule de numération sanguine est composée de GR (Globules rouges), GB (Globules blancs), HGB (Hémoglobine), HCT (Hématocrite), VGM (Volume globulaire moyen), TCMH (Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine), CCMH (Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine), PLT (Plaquettes).

### **2.6.2.3 Examen biochimique**

Les analyses biochimiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital Universitaire de Sétif à l'aide d'un appareil automatique de type TECHNICON, RA-1000. Les paramètres dosés sont ALT (Alanine aminotransférase), PAL (Phosphatase Alcaline), AST (Aspartate aminotransférase), CHOL (Cholestérol), CPK (Créatine phosphokinase), CRE (Créatine), GLUC (Glucose), LDH (Lactate déshydrogénase), PT (protéines total).

### **2.6.2.4 Réalisation des coupes histologiques**

La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire central d'anatomie pathologique à l'Hôpital universitaire de Sétif. Après avoir fixés le foie et les reins dans du formol (10%) pendant une semaine, on les coupe en petits morceaux. Ces échantillons sont déshydratés par passage dans trois bains d'éthanol successifs de 30 min (70-75°; 90-95° et 100°). Ensuite ils sont éclaircis dans deux bains de 20 minutes de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures chacun).

L'opération est automatisée à l'aide d'un automate (TISSUE-TEK® II°). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques (Shandon [O] Histocentre). Les blocs de paraffines obtenus sont ensuite coupés par microtome (LEICA RM 2145), les coupes de 5µm d'épaisseur sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine (SHANDON [O]). (Bensalem-Bendjelloul, 1998).

## 2.7 Analyses statistiques

Pour les tests antioxydants, les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ SD et les mesures ont été répétées trois fois (n=3). Les résultats ont été analysés en utilisant GraphPad (version 5), pour l'analyse de la variance à un critère de classification (One-way ANOVA) suivi du test de Tuckey pour la comparaison des résultats. La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est <0.1.

Pour les études de la toxicité, la comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel SigmaStat (version 3). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats sont analysés par le test *t* de *Student*. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

## Chapitre 03

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

## Chapitre 03

# Résultats et Discussion

### 1. Evaluation des techniques d'extraction

Les deux extraits de *Retama sphaerocarpa* ont été obtenus à partir d'une poudre fine des rameaux de cette plante et en suivant deux méthodes d'extraction différentes. La première parvenant à un extrait méthanolique brut suite à une macération pendant 7 jours de la poudre dans le méthanol suivie d'une évaporation de ce dernier. La deuxième technique utilisée est celle décrite par Soro *et al.*, (2009a) avec quelques modifications et menant à un extrait aqueux sec après 24 heures d'agitation sous agitateur magnétique de la poudre (mélanger avec de l'eau distillée) suivie d'une évaporation de l'eau.

Les résultats de la présente étude indiquent qu'à partir de 100g de poudre des rameaux de *Retama sphaerocarpa* et 1 litre de méthanol nous avons obtenu un extrait méthanolique considéré comme étant l'extrait brut de couleur verte foncée pouvant contenir de la chlorophylle, des flavonoïdes, des polyphénols et d'autres composés. A partir de 150g de poudre de rameaux de la dite plante et 3 litres d'eau distillée nous avons obtenu un extrait aqueux de couleur brune foncée dépourvu de chlorophylle et contenant des alcaloïdes, des flavonoïdes et des polyphénols.

Afin d'utiliser les extraits pour des essais pharmacologiques et toxicologiques, la conservation de l'état bioactif des molécules extraites semble importante. L'épuisement complet du solvant s'avère nécessaire. La présence même des traces du méthanol dans l'extrait peut entraîner des effets secondaires indésirables. De ce fait l'effet positif ou curatif de la substance pharmacologique peut être masqué par l'action du solvant.

Le rendement est calculé par rapport au poids total de la poudre de *Retama sphaerocarpa* et l'extrait aqueux a donné un rendement de 18.68%. Ce résultat est proche de celui trouvé par Soro *et al.*, (2009a) qui ont utilisé le même protocole d'extraction pour les écorce de *Ximenia*

*americana*, obtenant un rendement de 17.50%. Le rendement de l'extrait méthanolique est de 15.86%. Ce résultat est plus faible que celui de l'extrait aqueux. La différence de rendement entre les deux extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

## 2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir de *Retama sphaerocarpa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au bleu de Prusse. L'acide gallique a été utilisé comme standard et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) (Graham, 1992). La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (Bahorum *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine et/ou rutine et elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine ou de rutine par gramme d'extrait (mg EQ/g). Elle dépend de la formation d'un complexe doué d'une forte absorbance à la longueur d'onde 430nm.

En générale, les résultats indiquent une quantité de polyphénols plus élevée que celle des flavonoïdes dans les deux extraits de *Retama sphaerocarpa*. Cependant l'extrait aqueux comporte une plus grande teneur en polyphénols ( $17.36 \pm 0.86$  mg EAG/g) que l'extrait méthanolique ( $15.79 \pm 1.23$  mg EAG/g); alors que pour les flavonoïdes l'extrait méthanolique présente des teneurs plus élevées que l'extrait aqueux et en même temps presque identique pour les deux standards qui sont de:  $4.62 \pm 0.13$  mg EQ/g et  $4.62 \pm 0.04$  mg ER/g pour la quercétine et la rutine respectivement (Tab. 1).

**Tableau 1:** Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de *Retama sphaerocarpa*.

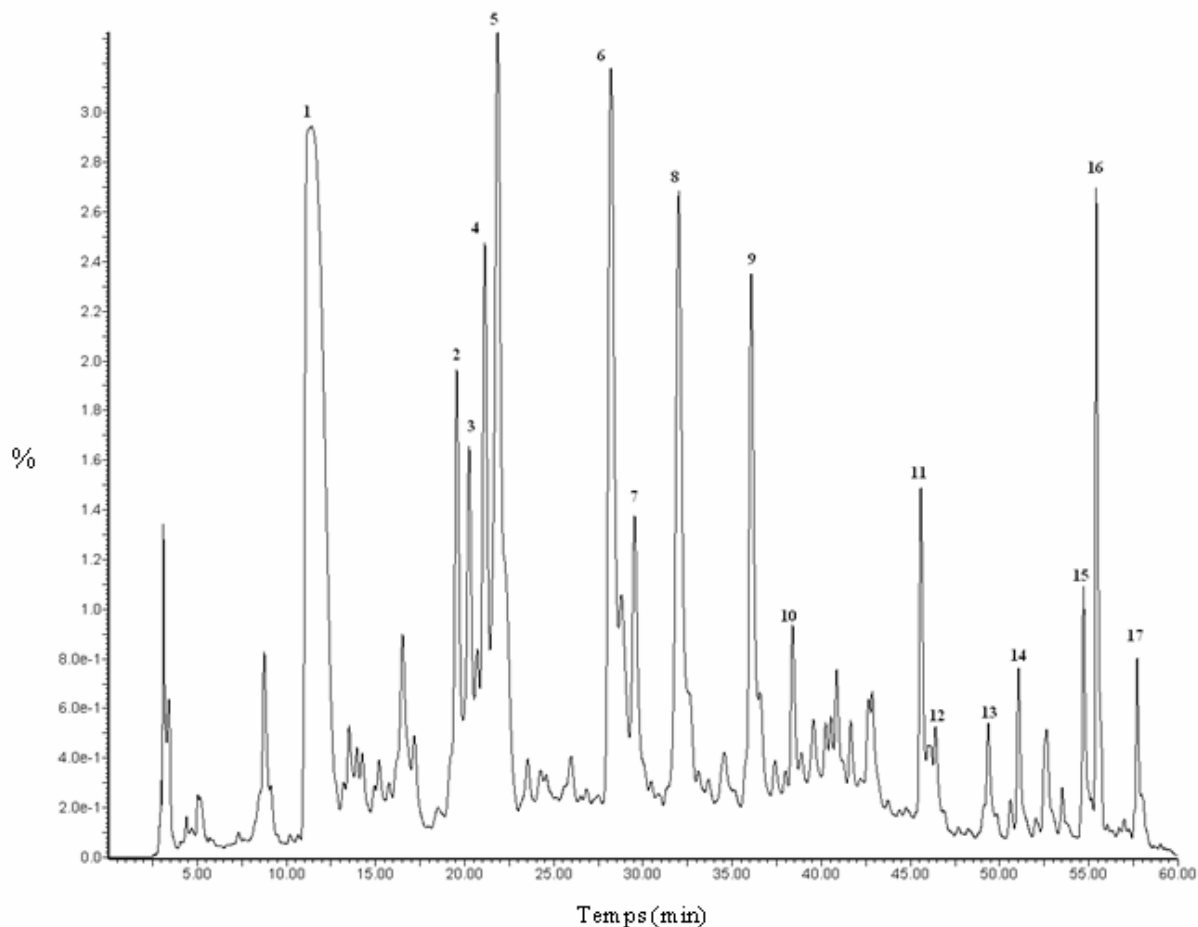
Les extraits de la plante	Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	Teneur en flavonoïdes	
		Quercétine (mg EQ/g)	Rutine (mg ER/g)
Extrait brut	15.79 ± 1.23	4.62 ± 0.13	4.62 ± 0.04
Extrait aqueux	17.36 ± 0.86	0.98 ± 0.012	2.06 ± 0.01

Les valeurs représentent la moyenne ± SD, (n=3); (EAG) Equivalent acide gallique; (EQ) Equivalent quercétine; (ER) Equivalent rutine.

Les teneurs élevées en composés phénoliques par comparaison aux flavonoïdes sont logiques étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols. Ceci peut être aussi expliqué par une augmentation du métabolisme phénolique de la plante; en plus, l'existence d'une liaison avec les conditions climatiques dures et de culture telles que les températures élevées, la durée d'exposition solaire, la nature du sol et la saison de croissance (Djeridane *et al.*, 2005; Boizot et Charpentier, 2006). D'après Edziri *et al.*, (2008), les résultats du dosage des polyphénols dans l'extrait méthanolique préparé à partir des fleurs de *Retama Raetam* ont été estimés de: 179.39mg EAC/g, qui est un taux élevé comparé avec nos résultats sur: *Retama sphaerocarpa* qui est du même genre que *Retama raetam*. Selon la même source l'extrait méthanolique des fleurs de *Retama Raetam* contient une concentration plus élevée en flavonoïdes par rapport à celle trouvée dans notre plante, elle est égale à: 41.58 mg ER/g.

### **3. Identification par HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS des métabolites secondaires de l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa***

Les résultats des analyses effectuées sur l'extrait méthanolique par HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS indiquent que cet extrait comporte des métabolites secondaires signalés par le chromatogramme comprenant 40 pics, dont 17 ont été identifiés (Fig. 12).



**Figure 12:** Identification des pics présents sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* visualisées à 260 nm.

(1) Dérivé de daidzéine; (2) Dérivé de génistéine; (3) Glycitéine-glucoside; (4) Daidzéine-glucoside; (5) Génistéine 8-C-glucoside. (6) Génistéine-glucoside; (7) Daidzéine glucosyl-malonate; (8) 7 hydroxy-6'méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside; (9) Génistéine glucosyl-malonate; (10) Composé 8 acétate; (11) Dérivé de génistéine acétyle; (12) 7 hydroxy- 6'méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone; (13) Ephedroidine; (14) Génistéine; (15) 5,4'-dihydroxy-(3,4dihydro-3,4dihydroxy)-2,2 diméthylpyrano-(5,6:7,8)-flavone; (16) Dérivé de génistéine; (17) Méthyle carnosate.

Il y a une prépondérance de la présence de plusieurs isoflavones (daidzéine, génistéine glycitéine) et de leurs dérivés. Le composé qui présente le pourcentage le plus élevé est le dérivé de daidzéine avec un pourcentage égale à 32%, suivie de génistéine glucoside étant de 12.7%. L'analyse a détecté la présence du méthyle carnosate avec un pourcentage de 1.6%. Tous les composés identifiés sont indiqués dans le tableau (2-A) et la structure de base des principaux composés est indiquée dans le tableau (2-B).



**Tableau 2:** Composés contenus dans l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa*. (A) pourcentages des composés; (B) Structures chimiques de quelques composés.

<b>A</b>		<b>B</b>	
Composés	(%)	Composés/Mw	Structures Chimiques
Dérivé de daidzéine	32	Daidzéine Mw = 254.25.	
Dérivé de génistéine (2)	3.7	Génistéine Mw = 270.24.	
Glycitéine-glucoside	2.5	Glycitéine Mw = 284.26.	
Daidzéine-glucoside	4.4	Ephedroidine Mw = 354.	
Génistéine 8-C-glucoside	10.3	5,4'-dihydroxy-(3,4dihydro-3,4dihydroxy)-2,2 diméthylpyrano-(5,6:7,8)-flavone; Mw = 370.	
Génistéine-glucoside	12.7	7 hydroxy-6'méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside Mw = 312.	
Daidzéine-glucosyl-malonate	2.6		
7 hydroxy- 6'méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside	11.8		
Génistéine glucosyl-malonate	7		
Dérivé de génistéine acétyle	4.5		
Génistéine	1.35		
Dérivé de génistéine (16)	4.2		
Composé 8 acétate	1.4		
Méthyle carnosate	1.6		

(Mw) Masse moléculaire.

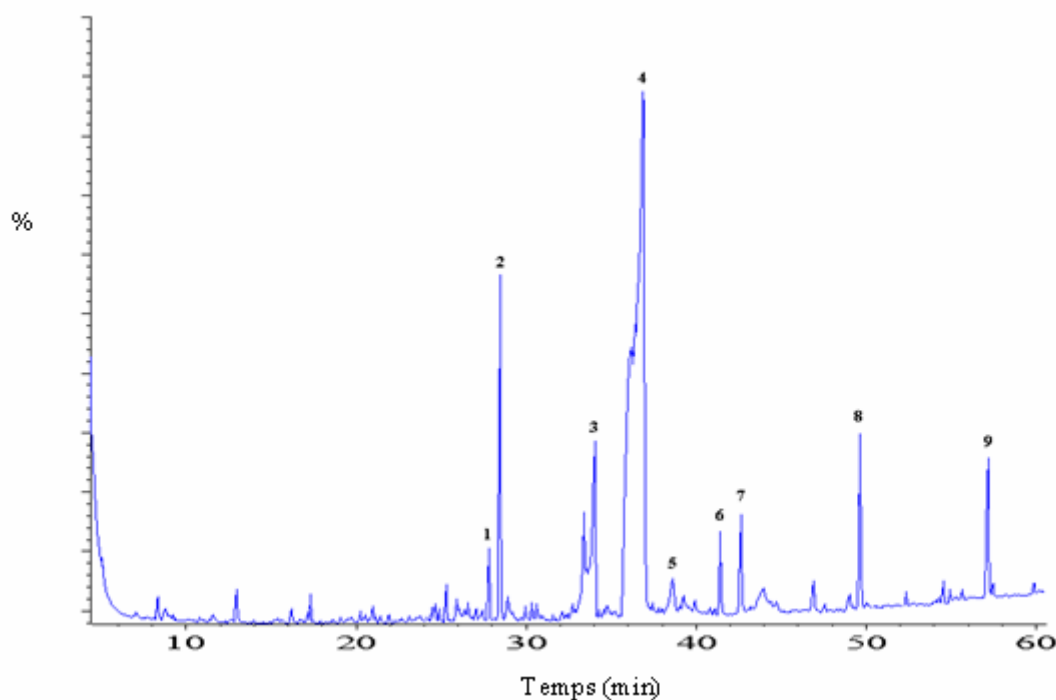
Des travaux récents de Louaar *et al.*, (2005; 2007) indiquent la présence de plusieurs flavonoïdes, principalement les Flavones et les isoflavones dans les extraits de *Retama sphaerocarpa*. Dans la présente étude, nous donnons une idée générale des métabolites secondaires issus de l'extrait méthanolique de cette espèce et nous confirmons la présence majoritaire des isoflavones et de leurs dérivés. D'autre part l'analyse a révélée la présence de deux dérivés d'apigénine, qui sont l'ephedroidine, trouvé aussi dans *Genista ephedroides*

comme signalé par Pistelli *et al.*, (1998) et le composé 5,4'-dihydroxy-(3,4dihydro-3,4dihydroxy)-2,2 diméthylpyrano-(5,6:7,8)-flavone. Ces deux métabolites sont aussi présents dans *Retama raetam*, ce qui corrobore les résultats de Kassem *et al.*, (2000). Ces métabolites peuvent être considérés comme des marqueurs chimio-taxonomiques de ce genre.

Le 7 hydroxy- 6'methoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside qui occupe: 11.8% de l'extrait méthanolique a été isolé des parties aériennes de *Retama sphaerocarpa* par les travaux de López-Lázaro *et al.*, (1998). Les résultats indiquent aussi la présence d'un autre métabolite, un terpénoïde, dans l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa*. Ce terpénoïde, nommé le méthyle carnosate, est très fréquent chez de nombreuses espèces aromatiques méditerranéennes comme *Rosmarinus officinalis* L. et *Salvia officinalis* (Bicchi *et al.*, 2000; Cuvelier *et al.*, 1994).

#### 4. Identification des alcaloïdes de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* par GC/MS

Les analyses par GC/MS ont permis de détecter 9 alcaloïdes de l'extrait aqueux, signalés dans le chromatogramme de la figure 13.



**Figure 13:** Profils des pics de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*, les composés numérotés sont donnés au tableau 3.

La rétamine est l'alcaloïde majoritaire de l'extrait aqueux, représentant jusqu'à 44% suivie de l'ammodendrine de 7.22% (Tab. 3).

**Tableau 3:** Alcaloïdes identifiés dans l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

Numéro	Nom du composé	(%)
1	$\beta$ -isosparteine	1.23
2	11,12-dehydrosparteine	5.54
3	Ammodendrine	7.22
4	Retamine	44
5	Cytisine	1.81
6	5,6 -dehydrolupamine	1.49
7	Lupamine	2.14
8	Anagyrene	3.30
9	Baptifoline	3.10

Balandrine *et al*, (1982), Cordero *et al*, (1991) et Neuner-jehle *et al*, (1964) ont isolés quelques alcaloïdes quinolizidines de *Retama sphaerocarpa*. Ces travaux anciens sont suivis par ceux d'El Shazly *et al*, (1996) qui ont isolés plus d'alcaloïdes dont 31 sont reportés et répertoriés. Le présent travail utilise la GC/MS pour analyser les alcaloïdes de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*. Les résultats indiquent la présence des alcaloïdes suivants:  $\beta$ -isosparteine, 11,12-dehydrosparteine, Ammodendrine, Retamine, Cytisine, 5,6-dehydrolupamine, Lupamine, Anagyrene, Baptifoline, ces résultats corroborent ceux d'El Shazly *et al*, (1996). *Retama sphaerocarpa* contient, donc, de nombreux alcaloïdes comme les autre espèces du genre tel *Retama raetam* (Abdel-Halim, 1995) et *Retama monosperma* (Morales Mendez *et al*, 1971). Les alcaloïdes sont synthétisés dans les chloroplastes (Wink et Hartmann, 1982), puis sont transportés vers tous les organes de la plante via le phloème (Wink et Witte, 1984). Ceci explique la présence de ces alcaloïdes dans les rameaux qui font l'objet de cette étude. A noter aussi que Lupamine, Ammodendrine, Retamine et Cytisine ont été trouvés dans *Viscum cruciatum*, un hémiparasite vivant sur *Retama sphaerocarpa* (Cordero *et al*, 1989; 1993), qui utilise ces alcaloïdes à partir du phloème. La présence de ces alcaloïdes dans les extraits de *Retama sphaerocarpa* lui confère un certain degré de toxicité.

## 5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Retama sphaerocarpa* par la méthode de DPPH (effet scavenger)

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été mesuré par la méthode spectrophotométrique au DPPH. Il possède une coloration violette foncée qui va se transformer en jaune pâle, ce qui diminue son absorbance à 517nm, lorsqu'il est réduit par les composés antioxydants en lui donnant un proton ou un électron (Cuandet *et al.*, 1997). Les résultats indiqués dans la figure 13 et le tableau 4 représentent les concentrations des différents extraits qui piègent 50 % du radical DPPH (IC<sub>50</sub>). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brande-Williams *et al.*, 1995; Tsimogiannis et Oreopoulou, 2004; Atoui *et al.*, 2005).

Les résultats indiquent que les composés phénoliques (Acide galliques, quercétine et rutine) possèdent une activité anti-radicalaire très élevée et supérieure à celle du BHT. L'acide gallique est le plus actif avec une IC<sub>50</sub>=0.00056 ± 3.45 mg/ml, ensuite la quercétine et la rutine (0.0034 ± 1.27mg/ml et 0.0041 ± 8.92) respectivement (Tab. 4).

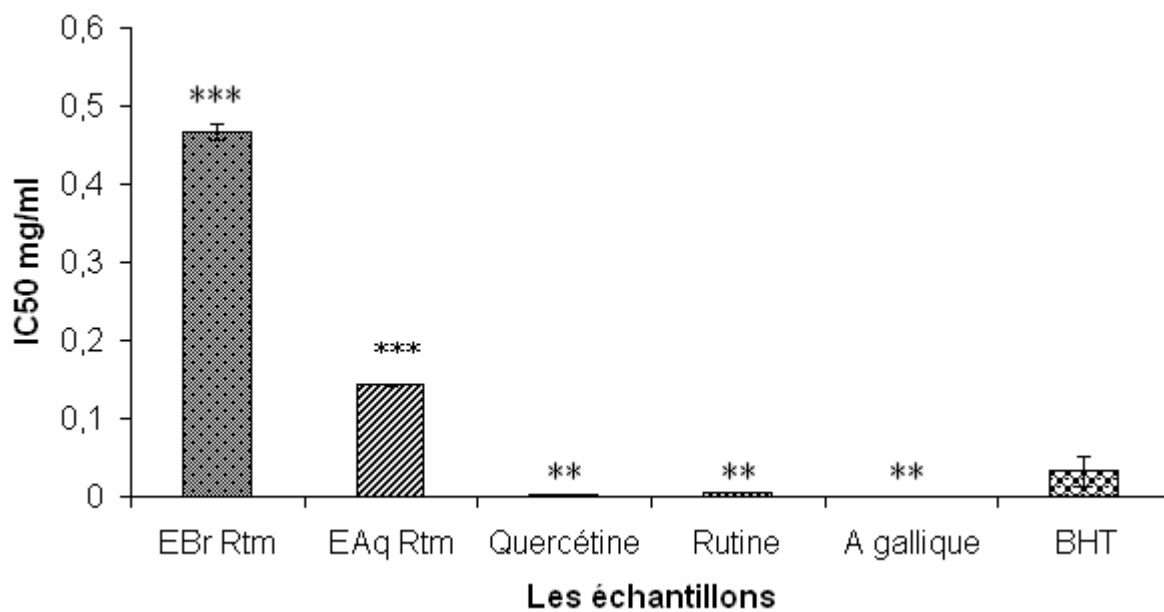
**Tableau 4 :** Les concentrations des extraits de *Retama sphaerocarpa* et des composés phénoliques qui inhibent 50% du radical DPPH.

Les échantillons	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Extrait brut <sup>***</sup>	0.46 ± 0.010
Extrait aqueux <sup>***</sup>	0.14 ± 0.0014
Quercétine <sup>**</sup>	0.0034 ± 1.27
Rutine <sup>**</sup>	0.0041 ± 8.92
Acide gallique <sup>**</sup>	0.00056 ± 3.45
BHT	0.032 ± 0.018

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3), (\*\*\*) p < 0.001, (\*\*) p < 0.01).

L'extrait méthanolique démontre une IC<sub>50</sub>=0.46 ± 0.010mg/ml, un résultat qui est proche de celui acquis par Edziri *et al.*, (2008), qui ont travaillé sur *Retama raetam* et chez lesquels l'IC<sub>50</sub> de l'extrait Méthanolique était égale à: 0.5mg/ml. Cependant l'extrait aqueux qui a

démontré une plus grande quantité en polyphénols indique aussi un effet scavenger meilleur que celui de l'extrait méthanolique (Fig. 14), avec une  $IC_{50} = 0.14 \pm 0.0014$  mg/ml. Ces résultats sont comparables à ceux de Sarikurkcü *et al.*, (2008) utilisant l'espèce *Marrubium globosum* ou l' $IC_{50}$  été de  $0.15 \pm 1.12$  mg/ml.



**Figure 14 :** Représentation de l'inhibition du radical DPPH par l'estimation des valeurs de l' $IC_{50}$  des différents extraits de *Retama sphaerocarpa* et des composés phénoliques.

EBr: Extrait brut; EAq: Extrait aqueux. Chaque valeur de l' $IC_{50}$  représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3); (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ ).

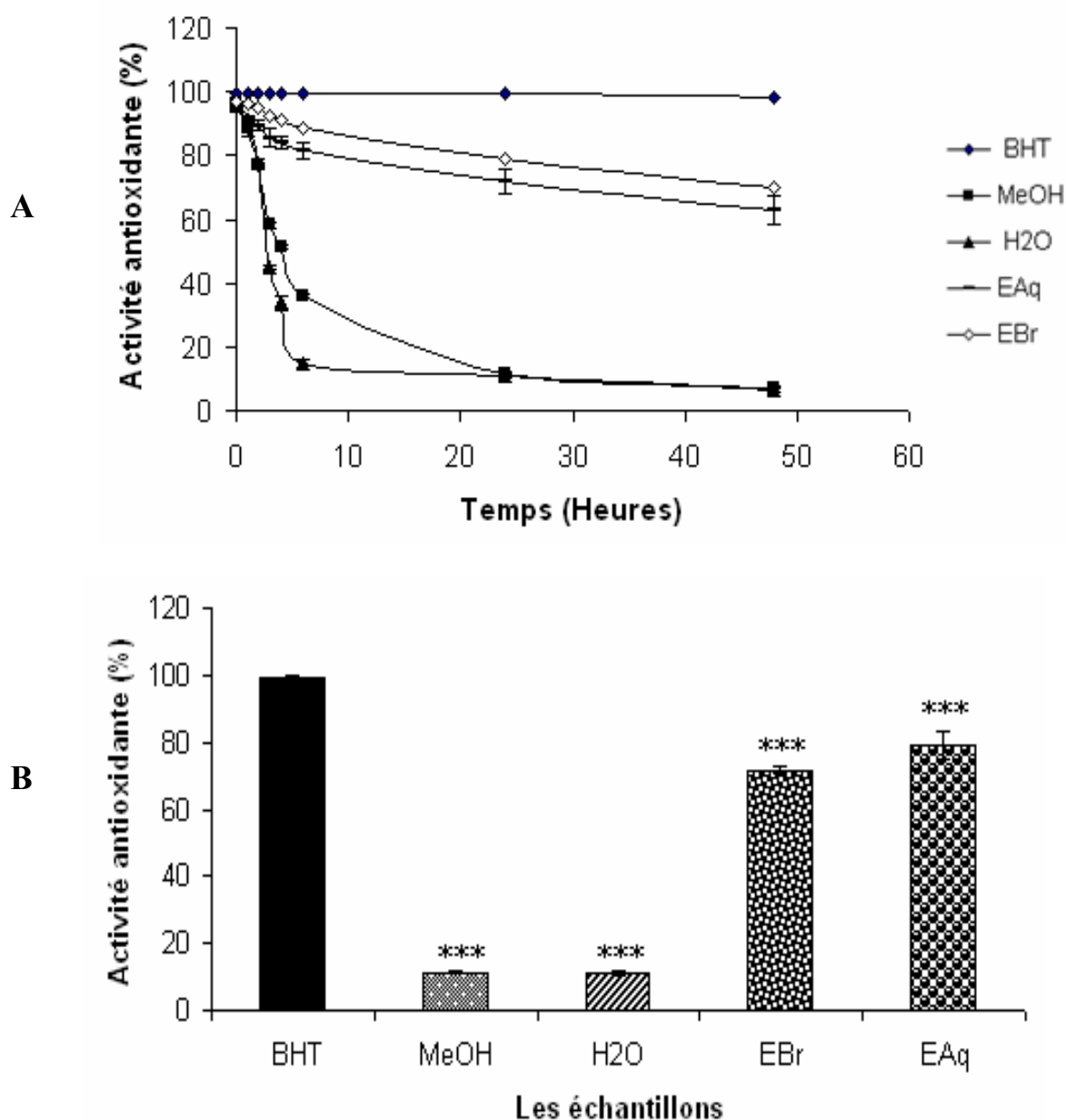
D'après ces résultats, on conclue que l'effet scavenger augmente avec l'augmentation de la concentration des polyphénols dans l'extrait ce qui mène à suggérer que l'effet antioxydant d'un extrait de plante est en relation avec la quantité des polyphénols y présents. Cette hypothèse est démontré par plusieurs chercheurs tel que: Jayaprakasha et Patil, (2007); Agbor *et al.*, (2007) et Hodzic *et al.*, (2009).

L'effet antioxydant d'un extrait peut aussi différer selon la qualité des polyphénols y presents tel les flavonoïdes qui ont montrés des activités antioxydantes (Wang et Mazza, 2002). Le génisteine et le daïdzéine qui figurent dans la composition phénolique de l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* ont démontrés dans les travaux de Borrás *et al.*, (2006) et Liang *et al.*, (2008) une activité antioxydante due à l'effet chimique directe causé principalement par leurs structures phénoliques. D'autre part Cuvelier *et al.*, (1994) ont identifiés l'activité antioxydante du carnosol et du méthyle carnosate.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Kouri *et al.*, 2007). Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de DPPH égale à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). La configuration spatiale et le nombre de groupement OH des structures flavonoïdiques peuvent avoir une influence sur les différents mécanismes antioxydants (Hein *et al.*, 2002).

## 6. Test de $\beta$ -carotène/acide linoléique

L'activité antioxydante des différents extraits de *Retama sphaerocarpa* a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la décoloration du  $\beta$ -carotène à 490 nm. Les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés dans la figure 15.



**Figure 15:** Activité antioxydante des extraits brut et aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

(A) Activité antioxydante des extraits brut et aqueux de *Retama sphaerocarpa* par rapport aux témoins (BHT, MeOH et H<sub>2</sub>O) par le test de β-carotène / acide linoléique pendant 48 heures.

(B) Les pourcentages d'inhibitions des extraits brut et aqueux de *Retama sphaerocarpa* par rapport aux témoins (BHT, MeOH et H<sub>2</sub>O) par le test de β-carotène / acide linoléique après 24 heures.

(EBr) Extrait brut; (EAq) Extrait aqueux. Chaque point représente la moyenne ± SD (n=3); (\*\* p < 0.001, \* p < 0.01).

D'après les résultats les deux extraits de *Retama sphaerocarpa* inhibent l'oxydation du β-carotène très significativement (p<0.001), après 24heures d'incubation, les pourcentages

d'inhibition était proche de 80%. L'extrait aqueux a démontré un pourcentage d'inhibition égale à:  $79.075 \pm 3.916\%$  plus élevé que celui de l'extrait méthanolique ( $71.694 \pm 1.203\%$ ), alors que le BHT (contrôle positif) donne une valeur de  $99.256 \pm 0.663\%$  (Tab. 3). Ces résultats sont comparable à ceux de Tepe *et al.*, (2007) en étudiant l'espèce *Salvia verticillata*.

**Tableau 5:** Effet antioxydant des extraits de *Retama sphaerocarpa* par le test du  $\beta$ -carotène/ acide linoléique après 24 heures.

Les échantillons	Jour 24 (M $\pm$ SD en %)
BHT	99.256 $\pm$ 0.663
MeOH <sup>***</sup>	11.366 $\pm$ 0.54
H <sub>2</sub> O <sup>***</sup>	10.881 $\pm$ 0.606
EBr <sup>***</sup>	71.694 $\pm$ 1.203
EAq <sup>***</sup>	79.075 $\pm$ 3.916

(EBr) Extrait brut; (EAq) Extrait aqueux.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3); (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

Étant donnée que plusieurs recherches ont montrés que l'effet antioxydant des sources naturelles est lié à la présence des composés phénoliques (Hayase et Kato, 1984; Abdille *et al.*, 2005; Velioglu *et al.*, 1998), l'extrait aqueux qui a démontré la plus grande teneur en polyphénols et la meilleure activité dans ce test, laisse conclure que la forte activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Retama sphaerocarpa* est dû à leur contenance en composés phénoliques.

## 7. Etude de la toxicité aiguë

### 7.1 Détermination de la DL<sub>50</sub>

Avant de chercher à déterminer la DL<sub>50</sub>, une recherche préliminaire de la DL<sub>0</sub>: plus forte dose à laquelle tous les animaux mis en expérience survivent, et de la DL<sub>100</sub>: plus faible dose



à laquelle tous les animaux meurent, est nécessaire. Ces deux doses délimitent la zone dans laquelle l'essai définitif doit être effectué.

Dans notre travail l'essai est réalisé selon la méthode décrite par Rasekh *et al.*, (2008), sur des rats blancs *Albino Wistar* mâles et femelles. Six (06) doses incluant DL<sub>0</sub> et DL<sub>100</sub> sont retenues (Tab. 6), alors que les rats témoins (0mg/kg) sont restés en bonne santé.

**Tableau 6:** Les doses injectées et la transformation en pourcentage du nombre de morts dans chaque lot.

lots	Nombre de rats (n)	Doses (mg/kg)	Nombres de morts	Pourcentages de morts %
1	10	500	0	0
2	10	2000	3	30
3	10	3000	4	40
4	10	4000	7	70
5	10	5000	8	80
6	10	6000	10	100

Après avoir calculé les pourcentages de mortalité dans chaque lot, la détermination de la DL<sub>50</sub> est effectuée selon deux méthodes différentes:

### 7.1.1 Méthode par le calcul ou méthode de Dragstedt et Lang

Après application de la relation

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

**X<sub>2</sub>** : Dose supérieure encadrant DL<sub>50</sub>;

**X<sub>1</sub>** : Dose inférieure encadrant DL<sub>50</sub>;

**Y<sub>2</sub>** : Pourcentage de mortalité correspondant à X<sub>2</sub>;

**Y<sub>1</sub>** : Pourcentage de mortalité correspondant à X<sub>1</sub>.

Cette méthode a permis de révéler une DL<sub>50</sub> égale à: 3333.33mg/kg.

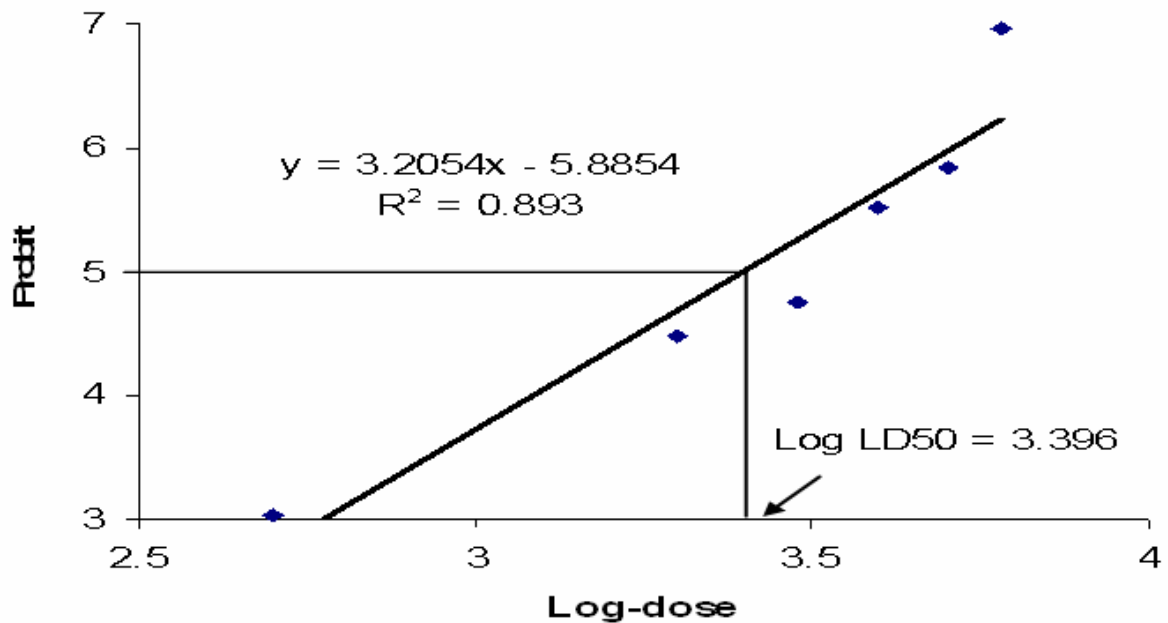
### 7.1.2. Méthode graphique ou méthode de Miller et Tainter

Les pourcentages des rats morts dans chaque lot sont relevés et convertis en unités probits (Tab. 7).

**Tableau 7:** Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits.

Lots	Doses (mg)	Log dose	Pourcentages des morts (%)	Pourcentages corrigés	Probits
1	500	2.7	0	2,5	3.04
2	2000	3.3	30	30	4.48
3	3000	3.48	40	40	4.75
4	4000	3.6	70	70	5.52
5	5000	3.7	80	80	5.84
6	6000	3.78	100	97.5	6.96

La courbe tracée exprime la mortalité des rats (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée (en milligrammes par kilogramme de poids corporel). La linéarisation de cette courbe semi-logarithmique permet de déterminer la  $DL_{50}$  qui est l'abscisse du point correspondant à 50 % de mortalité (Fig. 16).



**Figure 16 :** Courbe exprimant la mortalité des rats (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée (en milligrammes par kilogramme de poids corporel).

• **Obtention du Log DL<sub>50</sub> de l'équation de régression**

Pour le probit 5 représenter par (y) et Log DL<sub>50</sub> représenter par (x) en a:

$$X = \frac{5 + 5.8854}{3.2054} = 3.396$$

DL<sub>50</sub> = Anti-log 3.396 = 2488.86 mg.

• **Calcul de l'erreur standard:**

Approx. SE de DL<sub>50</sub> = (Log DL<sub>84</sub> – Log DL<sub>16</sub>) /  $\sqrt{2N}$  ..... (a)

La valeur du probit pour la DL<sub>84</sub> et la DL<sub>16</sub> est lue sur la table du probit elle est de 6 et 4 respectivement.

Pour ces deux valeurs log dose sont: 3.708 et 3.084

Alors que leurs anti-logs sont: 5105.05 et 1213.4 respectivement, en les appliquant dans la formule (a) on obtient:

$$\begin{aligned} SE &= 5105.05 - 1213.4 / \sqrt{2} \times 10 \\ SE &= 3891.65 / 4.472 = 870.23 \end{aligned}$$

Donc:

DL<sub>50</sub> avec SE = 2488.86 ± 870.23mg/kg.

La limite de confiance 95% est: 1618.63 - 3359.09mg/kg.

Donc, la DL<sub>50</sub> est égale à: 2488.86 ± 870.23mg/kg et 3333,33mg/kg de poids corporel lorsque celle-ci est déterminée respectivement par la méthode graphique et par calcul. La valeur de la DL<sub>50</sub> par calcul se trouvant dans l'intervalle de confiance de la DL<sub>50</sub> graphique ce qui assure la fiabilité de notre travail.

Selon la classification de Diezi, (1989), lorsque:

- DL<sub>50</sub> < 5 mg/kg: la substance est très toxique;
- 5 mg/kg < DL<sub>50</sub> < 500 mg/kg: la substance est toxique ;
- 500 mg/kg < DL<sub>50</sub> < 5000 mg/kg: la substance est faiblement toxique ;
- DL<sub>50</sub> > 5000 mg/kg: la substance est non toxique.

Dans la présente étude la DL<sub>50</sub> de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* calculer est incluse entre 500mg/kg et 5000mg/kg (5 mg/kg < 2488.8±870.23mg/kg < 500 mg/kg).

On en conclut que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* est considéré selon la classification de Diezi, (1989) comme étant faiblement toxique chez les rats par voie orale et par conséquent cette plante mérite d'être utilisée avec précaution chez l'homme.

## **7.2 Effet d'une dose unique sur la vie et le comportement générale des rats**

Après l'administration de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* par voie orale à des rats mâles et femelles, on remarque qu'il y a une augmentation régulière des signes d'intoxications et de mortalité en liaison avec la dose injectée. Les signes sont résumés dans le tableau 8.

**Tableau 8:** L'effet d'une dose unique de *Retama sphaerocarpa* sur les rats.

Doses (mg/kg)	Rats		Effets	
	Sexe	M/T	Mortalité/Latence (min, h)	Symptômes de toxicité
500	Mâles femelles	0/5 0/5	- -	-Redressement des poils, somnolence. -Redressement des poils, somnolence.
2000	Mâles femelles	1/5 2/5	>300h, <312h >24h, <144h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse. -Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse.
3000	Mâles femelles	1/5 3/5	>24h, <48h >6h, <24h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse. -Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque, trouble de mouvement et perte d'équilibre.
4000	Mâles	3/5	>10h, <24h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque, trouble de mouvement, perte d'équilibre, convulsion, inconscience.
	femelles	4/5	>5h, <12h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque, tremblement du corps, perte d'équilibre, convulsion, paralysie des pattes, inconscience.
5000	Mâles	3/5	>9h, <24h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, tremblement du corps, perte d'équilibre, accélération du rythme cardiaque, convulsion, paralysie totale, coma.
	femelles	5/5	>5min, <12h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, accélération du rythme cardiaque, respiration laborieuse, tremblement du corps, perte d'équilibre convulsion, paralysie totale, coma, mort.
6000	Mâles	5/5	>8h, <28h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque, tremblement du corps, perte d'équilibre, convulsion, paralysie totale, coma, mort.
	femelles	5/5	>5min, <5h	-Redressement des poils, somnolence, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque, tremblement du corps, perte d'équilibre, convulsion, paralysie totale, coma, mort.

(M) Mort, (h) Heure, (min) Minute, (T) Totale.

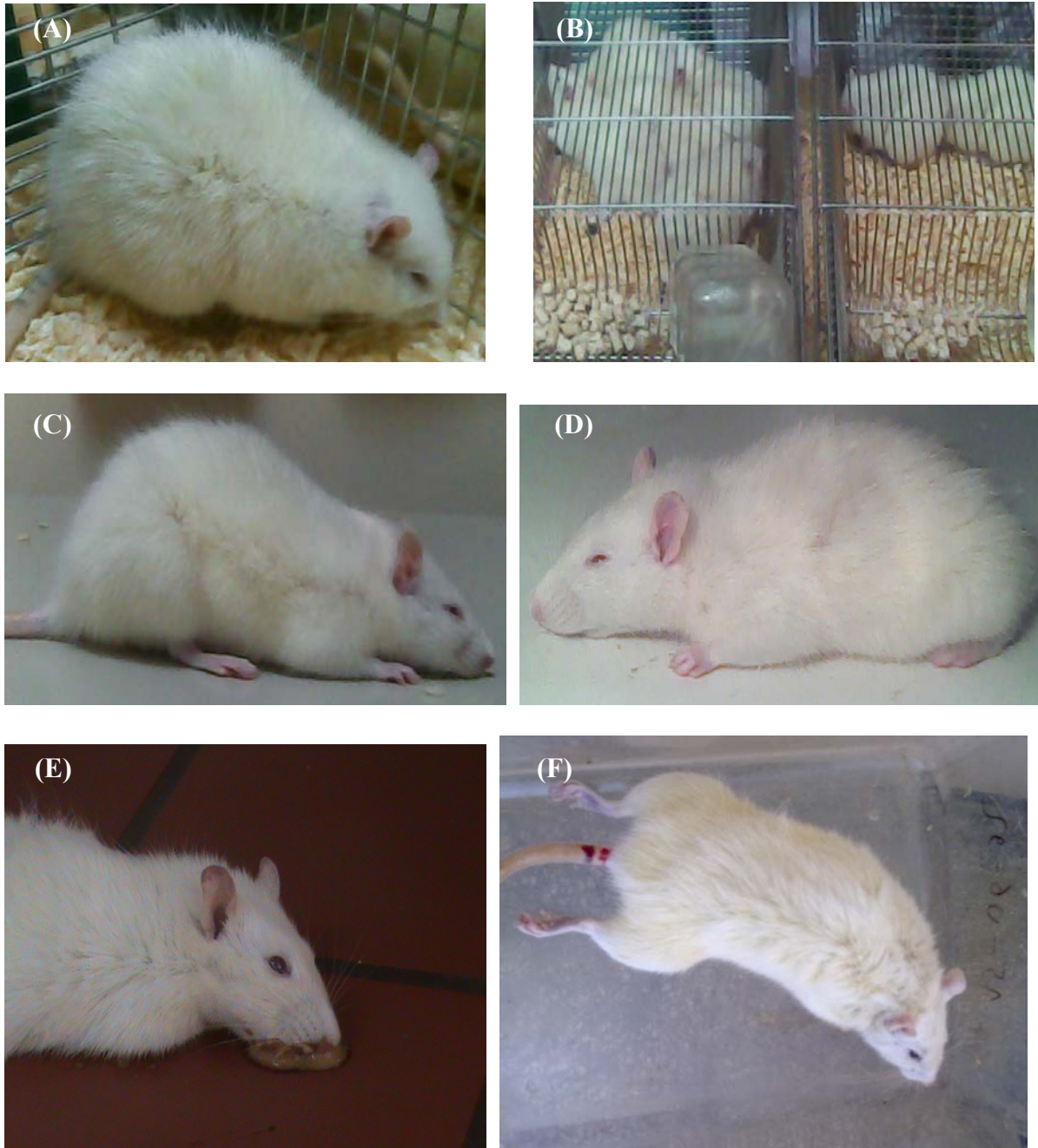
Le premier rat mort est une femelle, à la dose de 6000mg/kg, après 1 minutes d'injection suite à des signes graves d'intoxication. En 1 minute, la rate a montrée une respiration presque coupée, une perte d'équilibre, des contractions musculaires, une paralysie partielle (Fig. 17-C), des vomissements (Fig. 17-E), coma et paralysie totale (Fig. 17-D), Elle meure après s'être allongée sur le ventre (Fig. 17-F), alors que le dernier rat qui a survécue jusqu'au 13<sup>ème</sup> jours, est un mâle qui a reçu une dose de 2000mg/kg.

La dose qui tue toute la population des femelles est de 5000mg/kg, alors que celle chez les mâles, elle est de 6000mg/kg. Les signes de toxicité sont les même pour les deux sexes mais ils apparaissent chez la femelle à des doses inférieures que celles qui apparaissent chez les mâles. On remarque chez les femelles surtout à partir de la dose non mortelle de 500mg/kg un redressement de poils, la fatigue et la somnolence (Fig. 17-B).

Les signes commencent à augmenter à partir de la dose 2000mg/kg, qui induisent 30% de mortalité de la population, soit 1 mâle et 2 femelles. Ces rats, à cette dose, montrent des signes de faiblesse associés à l'isolement individuel (Fig. 17-A). Leurs mouvements et leurs appétits diminuent et la respiration devient difficile chez les femelles.

A la dose 3000mg/kg, le pourcentage des morts augmente à 40%, la respiration devient laborieuse, les mâles et les femelle montrent des signes encore plus forts d'intoxication, leur rythme cardiaque s'accélère et après un quart d'heure, les rates commencent à souffrir des convulsions, des troubles involontaires de mouvements ce qui les conduit à une démarche chancelante, certaines guérisses de ces troubles et d'autres finissent par mourir suite à des contractions musculaires.

Dés la dose de 4000mg/kg, tout le corps de l'animale tremble sans cesse. Les troubles involontaires agissent sur tout le corps entraînant une perte totale d'équilibre suivie par la paralysie des pattes chez les femelles, se terminant par la mort de l'individu. Cette paralysie partielle devient totale (Fig. 17-C-D) à la dose de 5000mg/kg chez les femelles et commence à apparaître chez les mâles, entraînant aussi la mort. La paralysie survient généralement après des heures de souffrance et de tremblement du corps le coma survient et l'animale meurt par arrêt respiratoire.



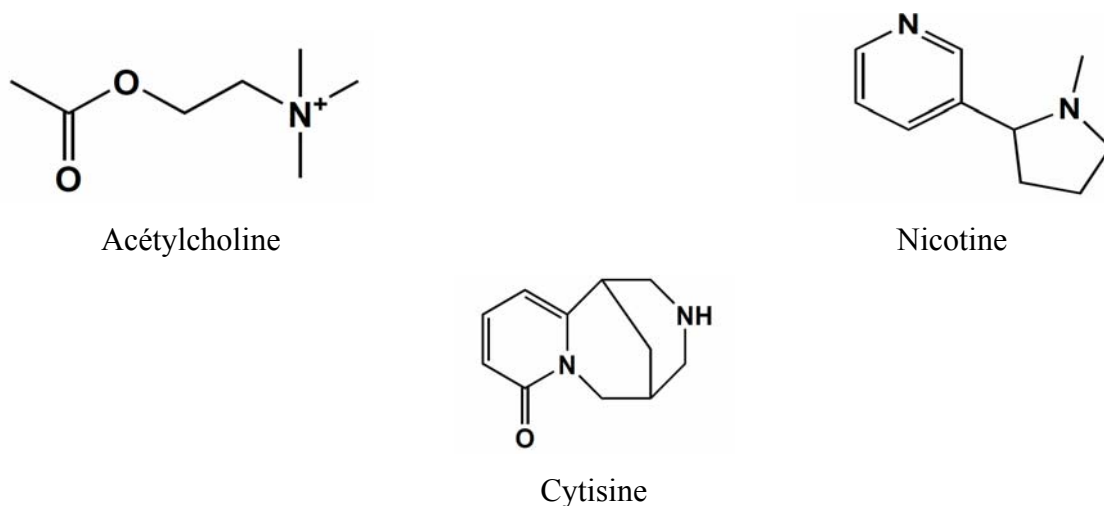
**Figure 17** : Les signes de toxicité aiguë apparentes sur les rats. (A) Redressement des poils et éloignement du rat dans un coin; (B) Les rats marquent une somnolence et fatigue; (C) Paralysie partielle d'une rate femelle suite à la dose 5000mg/kg; (D) Paralysie totale et coma d'un rat mâle à la dose 6000mg/kg; (E) Vomissement de la rate juste avant la mort à la dose 6000mg/kg; (F) Rate femelle allongée sur son ventre suite à la dose 6000mg/kg.

La dose qui a tué toutes les femelle est inférieure à celle qui a tué tous les mâles mais aussi les signes d'intoxication commencent à apparaître chez les femelles à des doses plus faibles que chez les mâles, ce qui indique que l'effet toxique est dépendant du sexe dont plusieurs

chercheurs ont démontrés cette dépendance (Baliga *et al.*, 2004). Dans notre étude les femelles été plus sensibles à l'intoxication aiguë par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* que les mâles.

Les convulsions, les vomissements, la respiration laborieuse et presque coupée, les paralysies et l'accélération du rythme cardiaque sont dus probablement à l'atteinte du système nerveux centrale. C'est ce qui est confirmé par notre étude phytochimique sur l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* qui a révélé la présence des alcaloïdes qui sont connus par leurs effets neurologiques, en particulier les alcaloïdes quinolizidiniques, dont les effets sont associés à plusieurs activités telles que l'hypoglycémie, l'hypotension et la dépression respiratoire (Kinghore et Balandrin, 1984; Wink, 1993).

Plusieurs recherches ont démontré que la présence des alcaloïdes dans les extraits des plantes est la cause de leur toxicité tels que les plantes de la famille des fabaceae. Les espèces appartenant aux genres *Baptisia*, *Sophora*, *Cytisus*, *Laburnum*, contiennent les alcaloïdes quinolizidiniques, en particulier la cytosine (Henry, 1999; Szentesi, 1991). Cette alcaloïde que nous avons identifiées aussi dans l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* ressemble dans sa structure chimique à l'acétylcholine et au nicotine (Fig. 18) (Coe *et al.*, 2005).



**Figure 18** : Structures chimique de quelques agonistes. L'ACH est le neurotransmetteur endogène (Coe *et al.*, 2005).

Les symptômes d'empoisonnement par la cytosine ressemblent à ceux d'empoisonnement par la nicotine incluant des nausées, des douleurs abdominales, des faiblesses musculaires, des vomissements, la stimulation respiratoire suivie d'une dépression respiratoire (Richards et Stephens, 1970). Ce sont des symptômes que nous avons remarqués chez les rats, suite à



l'administration des doses élevées de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

La cytosine et les alcaloïdes quinolizidiniques de façon générale sont des agonistes des récepteurs nicotinique et muscariniques de l'acétylcholine et inhibiteurs des canaux  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Carbonnelle *et al.*, 2003; Schmeller *et al.*, 1994). Ces données peuvent expliquer l'effet toxique des alcaloïdes quinolizidiniques sur les insectes, les vertébrés et autres organismes (Macías *et al.*, 2004).

On conclut que *Retama sphaerocarpa* est une espèce faiblement toxique et qui entraîne la mort des rats *Albino Wister* à des doses élevées par attaque neurologique provoquée par les alcaloïdes quinolizidiniques identifiés chez cette espèce.

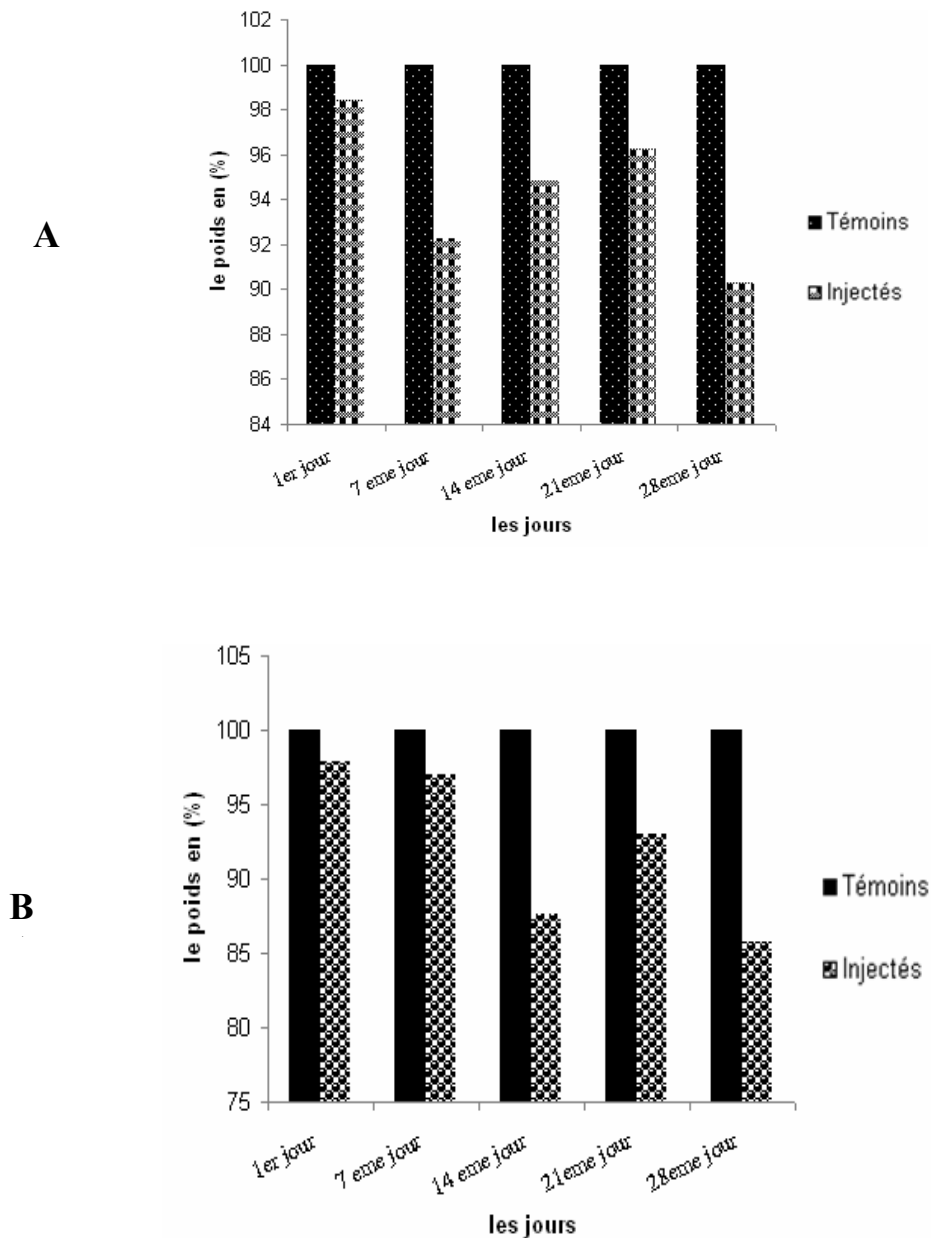
## **8. Etude de la toxicité subaiguë**

### **8.1 Les signes généraux**

Dans la présente étude, aucun mort n'a été signalé pendant l'expérience, mais au niveau du comportement général, les rats sont calmes, présentant une diminution de la vivacité et de l'appétit comparativement aux témoins; ils passent plus de temps à dormir.

### **8.2 Chronologie de l'évolution pondérale**

La suivie de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience de la toxicité subaiguë par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* a démontré qu'il y a une diminution du poids tout au long des 4 semaines pour les deux sexes, comparativement aux témoins (Fig. 19).



**Figure 19 :** Changement du poids corporel des rats dans les conditions de toxicité subaiguë par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*. Les valeurs sont données en pourcentage. (A) Femelles témoins et injectées; (B) Mâles témoins et injectés.

Le pourcentage de diminution était minimale durant la première semaine étant de 1.58 % pour les femelles et de 2.10 % pour les mâles, alors qu'il a atteint son maximum dans cette expérience durant la dernière semaine, prenant les valeurs de 9.68 % et 14.21% pour les femelles et les mâles respectivement, ces derniers ont présentés les pourcentages de diminutions les plus élevées (Tab. 9).

**Tableau 9:** Représentation des pourcentages de diminution du poids corporel des rats durant les 28 jours du traitement subaiguë par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

Les jours de traitement	% de diminution (Femelles)	% de diminution (Mâles)
1	1.58	2.10
7	7.73	2.97
14	5.18	12.32
21	3.76	6.97
28	9.68	14.21

Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly *et al.*, 2004). La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée. D'autres travaux ont démontrés aussi une diminution du poids des rats après administration par voie orale de l'extrait de *Chicococca alba* (Gazda *et al.*, 2006) et celui de *Stryphnodendron adstringens* (Rebecca *et al.*, 2002).

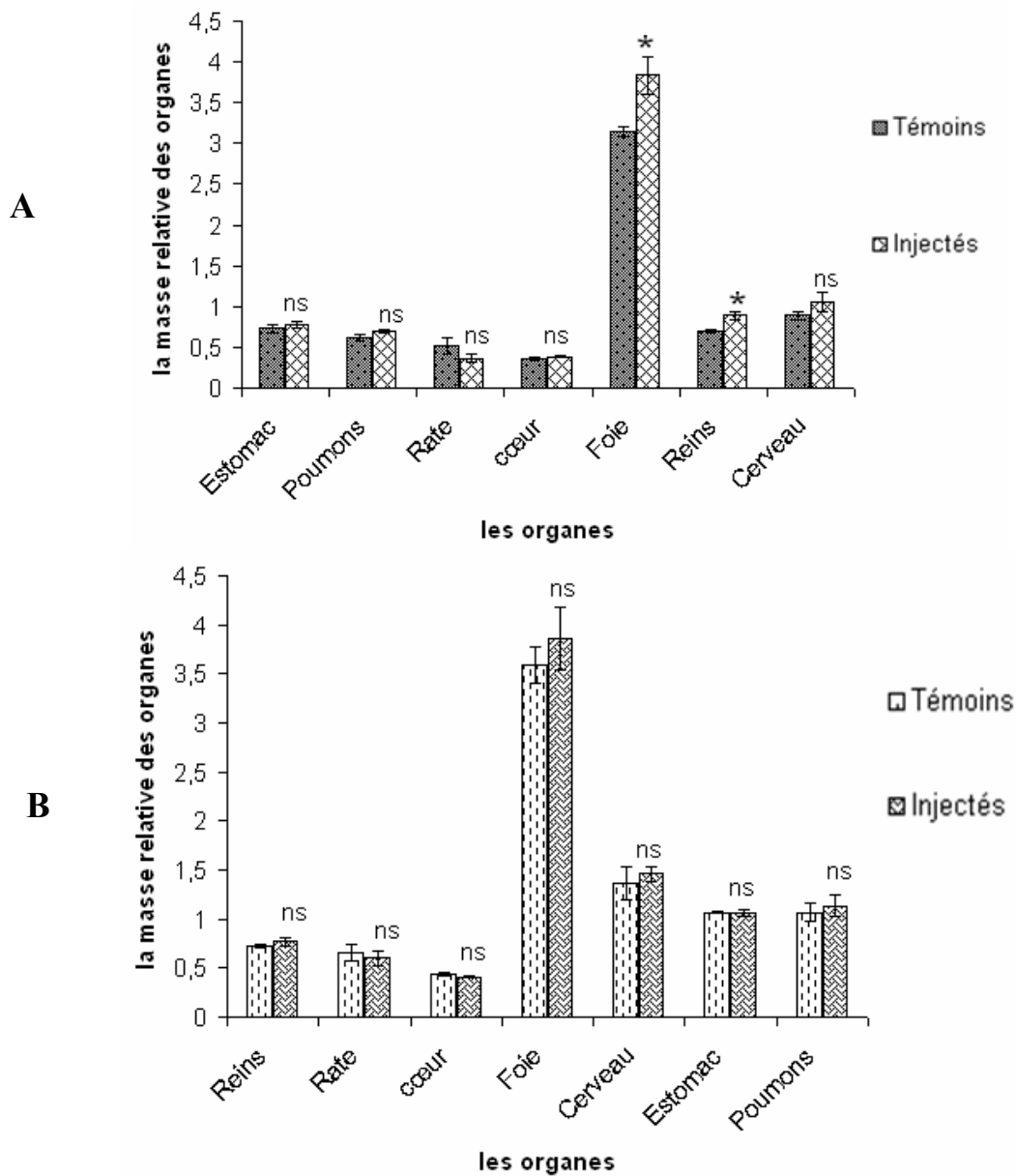
La diminution du poids corporel au cours des 28 jours de traitement quotidien suggère que l'administration subchronique et par voie orale de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* a des effets sur la croissance des rats *Albino Wistar*. Des analyses complémentaires doivent être effectuées.

### 8.3 La masse relative des organes

Après l'examen macroscopique des différents organes prélevés in situ, on a observé que leurs tailles et leurs formes sont normales; par contre les valeurs de la masse relative des reins, du foie, des poumons, du cerveau, de la rate, du cœur, et de l'estomac montrent une augmentation des reins, du foie, du cerveau et des poumons chez les deux sexes traités par rapport aux témoins. De point de vue statistique, les augmentations sont significatives chez les femelles (foie et reins) (Fig. 20).

Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* a des effets sur les organes mesurés. Généralement, le changement du poids des organes internes est un indice de

toxicité après l'exposition à une substance toxique (Raza *et al.*, 2002; Teo *et al.*, 2002). L'augmentation du poids du foie peut être liée à une congestion par réservation du sang dans le foie (Rasekh *et al.*, 2008). Ces résultats nécessitent cependant, des analyses plus approfondies pour connaître l'effet de l'extrait sur ces organes.



**Figure 20 :** Variation des valeurs de la masse relative des organes des rats au cours du traitement subaiguë avec l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*. (A) Femelles; (B) Mâles. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM (n=5); les étoiles représentent la signification selon le test d'ANOVA; \* : (p<0.05, Significative); ns: non significative.

### 8.4 Données hématologiques

Le système hématopoïétique est une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007). Les changements dans le système hématopoïétique ont une plus grande valeur prédictive pour la toxicité humaine, lorsque les données sont déduite des études réalisées sur des animaux (Olson *et al.*, 2000). A cet égard l'état de l'activité de la moelle osseuse et les effets intravasculaires ont été contrôlés par des examens hématologiques (Tab. 10). Les résultats indiquent une augmentation significative des GB, GR, HGB, CCMH, chez les femelles traitées et des GB et GR chez les mâles traités avec l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* par rapport aux témoins. Cependant on a signalé une diminution significative des PLT chez les deux sexes et des VGM chez les femelles comparativement aux témoins. Les paramètres HCT, TCMH ne montrent pas de changements significatifs chez les deux sexes.

**Tableau 10:** Analyses hématologiques des rats après traitement subaiguë de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

Tests hématologiques	F.T	F.I	M.T	M.I
GB <sup>a</sup>	6.354±0.24	10.78±0.71*	8.3±0.20	10.02±0.44*
GR <sup>b</sup>	6.47±0.37	8.60±0.36*	8.16±0.30	10.34±0.26*
HGB <sup>c</sup>	14.08±0.56	18.40±0.70*	14.44±0.56	14.44±0.46 <sup>ns</sup>
HCT <sup>d</sup>	39.04±1.9	41.94±3.17 <sup>ns</sup>	41.82±1.41	40.22±1.75 <sup>ns</sup>
VGM <sup>e</sup>	57.76±1.67	51.4±1.02*	51.3±1.25	48.92±1.79 <sup>ns</sup>
TCMH <sup>f</sup>	20.52±0.42	19.32±0.85 <sup>ns</sup>	17.68±0.39	17.92±0.52 <sup>ns</sup>
CCMH <sup>g</sup>	35.52±0.71	38.5±0.38*	34.52±0.24	35.22±0.47 <sup>ns</sup>
PLT <sup>h</sup>	562.8±28.71	428.8±16.57*	666.6±10.21	552.4±26.23*

Les données sont exprimées par moyenne±SEM; \*(Significative, p<0.05); ns (non significative); (F.T) Femelles témoins; (F.I) Femelles injectés; (M.T) Mâles témoins; (M.I) Mâles injectés; <sup>a</sup> Globules blancs (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>); <sup>b</sup> Globules rouges (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>); <sup>c</sup> Hémoglobine (g/dl); <sup>d</sup> Hématocrite (%); <sup>e</sup> Volume globulaire moyen (FL/cell); <sup>f</sup> Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg/cell); <sup>g</sup> Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dl); <sup>h</sup> Plaquettes (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>).

L'augmentation des érythrocytes et des leucocytes est due à la surproduction des éléments de régulation de l'hématopoïèse tels que les CSF (Colony stimulating factor), l'EPO (Erythropoïetin), la TPO (Thrombopoïetin) par les macrophages et les cellules stromales de la moelle osseuse et fournissant ainsi un environnement local favorable pour l'hématopoïèse

(Chang-Gue *et al.*, 2003; Udut *et al.*, 2005). Cette augmentation est associée à une élévation du taux d'hémoglobine et du CCMH chez les femelles indiquant ainsi l'augmentation de la concentration d'hémoglobine dans les globules rouges. On assiste donc à une hyperchromie (Bain, 2006).

La diminution du VGM émet la possibilité d'un changement dans la taille des globules rouges, mais on ne peut pas la prendre comme résultats sans recourir à d'autres analyses (Beck, 2009). La diminution du taux des plaquettes des rats traités par rapport aux témoins indique que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* a un effet sur la production des plaquettes ou induit la thrombopénie (réduction du nombre de plaquettes dans le sang). Cet effet est parmi les preuves d'effets toxiques sur l'hématopoïèse. En outre, avec une diminution du nombre de plaquettes, il y a un risque accru de saignements (Slichter, 2004). Ces résultats corroborent ceux de James *et al.*, (2010) qui rapportent que le taux des plaquette diminue chez les rats et les souris femelles après injection de l'extrait aqueux de *Polygala fruticosa*.

### 8.5 Données biochimiques

Plusieurs composés de plantes toxiques s'accumulent dans le foie où ils sont détoxifiés (Clarke et Clarke, 1977). Le foie est la première cible de la toxicité et le premier organe exposé à tout ce qui est absorbés dans l'intestin grêle; il métabolise les substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxique. (Rhiauani *et al.*, 2008). Le foie travaille en association avec les reins pour supprimer les substances toxiques du sang (Tulsawani, 2010).

Une étude de la fonction rénale et hépatique peut donc s'avérer utile pour évaluer les effets toxiques des plantes médicinales. Ces tests comprennent principalement la détermination de l'AST, ALT, CRE, LDH et autres (Tilkian, 1979) et toute nécrose des cellules hépatiques conduit à une hausse significative des enzymes AST, ALT, et LDH dans le sérum sanguin (Adeneye *et al.*, 2006).

Les études sériques effectuées sur les rats traités par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* montrent une augmentation significative des paramètres PAL, AST, CPK, LDH chez les femelles par rapport aux témoins et des paramètres PAL, AST, CPK, GLUC, LDH chez les mâles par rapport aux témoins. Les autres paramètres PT, CRE, ALT ne montrent pas de

changements significatifs, ils sont aux normes chez les deux sexes ainsi que le CHOL chez les mâles (Tab. 11).

**Tableau 11:** Analyses biochimiques des rats traités par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

Tests biochimiques	F.T	F.I	M.T	M.I
ALT <sup>a</sup>	37.2±3.42	30.4±4.43 <sup>ns</sup>	34.40±4.26	29.00±2.56 <sup>ns</sup>
PAL <sup>b</sup>	28.7±2.36	57.62±3.91*	33.98±4.72	69.88±7.70*
AST <sup>c</sup>	32.0±2.09	121.4±3.96*	31.00±2.60	130.60±5.07*
CHOL <sup>d</sup>	0.50±0.04	0.31±0.03*	0.54±0.03	0.53±0.06 <sup>ns</sup>
CPK <sup>e</sup>	228.80±16.14	283.0±11.43*	167.2±11.88	308.6±34.56*
CRE <sup>f</sup>	4.4±0.50	5.8±0.86 <sup>ns</sup>	5.20±0.37	5.00±0.31 <sup>ns</sup>
GLUC <sup>g</sup>	0.80±0.05	0.98±0.06 <sup>ns</sup>	0.73±0.03	0.97±0.06*
LDH <sup>h</sup>	537.20±47.37	762.20±46.38*	582.60±40.09	998.80±139.72*
PT <sup>i</sup>	68.78±2.56	61.3±2.14 <sup>ns</sup>	65.08±2.55	65.96±3.9 <sup>ns</sup>

Les données sont exprimées par moyenne±SEM., (n=5); \*(Significative, p<0.05); ns (non significative); (F.T) Femelles témoins, (F.I) Femelles injectées; (M.T) Mâles témoins, (M.I) Mâles injectés; <sup>a</sup> Alanine aminotransférase (U/l); <sup>b</sup> Phosphatase alcaline (U/l); <sup>c</sup> Aspartate aminotransférase (U/l); <sup>d</sup> Cholestérol (g/l); <sup>e</sup> Créatine phosphokinase (U/l); <sup>f</sup> Créatine (mg/l); <sup>g</sup> Glucose (g/l); <sup>h</sup> Lactate déshydrogénase (U/l); <sup>i</sup> Protéine total (g/l).

Toutefois les résultats indiquent une diminution significative du taux du cholestérol chez les femelles comparés aux témoins. Selon les travaux de Rasekh *et al.*, (2001), l'extrait aqueux de *T. poliuma* cause une réduction du taux du cholestérol total chez les rats. Ces auteurs attribuent cette diminution à la présence de quelques polyphénols et flavonoïdes doués de propriétés anti hyperlipidémique. Mary Sujin *et al.*, (2009) ont expliqués la diminution du taux du cholestérol dans le plasma par un problème de formation des micelles et des acides biliaires dans le tube digestif ce qui interfère avec l'absorption du cholestérol et dans ce cas le cholestérole est excrété. Ainsi la diminution du CHOL remarqué dans nos résultats nécessite plus de recherches et d'analyses pour expliquer ses causes.

L'AST est un enzyme considéré comme un bon indicateur de la fonction hépatique (Hilaly *et al.*, 2004) et un biomarqueur pour prédire la toxicité éventuelle (Rahman *et al.*, 2001). En générale l'élévation des transaminases dans le sang est un indice de dommage des cellules parenchymateuses du foie (Wolf *et al.*, 1972). En outre, l'AST trouvé dans le sérum est d'origine mitochondriale et cytoplasmique et toute augmentation peut être prise comme un

premier signe de lésions cellulaires qui mène à l'écoulement de l'enzyme dans le sérum (James *et al.*, 2010). Ainsi, l'augmentation significative d'AST suggère fortement que l'administration subchronique de *Retama sphaerocarpa* altère les hépatocytes et, par conséquent, le métabolisme du rat. L'AST est un enzyme dont la concentration est élevée dans les hépatocytes mais il est aussi largement distribué dans le cerveau, les reins, les muscles squelettiques et le myocarde (Sacher et McPherson, 1991). L'augmentation de cet enzyme est un indice d'une toxicité probable au niveau de ces organes et nécessite des analyses complémentaires. Toutefois, l'augmentation des taux d'AST et de CPK dans le sérum indique un effet toxique sur le cœur car ces enzymes sont utilisés pour indiquer les dommages survenus au cœur (Varley *et al.*, 1980). L'élévation du taux du glucose dans le sang peut être due à des dommages induits par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* dans le pancréas (Burtis *et al.*, 1994). Ces résultats rejoignent ceux de Baliga *et al.*, (2004) qui ont administré l'extrait de *Alstonia scholaris* riche en alcaloïdes à des souris et des rats par voie orale.

L'élévation significative du LDH associée à l'élévation du CPK représente le premier indicateur de la myopathie. C'est une potentialité des dommages musculaires car ces deux enzymes ont des valeurs diagnostiques des problèmes du myocarde (muscle du cœur) ou du muscle squelettique. Ces résultats corroborent ceux acquis par Rasekh *et al.*, (2008) qui ont observés l'augmentation significative du LDH et du CPK suite à l'administration de l'extrait de *Galega officinalis* (fabacées), par voie orale, à des rats *Albino Wistar*.

Par conséquent, on suggère que *Retama sphaerocarpa* peut causer des dommages musculaires chez les rats *Albino Wistar* des deux sexes. Ce résultat confirme la toxicité aiguë qui conduit à la mort des rats par paralysie, suite à une atteinte neurologique par les alcaloïdes quinolizidiniques contenus dans l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa*.

PAL est un enzyme généralement mesurée pour indiquer l'obstruction des canaux biliaires. Des niveaux élevés de PAL existent dans les cellules qui se divisent rapidement ou celle dans le métabolisme est active. Ces cellules comprennent l'épithélium des voies biliaires et du foie, granulocytes de la circulation sanguine, l'épithélium intestinale, le tubule proximal du rein, le placenta et la lactation des glandes mammaires. Les augmentations de PAL surviennent dans les cirrhoses biliaires primitives; dans les conditions de désorganisation de l'architecture hépatique et dans les maladies caractérisées par l'inflammation, la régénération et l'obstruction



des canalicules biliaires intrahépatiques (Sacher et McPherson, 1991). Dans notre étude PAL augmente significativement chez les deux sexes ce qui mène à suggérer que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* provoque des effets directs sur le foie et les reins. Une étude histologique est nécessaire pour plus de précision sur l'état de l'organe, outre, une étude de toxicité chronique est recommandée. Ces résultats rejoignent ceux de Witthawaskul *et al.*, (2003) qui notent une augmentation significative de PAL chez les rats injectés par l'extrait de *Schefflera leucantha*.

La toxicité de l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* observée dans ces études peut être due à divers constituants organiques actifs présent dans cet extrait tels que les alcaloïdes toxiques que nous avons identifié chez cette espèce.

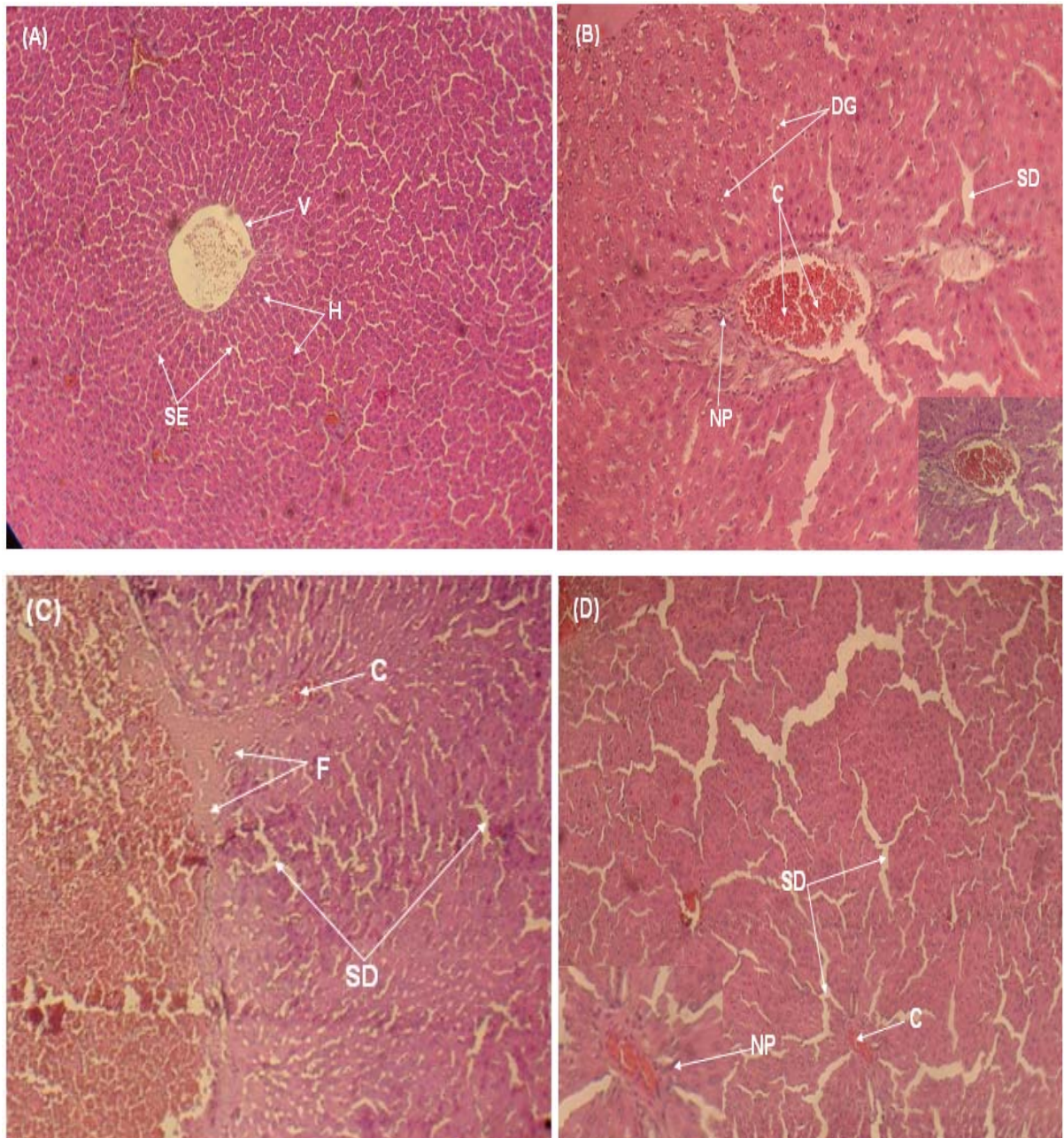
## 8.6 Histopathologie

Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans la figure 21. Les foies des rats mâles et femelles témoins sont normaux avec des hépatocytes séparées par des sinusoides étroite. On remarque chez les rats injectés des modifications dégénératives; l'architecture du tissu hépatique est partiellement effacée, les sinusoides sont dilatées et les veines marquent des congestions vasculaires (Fig. 21). Ces altérations expliquent souvent l'augmentation du volume du foie et l'amaigrissement de l'animal. Rasheed *et al.*, (2009) ont démontrés des cas semblables chez les rats *Albino* après injection de l'extrait de *Eugenia jambolana*.

Toutefois, les résultats indiquent qu'il n'y a pas encore de mort cellulaire mais une nécrose périlobulaire débutante qui peut mener à long terme à la mort cellulaire. D'autre part une dégénérescence graisseuse survient chez les femelles et dans quelques cas des fibroses (Fig. 21-B).

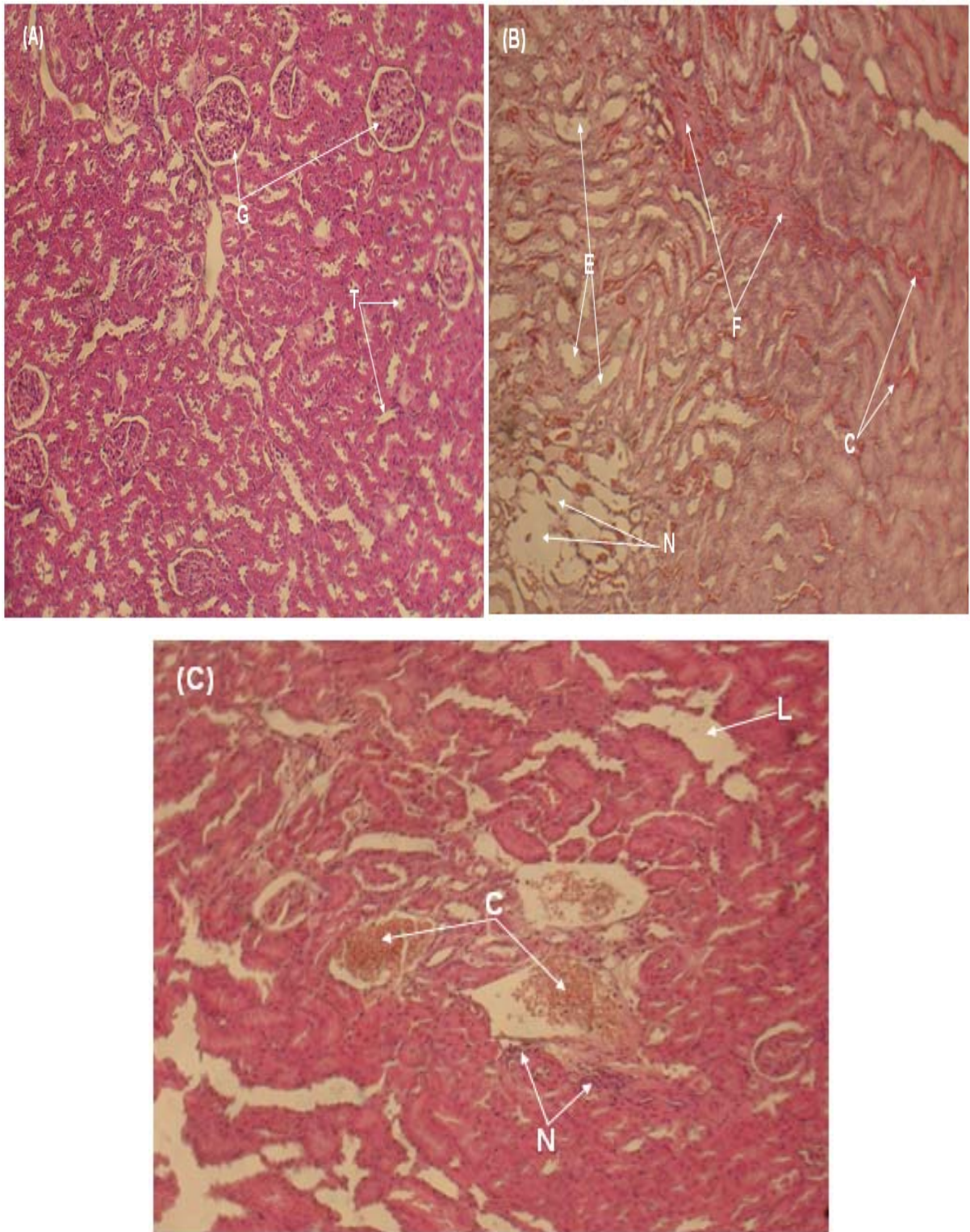
Les reins des rats témoins des deux sexes montrent des glomérules et des tubules normaux, cependant, les reins des animaux injectés par l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* démontrent des modifications histopathologies chez les deux sexes caractérisé par des congestion et des nécroses tubulaires, un élargissement de la lumière tubulaire et une fibrose chez les femelles marqué par un épaissement fibreux (Fig. 22).

De telles altérations hépatiques et rénales sont induites par D'autres plantes contenant des alcaloïdes toxiques tel que *Atractylis gummifera*, *Callilepsis laureola* (Larrey, 1997; Peyrin-Biroulet *et al.*, 2004).



**Figure 21** : Photomicrographies sélectionnées du foie des rats. (A) Mâle témoin; (B) et (C) Femelle injectée; (D) Mâle injecté. Coloration éosine hématoxyline/Grandissement X 40. Flèches: (H) Hépatocytes; (V) Veine; (SE) Sinusoïdes étroites; (C) Congestion; (DG) Dégénérescence graisseuse; (SD) Sinusoïdes dilatées; (NP) Nécrose périlobulaire; (F) Fibrose.





**Figure 22 :** Photomicrographies sélectionnées des reins des rats. (A) Femelle témoin; (B) Femelle injectée; (C) Mâle injecté. Coloration éosine hématoxyline/Grandissement X 40. Flèche: (G) Glomérules; (T) Tubules; (E) Elargissement tubulaire; (F) Fibrose; (C) Congestion; (N) Nécrose; (L) Lésion tissulaire.

La cytotoxicité directe est connue pour étant la cause fondamentale des dommages du foie dans certains cas, tandis que dans d'autres les mécanismes immunologiques ou même un mélange de cytotoxicité et d'immunogénicité peuvent être impliqués (Ingwale *et al.*, 2009). Cette anomalie dans le foie et le tissu rénal pourrait être due à la présence de certains composés toxiques dans l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* qui a été injecté aux rats, ces substances toxiques peuvent être les alcaloïdes dans la toxicité est grandissante suite à une transformation en métabolites réactifs toxiques. Au niveau hépatique les métabolites sont formés non seulement dans les hépatocytes mais aussi dans les cellules endothéliales qui sont particulièrement sensibles. Il en résulte une atteinte vasculaire prédominante, secondairement responsable de la nécrose hépatocytaire. Lorsque les lésions observées restent limitées, l'évolution se fait vers une guérison complète. A l'inverse lorsqu'elles sont étendues, on peut observer une insuffisance hépatocellulaire pouvant être mortelle. L'évolution peut se faire de façon plus insidieuse et aboutir à une hépatopathie chronique simulant une cirrhose (Schuppan *et al.*, 1999; Pageaux *et al.*, 2003).

Ce mécanisme pourrait expliquer les lésions hépatiques observées chez l'animale et ainsi chez l'homme. La toxicité paraît dose-dépendante; les atteintes aiguës résultent d'une exposition courte à de fortes doses alors que des lésions chroniques sont liées à une exposition prolongée à dose plus faible.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le rôle dans la médecine traditionnelle joué par les plantes est connu depuis fort longtemps, **or**, la recherche apporte les preuves scientifiques de leur efficacité, mais aussi de leur toxicité, reposant sur des données résultants de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*.

Parmi les plantes médicinales traditionnelles il y en a celles qui peuvent être toxiques à de fortes doses ou après administration prolongée, en même temps qu'elles sont une source de molécules naturelles actives douées de propriétés antioxydantes.

L'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ces effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer son utilisation non contrôlée. Notre étude est basée sur l'espèce *Retama sphaerocarpa*, une légumineuse endémique du bassin méditerranéen utilisée comme vulnéraire, vomitive, purgative, vermifuge, sédative, antiseptique et contre la gale humaine et animale. L'emploi continu de cette plante peut entraîner des effets secondaires pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu. Le risque causé serait en corrélation étroite avec la dose administrée.

Dans ce présent travail, *Retama sphaerocarpa* a été étudiée sur plusieurs niveaux: la phytochimie des extraits de cette plante, leurs activités antioxydantes, et le côté toxique de son extrait aqueux.

La phytochimie de l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* a révélée une prépondérance de la présence de plusieurs isoflavones, toutefois des essais sur l'extrait aqueux de la même espèce démontrent la présence des alcaloïdes quinolizidiniques.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Retama sphaerocarpa* a été évaluée par l'étude de leur pouvoir à piéger 50 % du radical DPPH (IC<sub>50</sub>) et par le test de  $\beta$ -carotène/acide linoléique. Les résultats indiquent que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* présente la plus grande activité antioxydante par les deux méthodes. Ceci nous a permis de déduire que l'activité antioxydante des différents extraits de *Retama sphaerocarpa* est en relation avec la quantité des polyphénols présents dans la plante.

Les renseignements tirés à partir de l'ensemble des résultats présentés dans ce travail sur les données expérimentales de la toxicité aiguë chez les rats femelles et mâles *Albino Wistar*

suggèrent de classer *Retama sphaerocarpa* dans la catégorie des plantes faiblement toxiques par voie orale. L'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* peut entraîner des symptômes de toxicité qui sont dépendante de la dose allant d'une simple somnolence, des pertes d'appétit, des problèmes de respiration et des accélération du rythme cardiaque et arrivant jusqu'à des convulsions, des tremblements, des comas et des paralysies des pattes et même des paralysies totales entraînant la mort. Ces effets pourraient être du à la présence des alcaloïdes toxiques. Toutefois la toxicité subaiguë démontre que l'extrait aqueux de *Retama sphaerocarpa* agit sur la croissance normale des rats mâles et femelles et perturbe quelques paramètres hématologiques et biochimiques liés à la fonction hépatique, rénale et musculaire. L'observation histologique s'est caractérisée par des altérations structurales du foie et du rein. L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* nous ont permis d'avoir une idée sur les activités biologiques de *Retama sphaerocarpa*, mais d'autres études plus poussées sont souhaitable

En perspectives,

Nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant:

- Des expériences ultérieures utilisant des extraits purifiés pour identifier précisément les composés responsables de l'activité antioxydante;
- Des études de toxicité chronique sur *Retama sphaerocarpa*, afin de déterminer les effets à long terme;
- Des tests complémentaires de toxicité sur *Retama sphaerocarpa* par d'autre voie que celle orale;
- Un isolement des alcaloïdes de cette plante et leurs applications dans des essais de toxicité pour une identification plus précise du principe actif toxique de cette espèce.

Les gens doivent être informés des sujets a risques liés à l'utilisation non contrôlée de cette plante.

Enfin, des études pharmacologiques et toxicologiques à grande échelle sont nécessaires pour la production des molécules naturelles actives et pour une modération de sécurité dans l'utilisation de cette plante.

# RÉFÉRENCES



## RÉFÉRENCES

- Abdel-Halim, O.B., 1995. (-)-6 $\alpha$ -Hydroxylupanine, a lupine alkaloids from *lygos raetam* var. *sarcocarpa*. *Phytochemistry* 40, 1323.
- Abdille, M.D.H., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry* 90, 891-896.
- Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I., Bello, S.O., 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 374-379.
- Agbor, G.A., Kuate, D., Oben, J.E., 2007. Medicinal plants can be good source of antioxidants: case study in Cameroon. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 537-544.
- Allen, O.N., Allen, E.K., 1981. The leguminosae: a Source book of characteristics, Uses and Nodulation. Ed Macmillan, London, pp. 577-578.
- Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc* 75, 199-212.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., Özkan, H., 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol* 44, 247-252.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P., 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry* 89, 27-36.
- Azzi, A., Davies, K.J.A., Kelly, F., 2004. Free radical biology-terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 558, 3-6.
- Bahorum, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-Forsch* 46, 1086-1089.
- Bain, B.J., 2006. Blood cells a practical guide. Ed Blackwell, Australia, pp. 71-89.
- Balandrine, M.F., Robbins, E.F., Kinghorn, A.D., 1982. Alkaloids of Papilionoideae. *Biochem. Syst. Ecol* 10, 307-318.
- Baliga, M.S., Jagetia, G.C., Ulloor, J.N., Baliga, M.P., Venkatesh, P., Reddy, R., Rao, K.M., Baliga, B.S., Devi, S., Raju, S.K., Veeresh, V., Reddy, T.K., Bairy, K.L., 2004. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of *Sapthaparna* (*Alstonia scholaris*) in mice and rats. *Toxicology Letters* 151, 317-326.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Method Microbiol* 24, 391-416.
- Beck, N., 2009. Diagnostic hematology. Springer, London, pp. 214-215.

- Bellakhdar, J., 1978. Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes. Ed Technique Nord-Africaines, Maroc, p. 365.
- Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed Ibis Press, Maroc, pp. 318-319.
- Belsky, A.J., Canham, C.D., 1994. Gaps, patches, and isolated trees: a comparison of the patch dynamics of forest gaps and savanna trees. *BioScience* 44, 77-84.
- Bensalem-bendjelloul, M., 1998. Techniques histologiques théorie et pratique. Office des publications universitaires, Alger, pp. 6-41.
- Ben-Romdhane, S., Romdane, M.N., Feki, M., Sanhagi, H., Kaabachi, N., M'Bazaa, A., 2003. Valeurs usuelles des principaux constituants biochimiques sériques du dromadaire (*Camelus dromedarius*). *Méd. Vét* 154(11), 695-702.
- Bhat, S.V., Nagasampagi, B.A., Sivakumar, M., 2005. Chemistry of Natural Products. Ed Narosa, New Delhi, p. 237.
- Bhattacharyya, B., Johri, B.M., 1998. Flowering plants, taxonomy and phylogeny. Ed Springer-Verlag, Berlin, pp. 253-256.
- Bicchi, C., Binello, A., Rubiolo, P., 2000. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis* 11, 236-242.
- Bismuth, C., Baud, F., Conse, F., Fréjaville, P.P., Garnier, R., 1987. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Science, Paris, p. 956.
- Boizot, N., Charpentier, J.P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'Inra, pp. 79-82.
- Bondet, V., Williams, W.B., Berset, C., 1997. Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30, 609-615.
- Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M.C., Sastre, J., Pallardó, F.V., G.E., Viña, J., 2006. Genistein, a soy isoflavone, upregulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB. *The FASEB Journal* 20, 2136-2138.
- Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G., 2009. *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of *rhizobia* that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 245-255.
- Bovy, A., Schijlen, E., Hall, R.D., 2007. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): The potential for metabolomics. *Metabolomics* 3, 399-412.
- Brande-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Tehnologie* 28, 25-30.
- Brenner, A.J., Cueto, Romero, M., Garcia, Haro, J., Gilabert, M.A., Incoll, L.D., Martinez Fernandez, J., Porter, E., Pugnaire, F.I., Younis, M.T., 1995. A comparison of direct and indirect methods for measuring leaf and surface areas of individual bushes. *Plant, Cell and Environment* 18, 1332-1340.

- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed Tec & Doc Lavoisier, Paris, p. 1120.
- Burits, M., Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14, 323-328.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Tietz, N.W., 1994. Teitz Text Book of clinical Chemistry, Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 2064.
- Callaway, R.M., 1997. Positive interactions in plant communities and the individualistic-continuum concept. *Oecologia* 112, 143-149.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M., Roldán, A., 2003a. Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecol. Manag* 182, 49-58.
- Caravaca, F., Figueroa, D., Alguacil, M.M., Roldan, A., 2003b. Application of composted urban residue enhanced the performance of afforested shrub species in a degraded semiarid land. *Bioresour Technol* 90, 65-70.
- Carbonnelle, E., Sparatore, F., Canu-Boido, C., Salvagno, C., Baldani-Guerra, B., Terstappen, G., Zwart, R., Vijverberg, H., Clementi, F., Gotti, C., 2003. Nitrogen substitution modifies the activity of cytosine on neuronal nicotinic receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 471, 85-96.
- Carrée, P., 1953. Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed Ballière, Paris, p.475.
- Chang-Gue, S., Seung-Hyun, H., Jung-Hyo, C., Jang-Woo, S., Chin-Ho, C., Yeon-Weol, L., Chong-Kwan, C., 2003. Induction of hemopoiesis by saenghyuldan, a mixture of *Ginseng radix*, *Paeoniae radix alba*, and *Hominis placenta* extracts. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 120-126.
- Clarke, E.G.C., Clarke, M.L., 1977. Veterinary Toxicology. Ed Cassel and Collier Macmillan, London, pp. 268-277.
- Coe, J.W., Vetelino, M.G., Bashore, C.G., 2005. In pursuit of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor partial agonists for smoking cessation: carbon analogs of (-)-cytosine. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 2974-2979.
- Cordero, M.C., Ayuso, M.J., Richomme, P.; Bruneton, J., 1989. Quinolizidine Alkaloids from *Viscum cruciatum*, hemiparasitic shrub of *Lygos sphaerocarpa* planta. *Med* 55, 196.
- Cordero, M.C., Gil Serrano, A.M., Ayuso Gonzalez, M.J., 1991. Variations of alkaloids from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Plant. Med. Phytother* 25, 157-160.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
- Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H., 1994. Antioxidant constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and food chemistry* 42, 665-669.

- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van-Beek, T.A., Linssen, P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedure from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the science of food and agriculture* 77, 140-146.
- De Andrés, F., Walter, I., Tenorio, J.L., 2007. Revegetation of abandoned agricultural land amended with biosolids. *Sci Total Environ* 378, 81-83.
- De Witt, H., 1963. Les plantes du monde. Ed Hachette, Paris, pp. 308-323.
- Dewick, P.M., 2001. Medicinal Natural Products. Wiley, UK, pp. 6-291.
- Djabeur-Kaid-Harche, A., Taieb-Brabim-Bokhari, H., Selami, N., Sangare, M., Mahboubi, S., 2007. Contribution à la connaissance de deux rétames: *Retama monosperma* et *R. reatam* 2, 572-578.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, b., Boutassouna, A., Stocker, c., Vidal, N., 2005. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97, 654-660.
- Diamand, L., Doluisio, J., Crouthamel, W., 1970. Physiological factors affecting intestinal drug absorption. *Eur. J. Pharmacol* 11, 109.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65(4), 337-353.
- Diezi, J., 1989. Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. Ed Slatkine, Genève, pp. 33-44.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Domingo, F., Moro, M.J., Sánchez, G., Brenner, S.A.J., van Gardinge, P.R., 1997. Leaf and canopy boundary layer conductances of two semiarid species (*Retama sphaerocarpa* L. Bioss, and *Stipa tenacissima* L.). *Mediterránea Ser. Biol* 16, 37-43.
- Domingo, F., Sánchez, G., Moro, M.J., Brenner, A.J., Puigdefábregas, J., 1998. Measurement and modelling of rainfall interception by three semi-arid canopies. *Agricultural and Forest Meteorology* 91, 275-292.
- Domingo, F., Villagarcía, L., Brenner, A.J., Puigdefábregas, J., 1999. Evapotranspiration modele for semi-arid shrub-lands tested against data from SE Spain. *Agricultural and Forest Meteorology* 95, 67-84.
- Dooner, H.K., Robbins, T.P., Jorgensen, R.A., 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 25, 173-199.
- Dragsted, A., Lang, B., 1957. Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Annales pharmaceutiques Française*, p.11.
- Edziri, H., Mastouri, M., Ammar, S., Matieu, M., Patrich, G., Hiar, R., Mahjoub, M.A., Ali, S.M., Laurent, G., Zine, M., Aouni, M., 2008. Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2933-2940.

- El-Shazly, A., Ateya, A.M., Witte, L., Wink, M., 1996. Quinolizidine Alkaloid profile of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Z. Naturforsch* 51, 301-308.
- Erlund, I., 2004. Review of the flavonoïds quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary source, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* 24(10), 851-874.
- Espigares, T., López-Pintor, A., Rey Benayas, J.M., 2004. Is the interaction between *Retama sphaerocarpa* and its understorey herbaceous vegetation always reciprocally positive? Competition–facilitation shift during *Retama* establishment. *Acta Oecologica* 26, 121-128.
- Forkmann, G., Heller, W., 1999. Comprehensive natural products chemistry. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 713–748.
- Forti, M., Lavie, Y., Ben-Dov, Y., Pauker, R., 2006. Long-term plant survival and development under dryland conditions in an experimental site in the semi-aride Negev of Israel. *J Arid Environ* 65, 1-28.
- Gazda, V.E., Gomes-Carneiro, M.R., Barbi, N.S., Paumgarten, F.J.R., 2006. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 187–195.
- Gómez-Sal, A., Benayas, J.M., López-Pinter, A., Rebollo, S., 1999. Role of disturbance in maintaining a savanna-link pattern in Mediterranean *Retama sphaerocarpa* shrubland. *J. Veg. Sci* 10, 365-370.
- Graham, H.D., 1992. Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and food chemistry* 40, 801-805.
- Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Sahin, F., 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Saturja hortensis* L. *Journal of Agricultural and food chemistry* 51, 3958-3965.
- Haase, P., Pugnaire, F.I., Fernández, E.M., Puigdefábregas, J., Clark, S.C., Incoll, L.D., 1996. Investigation of rooting depth in the semi-arid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.)Boiss. By labeling of ground water with a chemical tracer. *J. Hydrol* 170, 23-31.
- Haase, P., Pugnaire, F.I., Clark, S.C., Incoll, L.D., 1999. Diurnal and seasonal changes in cladode photosynthetic rate in relation to canopy age structure in the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*. *Functional Ecology* 13, 640-649.
- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol* 49, 1341-1348.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free radicals in biology and medicine. Ed, Clarendon Press, Oxford.
- Hamza, N., Berkea, B., Chezea, C., Aglib, A.N., Robinsona, P., Ginc, H., Moorea, N., 2010. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algéria. *Journal of Ethnopharmacology* 128(2), 513-518.

- Harborne, J.B., 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep* 18, 361–379.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harborne, J. B., Herbert, B., 1995. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Ed Taylor & Francis, London.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. *Pharmacol Therap* 96, 67-202.
- Hayase, F., Kato, H., 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. *Journal of Natural Science Vitaminology* 30, 37-46.
- Hein, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004. Polyphénols végétaux, source, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 1, 3-6.
- Henry, T.A., 1999. *The plant alkaloids*. Anmol Publications PVT.LTD, New Delhi, pp. 119-120.
- Hilaly, J.E., Israili, Z.H., Lyouss, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43–50.
- Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M., Poljakovic, M., 2009. The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. *European Journal of Scientific Research* 28 (3), 471-477.
- Ingwale, D., Kshirsagar A., Ashok, P., Vyawahare, N., 2009. Role of atioxidat in the maagmet of hepatic complications. *Pharmacologyonline* 1, 238-253.
- James. T., Mukinda, P., Eagles, F.K., 2010. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1), 236-240.
- Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food. Chem* 101, 410–418.
- Karber, C., Behrens, B., 1935. Wie sind Reihenversuche fur biologische Auswertungen am Zweckmässigsten Anzuordnen?. *Arch. Exp. Path. Pharm* 177, 379-388.
- Kassem, M., Mosharafa, S.A., Saleh, N.A.M., Abdel-Wahab, S.M., 2000. Two new flavonoids from *Retama retam*. *Fitoterapia* 71, 649-654.
- Keeler, R., 1976. Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupins. III. Identification of anagryne as the probable teratogen by feeding trials. *J.Toxic.Environm. Health* 1, 887-898.
- Keïta, A., 2005. Etude de trois plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère gastro-duodéal dans le district de Bamako: *Borassus aethiopum* Mart (palmeae), *Sclerocarya birrea* (A. Rich). *Hochst.* (Anacardiaceae) et *Ximenia americana* L. (Olacaceae). Thèse de doctorat. Bamako, p. 42.

- Kinghore, A.D., Balandrin, M.F., 1984. Quinolizidines alkaloids of the leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. Willey, New York, pp. 105-148.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* 16, 123-132.
- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., Oreopoulou, V., 2007. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 155-162.
- Kutchan, T. M., 1995. Alkaloid Biosynthesis [mdash] The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* 7, 1059-1070.
- Lansac, A. R., Zaballos, J. P., Martin, A., 1994. Seasonal water potential changes and proline accumulation in mediterranean shrubland species. *Vegetado* 113, 141-154.
- Larrey, D., 1997. Hepatotoxicity of herbal remedies. *J Hepatol* 26, 47-51.
- Lauwerys, R.R., 2003. Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles, Ed MASSON, Paris, p.12.
- Liang, J., Tian, Y.X., Fu, L.M., Wang, T.H., Li, H.J., Wang, P., Han, R.M., Zhang, J.P., Skibsted, L.H., 2008. Daidzein as an Antioxidant of Lipid: Effects of the Microenvironment in Relation to Chemical Structure. *J. Agric. Food Chem* 56(21), 10376–10383.
- Litchfield, J.T., Wilcoxon, F.A., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 96, 99-113.
- López-Lázaro, M., Martín-cordero, C., Cortés, F., Piñero, J., ayuso, M.J., 2000. Cytotoxic Activity of Flavonoids and Extracts from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Zeitschrift für Naturforschung* 55, 40-43.
- López-Lázaro, M., Martín-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F., Ayuso-González, M.J., 1998. An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry* 48(2), 401-402.
- López-Pinter, A., Gómez Sal, A., Rey Benayas, J.M., 2006. Shrubs as a source of spatial heterogeneity -the case of *Retama sphaerocarpa* in mediterranean pastures of central Spain. *Acta oecologica* 29, 247-255.
- Louaar, S., Akkal, S., Bousetta, A., Medjroubi, K., Djrri, L., Seguin, E., 2005. Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*. *Chemistry of Natural Compounds* 41, 107-108.
- Louaar, S., Akkal, S., Laouer, H., Guilet, D., 2007. Flavonoides of *Retama sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(5), 616-617.
- Macías, F.A., Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G., 2004. Allelopathy. Ed eBook, Florida, pp. 183–200.
- Mann, J.; Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V., Harborne, J.B., 1994. Natural Products: Their chemistry and biological significance. Longman, London, p. 389.

- Martin Cordero, C., Gil, A.M., Ayuso, M.J., 1993. Transfer of bip iperidyl and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* Sieber (Loranthaceae) hemiparasitic on *Retama sphaerocarpa* Boissier (Leguminosae). *J. Chem. Ecol* 19, 2389-2393.
- Mary Sujin, R., Mary Subin. R., Mahesh, R., Vinolyia, J.J., 2009. The Effect of Anti-Diabetics in Kidney of Rats. *Ethnobotanical Leaflets* 13, 689-701.
- Matkowski, A., 2006. Plant phenolic metabolites as antioxidants and mutagenesis inhibitors. In: Blume, Y., Durzan, D.J., Smertenko, P., 2006. Cell biology and instrumentation: UV radiation, nitric oxide and cell death in plants, IOS Press, Amsterdam, pp. 48-129.
- Matkowski, A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. *Biotechnology Advances* 26, 548-560.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reine, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy-tother.Res* 15, 127-130.
- Menvielle-Bourg, F.J., 2005. Plantes et vieillissement, données actuelles. *Phytothérapie* 2, 57-71.
- Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society* 48, 91.
- Miller, L.C., Tainter, M.L., 1944. Estimation of ED<sub>50</sub> and its error by means of logarithmic. Probit paper. *Proc Soc Exp Biol Med* 57, 261-4.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J Sci Technol* 26, 211-219.
- Morales Mendez, A., Gonzalez Gonzales, A., Diaz Rodriguez, F., 1971. Alkaloids from the bark of *Retama monosperma*. *Rev. Fac. Farm* 8, 77-87.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Carpena-Ruiz, R.O., Esteban, E., 2008. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71, 466-473.
- Moro, M.J., Pugnaire, F.I., Haase, P., Puigdefábregas, J., 1997a. Effect of the canopy of *Retama sphaerocarpa* on its understorey in a semi-arid environment. *Funct.Ecol* 11, 425-431.
- Moro, M.J., Pugnaire, F.I., Haase, P., Puigdefábregas, J., 1997b. Mechanisms of interaction between a leguminous shrub and its understorey in a semi-arid environment. *Ecography* 20, 175-184.
- Mukinda, J.T., Syce, J.A., 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 138-144.
- Mullero, M.C., 1945. Los territorios españoles de Sahara y sus grupos numados. Las Canarias. Maroc.
- Nene-Bi, S.A., Traore, F., Soro, T.Y., Souza, A., 2009. Etude phytochimique et pharmacologique de *Bridelia feruginea benth* (euphobiaceae) sur la motricité du *taenia coli* de cobaye. *Afrique science* 05(2), 305-320.



- Neuner-jehle, N., Nesvadba, H., Spiteller, G., 1964. Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden. *Mh. Chemic* 95, 687-709.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Deun, K.V., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 56–67.
- Organisation Mondiale de la santé (OMS), 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM, Genève, p. 65.
- Pageaux, G., Larrey, D., 2003. Alternative medicine, vitamins and natural hepatotoxins. In *Drug-Induced liver disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 709–724.
- Peyrin-Biroulet, L., Barraud, H., Petit-Laurent, F., Ancel, D., Watelel, J., Chone, L., Hudziak, H., Bigard, M.A., Bronowicki, J.P., 2004. Hépatotoxicité de la phytothérapie: données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroenterol Clin Biol* 28, 540-550.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16(4), 233-239.
- Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Manunta, A., 1998. Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products* 61, 1404-1406.
- Price, M.P., Butler, L.G., 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of *sorghum* grain. *Journal of Agricultural and food chemistry* 25, 1268-1273.
- Pugnaire, F.I., Haase, P., Puigdefàbregas, J., Cueto, M., Clark, S.C., Incoll, L.D., 1996. Facilitation and succession under the canopy of a leguminose shrub, *Retama sphaerocarpa* in a semi-arid environment in south-east Spain. *Oikos* 76, 455-464.
- Pugnaire, F., Lázaro, R., 2000. Seed bank and understory species composition in a semi-arid environment: The effect of shrub age and rainfall. *Ann. Bot* 86, 807-813.
- Pugnaire, F.I., Luque, M.T., Armas, C., Gutiérrez, L., 2006. Colonizaion processes in semi-arid Mediterranean old-fiels. *Journal of Arid Environments* 65, 591-603.
- Quezel, P., Santa, S., 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 475–476.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K., Jamil, K., 2001. Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. *Human and Experimental Toxicology* 20, 243–249.
- Ramade, F., 1979. Ecotoxicologie, Ed Masson, Paris, pp. 5.
- Ramírez, J.H., Palacios, M., Tamayo, O., Jaramillo, R., Gutiérrez, O., 2007. Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 348-353.
- Rasekh, H.R, Khoshnood-Mansourkhani, M.J., Kamalinejad, M., 2001. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia* 72, 937-939.

- Rasekh, H.R., Nazari, P., Kamli-Nejad, M., Hosseinzadeh, L., 2008. Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 21-26.
- Rasheed, S., Tahir, M., Sami, W., Munir, B., 2009. Histological effects of *Eugenia Jambolana* extract on liver of adult Albino rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 21(1), 148-151.
- Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, T.M., Al-Majed, A.A., 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* 70, 135–145.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evens, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237.
- Rebecca, M.A., Ishii-Iwamoto, E.L., Grespan, R., Cuman, R.K.N., Caparroz-Assef, S.M., Mello, J.C.P., Bersani-Amado, C.A., 2002. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 101–104.
- Reidenberg, M., 1974. Kidney disease and drug metabolism. *Med. Clin. N. Am* 58, 1059.
- Requena, N., Jimenez, I., Toro, M., Barea, J.M., 1997. Interaction between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol* 136, 667-677.
- Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Badiia Lyoussi, B., 2008. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 118, 378–386.
- Richards, H.G., Stephens, A., 1970. A fatal case of laburnum seed poisoning. *Med Sci Law* 10, 260-266.
- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Aroldi, C., Vazzana, C., Heimler, D., 2003. Polyphenolic Content in Different Plant Parts of Soy Cultivars Grown under Natural Conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 5301-5306.
- Ruckebusch, Y., 1981. *Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animale*, Ed. Maloine, Paris, p. 611.
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, S., 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 3, 433–439.
- Sacher, R.A., McPherson, R.A., 1991. *Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test*. Pennsylvania, USA, pp. 416–443.
- Saito, R., 1977. Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. *Xenobiotica* 7, 25.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 215-217.
- Schmeller, T., Sauerwein, M., Sporer, F., Wink, M., 1994. Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Nat. Prod* 57, 1316-1319.

- Schuppan, D., Jia, J.D., Brinkhaus, B., Hahn, E.G., 1999. Herbal products for liver diseases: A therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology* 30, 1099-1104.
- Singh, A.N., Raghubanshi, A.S., Singh, J.S., 2002. Plantations as a tool for mine spoil restoration. *Curr. Sci* 82, 1436-1441.
- Slichter, S.J., 2004. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfusion Medicine Reviews* 18, 153–167.
- Soro, T.Y., Traore, F., Sakande, J., 2009a. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *C. R. Biologie* 332, 371-377.
- Spichiger, R-E., Savolainen, V-V., Figeat, M., Jeanmonod, D., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 202-203.
- Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of cox-2 and inos through suppression of nf-Kappa b activation. *Mutation Research* 480, 243-268.
- Szentesi, Á., Wink, M., 1991. Fate of quinolizidine alkaloids through three trophic levels: *Laburnum anagyroides* (Leguminosea) and associated organisms. *Journal of Chemical Ecology* 17(8), 1557-1572.
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 179, 183–196.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydin, E., 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry* 100, 985–989.
- Tilkian, S.M., 1979. Clinical Implications of Laboratory Tests. The C.V. Mosby Company, Missouri, pp. 11–17.
- Triantaphyllou, K., Blekas, G., Boskou, D., 2001. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int. J. Food Sci. Nutr* 52, 313-317.
- Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V., 2004. Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 523-528.
- Tulsawani, R., 2010. Ninety day repeated gavage administration of Hippophae rhamnoides extract in rats. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2483–2489.
- Udut, E.V., Zhdanov, V.V., Gur'iantseva, L.A., Minakova, M.I., Dygai, A.M., 2005. Mechanisms of the erythropoiesis-stimulating effect of skullcap (*Scutellaria baicalensis*) extract. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia* 68, 43–45.

- Varley, H., Gowen Lock, A.H., Bell, M., 1980. Practical Clinical Biochemistry. Heinmann, New York, USA. p. 741.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4113-4117.
- Vetaas, O.R., 1992. Mico-site effects of trees and shrubs in dry savannas. *J. Veg. Sci* 3, 337-344.
- Villar-Salvador, P., Valladares, F., Dominguez-Lerena S., Ruiz-Diez, B., Fernández-Pascual, M., Delgado, A.C., Peñuelas, J., 2008. Functional traits related to seedling performance in a Mediterranean leguminous shrub: insights from a provenance, fertilization, and rhizobial inoculation study. *Environ Exp Bot* 64, 145-154.
- Wallace Hayes, A., 2008. Principle and methods of toxicology. Ed Tayler & Francis, New York, p. 1134.
- Wang, J., Mazza, G., 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem* 50, 4183-4189.
- Wepierre, J., 1981. Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire. Ed Masson, Paris, p. 203.
- Wink, M., 1993. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. Academic Press, San Diago, pp. 118-119.
- Wink, M., Hartmann, T., 1982. Localisation of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physio* 70, 74-77.
- Wink, M., Witte, L., 1984. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta* 161, 519-524.
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biologie* 5(3), 218-223.
- Witthawaskul, P., Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesothikul, T., Lertprasertsuke, N., 2003. Acute and subacute toxicities of the saponin mixture isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 115-121.
- Wolf, P.L., Williams, D., Tsudaka, T., Acosta, L., 1972. Methods and Techniques in Clinical Chemistry. John Wiley & Sons, USA, pp. 132-196, 375-383.
- Wu, Q., Wang, M., Sciarappa, W.J., Simon, J.E., 2004. LC/UV/ESI/MS Analysis of Isoflavones in Edamame and Tofu Soybeans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 2763-2769.



## RESUME

*Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse est une plante médicinale appartenant au genre *Retama* largement utilisée dans les pays méditerranéens et en particulier en Algérie. Dans la présente étude le rendement de l'extraction de cette plante par le méthanol et l'eau distillée en matière sèche est respectivement de 15.86% et 18.68%. Les résultats du dosage des flavonoïdes étaient plus élevés dans l'extrait méthanolique ce dernier a révélé une prépondérance de la présence des isoflavones par la technique HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS, alors que la technique GC/MS a démontrée la présence des alcaloïdes quinolizidiniques dans l'extrait aqueux. La méthode au DPPH indique une IC<sub>50</sub> égale à 0.14±0.0014mg/ml et 0.46±0.010 mg/ml pour l'extrait aqueux et méthanolique respectivement. Le premier a démontré une plus grande activité antioxydante que le second. Dans le test du β-carotène/acide linoléique les résultats du pourcentage d'inhibition été acceptable étant de 79.075±3.916% pour l'extrait aqueux et 71.694±1.203% pour l'extrait méthanolique. D'autre part l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux par voie orale sur des rats mâles et femelle *Albino wistar* a démontré des symptômes graves de toxicité présentée par des problèmes respiratoires, des tremblements, comas, et des paralysies entraînant la mort. La DL<sub>50</sub> était de: 2488.86±870.23 mg/kg par la méthode graphique et de: 3333.33mg/kg par calcul. Selon nos résultats, *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse pourrait être classée dans la catégorie des plantes faiblement toxiques, toutefois l'étude de la toxicité subaiguë a révélée des perturbations dans la croissance normale des animaux et dans quelques paramètres hématologiques (GB, GR, HGB, CCMH, PLT, VGM) et biochimiques (PAL, AST, CPK, LDH, GLUC), ainsi que des altérations hépatiques et rénales.

**Mots clés:** *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse, alcaloïdes, antioxydant, DPPH, β-carotène, DL<sub>50</sub>, paramètres hématologiques, biochimiques, altérations histopathologiques.

## ABSTRACT

*Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse is a medicinal plant belonging to the genus *Retama* widely used in Mediterranean countries and especially in Algeria. In this study the extraction efficiency of this plant by methanol and distilled water is respectively: 15.86% and 18.68%. The results of the determination of flavonoïds was higher in the methanolic extract, this one revealed a preponderance of the presence of isoflavones by HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS method, while the GC/MS test demonstrates the presence of quinolizidines alkaloids in the aqueous extract. DPPH method specifies an IC<sub>50</sub> equal to: 0.14±0.0014mg/ml and 0.46±0.010mg/ml for aqueous and methanolic extract respectively, the first showed greater antioxidant activity than the second one, whereas In the test of β-carotène/acid linoleic, the percentage of inhibition was acceptable for the two extract being of: 79.075±3.916% for the aqueous extract and 71.694±1.203% for the methanolic one. On the other hand, the study of acute toxicity of aqueous extract orally to *Wistar albino* males and females rats showed serious symptoms of toxicity such as the respiratory disfunction, tremor, coma, paralysis leading to the death, the LD<sub>50</sub> was: 2488.86±870.23mg/kg by the Graphic method and: 3333.33 mg/kg by the calculated one, these data allow to classify *Retama sphaerocarpa* in low toxicity plants category, however the sub acute toxicity studies revealed disruption in the normal animal growth and in some hematological (WBC, RBC, HGB, MCHC, PLT, MCV), biochemical (ALP, AST, CPK, LDH, GLUC) parameters, as well as hepatic and kidney alterations.

**Keywords:** *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse, alkaloids, antioxidant, DPPH, β-carotene, LD<sub>50</sub>, hematologicals, biochemicals, histopathologicals alterations.

## الملخص

ينتمي نبات *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse إلى النوع *Retama* وهو من النباتات الطبية المنتشرة في بلدان البحر الأبيض المتوسط لا سيما في الجزائر. قدرت المردودية في هذه الدراسة و الناتجة من عملية الاستخلاص بالميثانول و الماء على التوالي بـ: 15.86% و 18.68%، كما أظهرت الدراسات أن كمية الفلافونويدات أعلى في المستخلص الميثانولي. وقد تميز هذا الأخير بوجود إيزوفلافونويدات عديدة وذلك باستعمال طريقة HPLC/Uv-vis-DAD/ESI-MS، في حين أن استعمال GC/MS بين احتواء المستخلص المائي على القلويدات الكينوليزيدينية. أعطت طريقة DPPH قيم IC<sub>50</sub> التالية: 0.14±0.0014 مغ/مل و 0.46±0.010 مغ/مل لكل من المستخلص المائي و الميثانولي على التوالي حيث أبدى المستخلص الأول نشاطية مضادة للأكسدة أعلى من الثاني، أما اختبار بيتا-كاروتين/حمض اللينولييك، فقد كانت النتائج معتبرة لكلا المستخلصين حيث قدرت بـ: 79.075±3.916% للمستخلص المائي و بـ: 71.694±1.203% للمستخلص الميثانولي. من جهة أخرى تمت دراسة السمية الحادة للمستخلص المائي عن طريق الفم على جردان إناث و ذكور من نوع *Albino wistar* فأظهرت أعراض تسمم خطيرة من أهمها: صعوبات في التنفس، ارتجاف، حالات لاوعي و شلل ينتهي بالموت، قدرت الجرعة القاتلة لـ: 50% من الجرذان بـ: 2488.86±870.23 مغ/كغ بطريقة الرسم البياني و بـ: 3333.33 مغ/كغ بالطريقة الحسابية، تسمح هذه النتائج بتصنيف *Retama sphaerocarpa* ضمن قائمة النباتات ذات السمية المنخفضة، وفيما يخص السمية شبه الحادة فقد أظهرت التحاليل حدوث خلل في بعض المؤشرات الدموية (WBC, RBC, HGB, MCHC, PLT, MCV) و البيوكيميائية (ALP, AST, CPK, LDH, GLUC) وكذا بعض التغيرات النسيجية المرضية في كل من الكبد و الكلى.

**الكلمات المفتاحية:** *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse، القلويدات، النشاطية المضادة للأكسدة، DPPH، بيتا-كاروتين، LD<sub>50</sub>، المؤشرات الدموية، البيوكيميائية، التغيرات النسيجية المرضية.