



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie



Antibiotiques Antifongiques:
physico-chimie,
synthèse et activité biologique

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention

Diplôme de Master

En Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité cytotoxique des extraits de plantes :
Fredolia aretioides et d'*Echium vulgare* vis-à-vis des globules
rouges humain**

Présentée par

Melle **KHERBOUCHE Hanane**

Soutenue le 02/07/2014

Les membres du jury

Présidente : Mme BOUCHERIT-OTMANI Zahia **Professeur** **Université de Tlemcen**

Promoteur : Mr BOUCHERIT Kebir **Professeur** **Université de Naâma**

Examineur : Mr RAHMOUN Mouhammed Nadjib **Maitre de conférences classe B**

Université de Tlemcen

Année universitaire : 2013-2014.

« Rien n'est près, rien n'est loin, tout est une question de volonté » Jérôme Treffel

Dédicace

*Je Remercie Dieu
Le Tout Puissant Pour
Tout.....*

Merci à ma famille pour son soutien et en particulier mes très chers parents pour leurs sacrifices et leurs encouragements durant toutes mes études. Ce travail est le fruit de tous vos sacrifices, que Dieu vous garde longtemps près de nous.

*A mon frère Badr eddine.
A mes sœurs Souaâd, Ilhem, Hadjer.
A toute la famille KHERBOUCHE et BELAID.*

A mes amis.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leur soutien moral.

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à Monsieur le promoteur **BOUCHERIT Kebir** professeur au centre universitaire de Naâma pour avoir accepté de m'encadrer et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique et pour la confiance qu'il m'a accordé. Je le remercie pour tout le savoir qu'il m'a transmis, pour ses commentaires qui ont enrichis mon travail expérimental et ma rédaction.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **BOUCHERIT-Otmani Zahia**, professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de Vie, des Science de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour son soutien pendant tous ce travail, sa patience ainsi que ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail je vous remercie profondément madame pour été non seulement une enseignante admirable mais aussi pour la qualité de vos conseils. Je tiens à présenter toute ma gratitude, mes respects et ma grande estime à vous madame. Je vous remercie pour votre grande disponibilité, votre écoute et votre implication.

Je ne saurais assez exprimer mes remerciements à Monsieur **RAHMOUN Mohammed Nadjib** maître de conférences classe B à la faculté des Sciences de la Nature et de Vie, des Science de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

Un remerciement particulier va à mademoiselle **BENTABET Nesrine** doctorante en biochimie à l'Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour son aide précieuse au quotidien, pour le partage de ses expériences et son suivi, pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je la remercie pour sa bienveillance et ses conseils.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous les étudiants en poste graduation pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble et spécialement à **IMANE .L** et **KAMILA .G.**

Je remercie également tous les étudiants de la promotion de master **biochimie appliquée** pour leur générosité et leurs encouragements.

Enfin je ne remercie énormément toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Hanane

Table des matières

Liste des abréviations.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Introduction générale.....	01
La synthèse bibliographique.....	04
Matériels et méthodes.....	12
1. Matériel biologique.....	12
1.1 Matériel végétal	12
1.2 Globules rouge.....	12
2. Méthodes.....	11
2.1 Préparation des extraits de plantes.....	13
2.2 Tests phytochimiques.....	15
2.3 Extraction des flavonoïdes	13
2.4 L'extrait des tanins.....	14
3. Etude cytotoxique.....	17
3.1 Préparation de la suspension érythrocytaire.....	15
3.2 Mesure de la fuite de l'hémoglobine.....	15
Résultats et discussion.....	19
1. Etude phytochimiques	19
1.1 Les tests phytochimiques des extraits de <i>Fredolia aretioides</i>	20
1.2 Les tests phytochimiques des extraits d' <i>Echium vulgare</i>	21
2. L'activité hémolytique des extraits des plantes.....	23
1.1 L'activité hémolytique des extraits bruts des deux parties aérienne et racines de <i>Fredolia aretioides</i>	23
1.2 L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie aérienne de <i>Fredolia aretioides</i>	23
1.3 L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie racine de <i>Fredolia aretioides</i>	25

1.4 L'activite hémolytique des extraits bruts des deux parties aérienne et racines d' <i>Echium vulgare</i>	26
1.5 L'activite hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie aérienne d' <i>Echium vulgare</i>	26
1.6 L'activite hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie racine d' <i>Echium vulgare</i>	27
Conclusion et perspectives.....	30
Références bibliographiques.....	33

Résumé

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et à évaluer l'activité cytotoxique des extraits des différentes parties tiges, feuilles et racines de deux plantes *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouge humain.

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante *Fredolia aretioides* ont permis de mettre en évidence tanins, composés réducteurs, terpènes, coumarines, quinones libres et en saponosides dans les deux parties de la plante, avec une faible présence des stéroïdes et une absence total des alcaloïdes et des flavonoïdes. Concernant la plante *Echium vulgare*, les tests phytochimiques montrent la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins, composés réducteurs, terpènes et en quinones libres. Par contre, nous constatons une faible présence des stéroïdes avec une absence totale des alcaloïdes.

Les tests d'hémolyse réalisée par la méthode spectrophotométrique on montré que les extraits acétate d'éthyle et n-butanol des racines d'*Echium vulgare* ainsi que l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* ne présentent aucun effet toxique à 1mg/mL.

Mots clés : *Fredolia aretioides*, *Echium vulgare*, étude phytochimique, tanins, flavonoïdes, activité hémolytique.

Introduction générale

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est en croissance partout dans le monde, mais une majorité des personnes ne connaît certainement pas les effets secondaires éventuels des plantes, ni comment et quand elles peuvent être utilisées en toute sécurité (**Zakariya et coll., 2012**).

La notion de dose est déterminante. Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'Homme (**Fourasté, 2000**). Il est donc nécessaire d'identifier la partie de la plante utilisable.

En effet, le principe actif d'une plante toxique peut être réparti sur toute la plante ou dans une ou plusieurs de ses parties : la racine, les baies ou les feuilles (**Soulaymani, 2010**).

Dans le cadre de la recherche de molécules à activités biologique nouvelles d'origine végétale, il est préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales (**Ghourri et coll., 2013**).

L'Algérie, de part sa situation géographique, bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes [(**Mahmoudi, 1987**) ; (**Belouad, 1998**)].

L'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité puisse être entreprise en vue de son adaptation en tradithérapie (**Ouedraogo et coll., 2001**).

Des travaux réalisés au sein du laboratoire antibiotiques, antifongiques : Physico-chimique, synthèse et activité biologique sur *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* L ont montré que ces deux plantes présentent des activités antioxydantes et antimicrobiennes très intéressantes (**Bentabet et coll., 2014**).

Pour notre part, nous souhaitons apporter notre contribution à ces travaux. Pour cela, nous avons entrepris un travail qui consiste à évaluer la cytotoxicité de ces deux plantes médicinales algériennes vis-à-vis des globules rouges humains.

Synthèse bibliographique

À côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Herbert, 1989**).

Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes, et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (**Li et coll., 2007**).

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales et antioxydantes [(**Harborne, 1998**) ; (**Bruneton, 2009**)].

Quelques exemples d'activités biologiques des composés polyphénoliques sont montrés dans le tableau N°01.

Tableau N° 01 : Quelques exemples d'activités biologiques des composés polyphénoliques (**Bahorun, 1997**).

Polyphénols	Activités	Exemple de plantes
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes	<i>Paronychia argentea</i> (Bouanani et coll., 2010).
	Antifongiques	<i>Daphne gnidium</i> (Cottiglia et coll., 2008).
	Antioxydantes	<i>Tamarix pauciovulata</i> J (Younos et coll., 2005).
Coumarines	Protectrices vasculaires et anti-oedémateuses	<i>Calendula officinalis</i> L (Kabera et coll., 2000).
Flavonoïdes	Antitumorales Anti-inflammatoires	<i>Haloxylon scoparium</i> (El-Shazli et coll., 2005).
	Hypotenseurs et diurétiques	<i>Malva parviflora</i> (Boual et coll., 2013).
	Antioxydantes	<i>Thymelaea hirsute</i> (Dohou et coll., 2003).
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	<i>Inula crithmoides</i> L (Belloum et coll., 2013).
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène	<i>Artemisia campestris</i> (Akrouit et coll., 2011).
	Antioxydantes	<i>Calotropis procera</i> (Jain et coll., 1996).
	Antitumorales Antifongiques	<i>Arthrophytum schmittianum</i> (Mohammedi, 2013).
	Anti-inflammatoires	<i>Pistacia lentiscus</i> (Baratto et coll., 2003).
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes	<i>Paronychia chlorothyrsa</i> (Chaudhri et coll., 1988) <i>Capparis Spinosa</i> (Meddour et coll., 2013)

La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, la phytothérapie n'a pas que des effets bénéfiques. Comme tout produit actif, elle peut avoir des effets indésirables, toxiques et allergiques.

Des molécules très connues (l'atropine, la colchicine, l'opium, la digitaline) sont extraites de plantes et ne sont pas dénuées de toxicité (**Anonyme, 2007**). Des études sur les propriétés phytochimiques ou biologiques de plusieurs produits végétaux ont démontré l'action et le potentiel toxique de ces produits sur les systèmes cellulaires des mammifères (**Aline, 2010**).

Les remèdes traditionnels utilisés sont, souvent, un mélange de plantes dont la connaissance et les impératifs de préparation, de dosage et de consommation ne sont pas bien maîtrisés.

Ainsi les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité (**Khattabi et coll., 2010**).

La part des intoxications liées à l'usage des plantes est non négligeable (**Benkhniqie et coll., 2011**). Très souvent, les plantes sont consommées sans prendre en considération leur toxicité (**Veiga Junior et pinto, 2005**).

En effet, une toxine est une substance capable de perturber, immédiatement ou à long terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort (**Viala et Botta, 2007**). Cette toxicité dépend de la nature de la substance, de la dose, de la durée d'exposition et des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal) (**Tron et coll., 2002**).

Plusieurs espèces de plantes contiennent des familles de métabolites secondaires qui peuvent être toxiques (**Nafisi et coll., 2010**). Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. A forte dose, ils sont très toxiques (**Bruneton, 1999**).

Des travaux antérieurs ont montré que *Chenopodium ambrosioides*, appartenant à la famille des *chenopodiacees*, utilisée comme vermifuge, antispasmodique, carminative peut présenter une toxicité rénale. Cela constitue une limite à son utilisation malgré ses propriétés thérapeutiques (**Kaoubaia et coll., 2011**).

L'utilisation de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) entraîne une hypokaliémie, oligurie et les œdèmes, semblables à une néphrite aiguë (**Hammouda et coll., 2005**).

Nigella sativa L. est une plante indiquée contre les problèmes d'estomac. Elle est utilisée également comme un préventif contre l'asthme, le diabète et la diarrhée. Parmi les intoxications dues à l'utilisation de cette plante, une sécheresse de la bouche, une irritation bucco pharyngée, des inflammations de la langue, des amygdales et du rhinopharynx (**Anyinam, 1995**).

Partant de ces données et compte tenu des travaux réalisés au sein de notre laboratoire « Antibiotiques ,Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » sur *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare* ont montré que ces deux plantes médicinales de la région ouest d'Algérie présentent des activités antimicrobiennes et antioxydantes très appréciables (**Bentabet et coll., 2014**), c'est pourquoi, nous avons jugé nécessaire d'évaluer la cytotoxicité de ces deux plantes vis-à-vis d'un modèle de cellules animales à savoir les globules rouges humains.

Nous allons, tout d'abord, présenter un aperçu sur l'aspect botanique de ces deux plantes

Fredolia aretioides

C'est une plante endémique d'Algérie et du Maroc commune dans le Sahara au nord-ouest du Tafilalet, Tinghir au Maroc, à travers Beni-Ounif, Aïn Safra et Béchar dans le sud d'Algérie.

Elle appartient à la famille des Chenopodiacées, largement répandue dans les habitats salins tempérés, en particulier dans les régions littorales de la mer méditerranée, les steppes arides et les déserts. *Fredolia aretioides* se trouve sur les rochers et plateaux caillouteux (reg et hamada). Elle pousse rarement dans les oueds et dans les dépressions argileuses (**Quezel et Santa, 1963**).

Cette plante adaptée à la sécheresse due au climat ou à la salinité du sol ce qui explique sa richesse en ions alcalins (Na^+ , K^+) (**Mulas, 2004**).

La classification botanique selon **Cosson et Durieu (1885)** est comme suit :

Règne :	Végétal
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Caryophyllale</i>
Famille :	<i>Chenopodiaceae</i>
Genre :	<i>Fredolia</i>
Espèce :	<i>aretioides</i>
Nomenclature botanique :	<i>Fredolia aretioides</i>

D'un point de vue botanique, *Fredolia aretioides* a la forme d'un arbuste vigoureux cylindrique, de 1 m de hauteur. Les branches sont très compactes avec le sable, les petites feuilles nombreuses, très serrées et coriaces, sont de couleur bleu-vert et de formes charnues, ne dépassant pas 5 mm. Le fruit est un akène entouré par de petites ailes transparentes du périanthe persistant. Il est comprimé dorsalement (**Khedache, 1999**) (**Figure 01 et 02**)

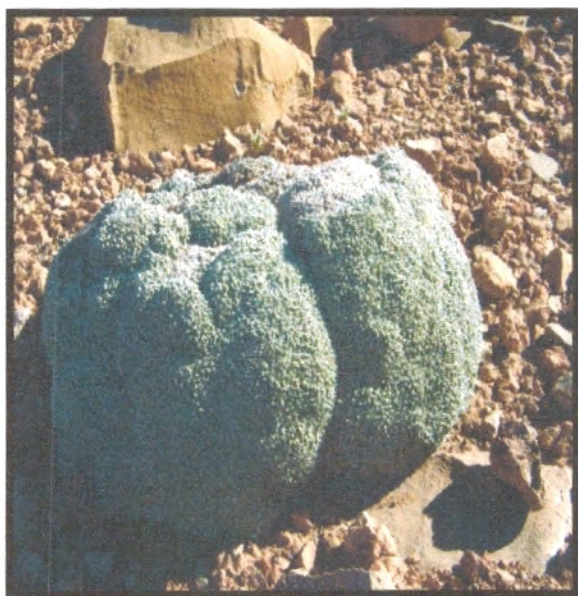


Figure N°01 : Représentation photographique de *Fredolia aretioides* (partie aérienne)

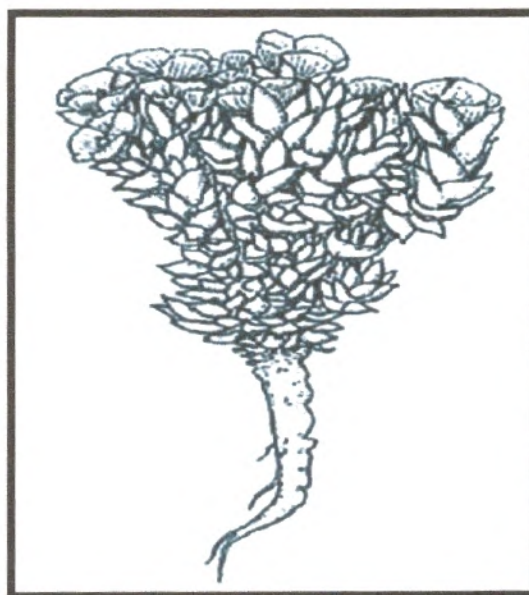


Figure N°02 : Représentation photographique de *Fredolia aretioides* (Partie aérienne et racine)

Fredolia aretioides est très utilisée en médecine traditionnelle comme diurétique, hypoglycémiant et antidote au poison (**El mansouri, 2011**).

La partie aérienne est préconisée pour les douleurs rhumatismales, les intoxications alimentaires (**Merzouki et coll., 2000**), alors que l'écorce de la racine est utilisée comme bois de chauffage [(**Khedache, 1999**) ; (**El mansouri, 2011**)]. *Fredolia aretioides*, contient de nombreux métabolites secondaires importants (flavonoïdes, tanins...) avec des effets antimicrobiens (**Belboukhari et Cheriti, 2009**).

Echium vulgare

C'est une plante intéressante en raison de son abondance dans les terres non cultivées de la région de Tlemcen et son usage en médecine traditionnelle.

La classification botanique est comme suit (**Gibbs, 1971**) :

Règne :	Végétal
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	<i>Lamiale</i>
Famille :	<i>Borraginaceae</i>
Genre :	<i>Echium</i>
Espèce :	<i>vulgare</i>
Nomenclature botanique :	<i>Echium vulgare</i>

Echium vulgare ou vipérine est une plante appartenant à la famille des Borraginacées. Elle est vivace ou bisannuelle de 30 à 80 cm de longueur, peuple les terres non cultivées, les terres caillouteuses et les zones côtières. Elle possède un système racinaire pivotant (**Graves et coll., 2010**). Les tiges et les feuilles sont couvertes de poils robustes. Les fleurs sont de couleurs bleues ou violacées (**Bock, 2012**) (**Figure 03**).



Figure 03: Représentation photographique d'*Echium vulgare*.

Les racines d'*Echium vulgare* sont utilisées pour la cicatrisation des plaies (**Sezik et coll., 1997**). Les effets thérapeutiques des extraits d'*Echium vulgare* peuvent être liés en partie à la présence des alkannines et des shikonines, qui sont des pigments rouges localisés dans la racine. Ces pigments ont également une activité anti-tumorale (**Wang et coll., 1988**).

Le genre *Echium* est particulièrement riche en flavonoïdes (**Toma's-Barbera'n et coll., 1986**), en acides phénolcarboxyliques (**Mitkov et coll., 2002**), en stéroles (**Pardo et coll., 2000**), en naphthoquinones et en alcaloïdes de pyrrolizidine (**Papageorgiou et coll., 1999**). Cette classe d'alcaloïdes est connue par sa toxicité [(**El-Shazly et coll., 1996 a**) ; (**El-Shazly et coll., 1999**)]. Les poils présents sur la vipérine produisent une démangeaison intense ainsi qu'une irritation de la peau (**Muenschler, 1975**).

Problématique

Fredolia aretioides et *Echium vulgare* sont deux plantes utilisées à des fins thérapeutiques dans les régions de Bechar et Tlemcen respectivement. Elles ont fait l'objet de plusieurs études. Des travaux réalisés au laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimique, synthèse et activité biologique (LapSab) ont montré que des extraits de ces plantes possèdent des activités antibactériennes, antifongiques et antioxydantes ainsi que des capacités à conserver des produits cosmétiques.

Ces activités biologiques s'expliquent par la présence de groupes chimiques (tanins, flavonoides...) dans les feuilles, les tiges et les racines de ces plantes.

Cependant plusieurs espèces végétales contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être toxiques, ce qui limite leur utilisation.

Notre travail s'inscrit dans ce cadre et consiste à évaluer la toxicité des extraits des feuilles, des tiges et des racines des plantes *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare*.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés *in vitro* sur un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humain.

Il faut souligner que ce travail fait suite aux travaux déjà réalisés par Mademoiselle Bentabet Nesrine sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique des extraits de deux plantes de l'ouest Algérien : *Fredolia aretioides* et *Echium vulgare*.

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé dans le laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (Lapsab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

1. Matériel végétal :

Notre travail a porté sur les feuilles et les tiges d'une part et les racines d'autre part de deux plantes qui sont : *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides*

- ***Echium vulgare***

La plante "*Echium vulgare*" est récoltée durant le mois de Février 2014 de la région de Remchi situé au nord-ouest de la ville de Tlemcen.

- ***Fredolia aretioides***

La plante *Fredolia aretioides*, est récoltée en Janvier 2014 de la Wilaya de Béchar, située dans le sud-ouest d'Algérie.

Les deux plantes sont séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité dans une étuve à 25 °C pendant une semaine. Une fois séchées, elles ont été broyées puis soumises à l'extraction.

2. Matériel biologique:

2.1 Globules rouges :

Pour les tests de cytotoxicité, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

2. Méthodes :

2.1. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait hydro-méthanolique d'*Echium vulgare* et l'extrait hydro-acétonique de *Fredolia aretioides* des tiges plus feuilles et des racines.

- **Les tanins (Karumi et coll., 2004) :**

On ajoute 3 gouttes de FeCl_3 1% à 1 mL de chaque extrait. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

- **Les flavonoïdes (Karumi et coll., 2004) :**

2 mL de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d' HCL 37%, et avec 0.5 g de tournure de magnésium Mg^{++} . Le test positif est marqué par une l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes.

- **Les terpénoïdes :**

On ajoute 1 mL de chloroforme et 1.5 mL de H_2SO_4 concentrée à 2.5 mL de notre extrait. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

- **Les stérols : réaction de Libermann-Burchard**

On traite 1mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d' H_2SO_4 concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

- **Les coumarines :**

A 1 mL de chaque extrait, on ajoute 1 mL d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5 mL de NH_4OH à 10 %.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines. (Bruneton, 1999).

- **Les alcaloïdes :**

2.5 mL d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 0.1 mL d'extrait, et incubés au bain- marie pendant 10 min. La solution obtenue est divisée en deux parties. On ajoute à l'une le réactif de Mayer et à l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Réactif de Mayer : Dissoudre 1.358g d'HgCl₂ dans 60 mL d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100mL.

Réactif de Wagner : Dans 75mL d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec l'eau distillée.

- **Les quinones libres :**

A un volume de 1 mL de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyede, 2005).

- **Les saponosides :**

On ajoute 1 mL d'eau distillée à 2 mL de chaque extrait, puis la solution est agitée pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes. Le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1 cm.

- **Les composés réducteurs :**

On ajoute à 1 mL de nos extraits 0.5 mL de Liqueur de Fehling A et B puis on chauffe les tubes au bain marie à 100°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (Trease et Evans, 1987)

2.2. Préparation des extraits de plantes :

2.2.1 Extraction des flavonoïdes (UPSON et coll., 2000) :

10g de poudre végétale des tiges plus feuilles et des racines d'*Echium vulgare*, est placée dans des Erlenmeyers et recouverte avec du méthanol 70%. Les échantillons sont laissés macérer pendant 72 heures en renouvelant le solvant toutes les 24 heures. Après filtration sur papier filtre, le méthanol est évaporé en utilisant un rotavapeur de type bouché R-200 à la température de 50°C, puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse est traitée trois fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-butanol.

Les phases n-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait des flavonoïdes sous forme de poudre (Figure N°04).

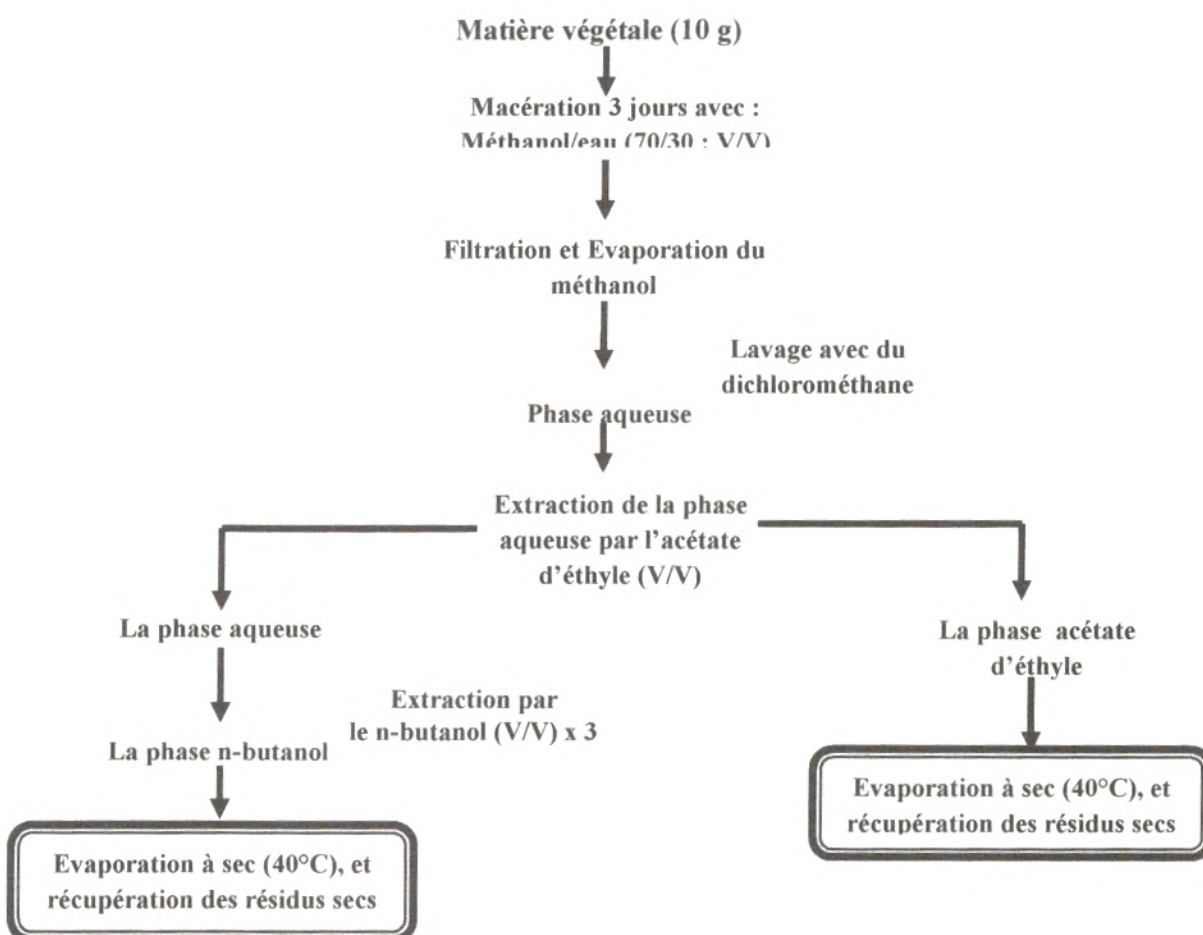


Figure N°04 : Schéma d'extraction des flavonoïdes des feuilles plus tiges et des racines d'*Echium vulgare*

2.2.2 Extraction des tannins :

L'extraction des tannins des feuilles plus tiges et racines de la plante *Fredolia aretioides*, est réalisée selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. 10g de poudre végétale est extraite par le mélange acétone/ eau (70/30 : V/V) durant trois jours à une température ambiante La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C dans un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone, puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse est traitée trois fois avec l'acétate d'éthyle. Les 3 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-butanol. Les phases n-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre (**Figure N°05**).

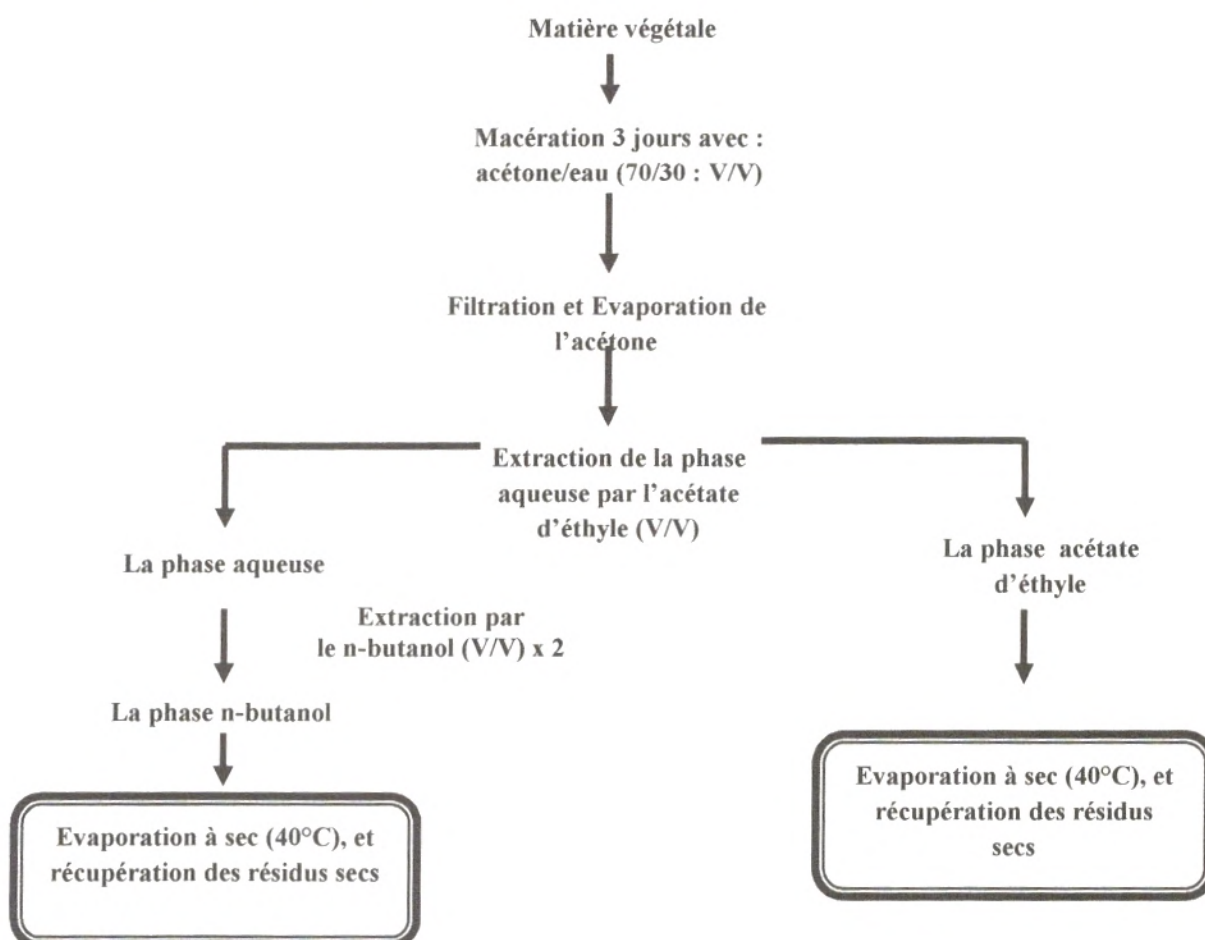


Figure N°05 : Schéma d'extraction des tanins des feuilles plus tiges et des racines de *Fredolia aretioides*

3. Etude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges :

3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur un tube sec est centrifugé à 4000 tours/ minutes pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse type JOUAN. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec le tampon phosphate de sodium salé (PBS) 10 mM, pH 7,4.

3.2. Mesure de la fuite de l'hémoglobine

Les globules rouges sont suspendus dans le tampon phosphate salé (PBS) 10 mM, pH 7,4 à raison de 4000 cellules/ mL (0,25 mL sont mis en contact avec 4,75 mL de tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10 mM, pH 7,4).

La suspension érythrocytaire à 5% est incubée (dans un incubateur de paillasse type Orbital Shaker, Thermo Forma) à 37 °C pendant 90 min avec différentes concentrations des extraits solubilisés dans du DMSO (1%). Des prélèvements de 0,5 mL sont réalisés toutes les 15 min pour être resuspendus dans 2,5 mL d'une solution de lavage glacée MgCl₂ 2 mM. Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/ minutes pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/ Vis (Type Analytik Jena).

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec le triton-X100 à une concentration de 10% (V/V). Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif.

Pour chaque échantillon le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation (Lee, 2002):

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = 100\% \times \frac{(A_{548 \text{ nm}} \text{ de l'échantillon} - A_{548 \text{ nm}} \text{ de l'hémolyse spontanée test d'échantillon})}{(A_{548 \text{ nm}} \text{ test à triton-X100} - A_{548 \text{ nm}} \text{ de l'hémolyse spontanée test d'échantillon})}$$

Résultats et discussion

1. Etude phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différents composés existant dans les deux parties étudiées de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation.

Les extraits des plantes étudiées *Echium vulgare* et *Fredolia aretioides* sont préparés à partir des feuilles plus tiges et des racines dans différents solvants (eau/méthanol), (eau/acétone) par macération.

1.1. Tests phytochimiques de l'extrait de *Fredolia aretioides*:

Les résultats des tests phytochimiques des extraits de la plante *Fredolia aretioides* sont regroupés dans le **tableau N°02**.

Nous remarquons que l'extrait eau/acétone des deux parties de la plante *Fredolia aretioides* renferme des tannins, des composés réducteurs et des quinones libres en quantité importante. En revanche les flavonoïdes et les alcaloïdes sont absents dans les feuilles, les tiges et les racines de cette plante. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Bentabet et coll. (2014)**.

Tableau N°02 : Résultats des tests phytochimiques de l'extrait eau-acétone de la plante *Fredolia aretioides*

Métabolites secondaires		<i>Fredolia aretioides</i>	
		Tiges + feuilles	Racines
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
Flavonoïdes		-	-
Tanins		+++	+++
Composés réducteurs		+++	+++
Quinones libres		+++	+++
Stéroïdes		+	++
Coumarines		++	++
Terpènes		++	++
Saponosides		++	++

Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : +

Réaction négative :-

1.2. Tests phytochimiques de l'extrait eau/Méthanol de la plante d'*Echium vulgare* :

Les résultats des tests phytochimiques des extraits de la plante *Echium vulgare* sont regroupés dans le **Tableau N°03**.

Nous remarquons que dans l'extrait eau/méthanol des deux parties de la plante *Echium vulgare*, la recherche des tanins et des composés réducteurs s'est montrée positive.

Les flavonoïdes sont fortement présents dans les feuilles et tiges, alors que les racines sont riches en quinones libres, coumarines et en terpènes.

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés Fukui et coll., 1982 et Albreht et coll., 2009 qui ont montré que *Echium lycopsis* et *Echium italicum* renferment plus de flavonoïdes dans les racines que dans les feuilles et tiges. Ceci pourrait être du probablement aux facteurs climatiques et environnementaux qui influencent la teneur en flavonoïdes.

Enfin, il faut noter l'absence totale des alcaloïdes dans l'extrait eau/méthanol dans les deux parties de la plante *Echium vulgare*.

Tableau N°03 : Résultats des tests phytochimiques des l'extraits eau-méthanol de la plante *Echium vulgare*

Métabolites secondaires		<i>Echium vulgare</i>	
		Tige + feuille	Racine
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
Flavonoïdes		+++	+
Tanins		+++	+++
Composés réducteurs		+++	+++
Quinones libres		++	+++
Stéroïdes		+	+
Coumarines		++	+++
Terpènes		++	+++
Saponosides		++	-

Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : +

Réaction négative : -

1. L'activité hémolytique des extraits des plantes:

1.1. L'activité hémolytique des extraits bruts des deux partie aérienne et racine de *Fredolia aretioides* :

Les figures ci-dessous présentent l'évolution des taux d'hémolyse des globules rouges en fonction du temps durant 90 min.

Nous remarquons dans la figure 6 que les extraits bruts hydro-acétonique de la partie aérienne et racine a une concentration de 42 mg/mL et 45 mg/ mL présentent une activité hémolytique presque similaires .L'extrait de la partie aérienne est de 8% à la concentration 42 mg/mL, cette valeur reste stable durant les 90 minutes (Figure 06).

1.2. L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie aérienne de *Fredolia aretioides* :

Les résultats obtenus dans la **figure 7** montrent que l'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle des parties aériennes varient entre 2,53 % à une concentration de 1mg/mL et 26,62% à une concentration 16 mg/mL.

Le taux d'hémolyse le plus élevé est celui de la fraction acétate éthyle à une concentration de 16 mg/ml et à une concentration de 8 mg/mL pour la fraction n butanol. On remarque que les graphes au niveau de ces deux concentrations atteignent un maximum de taux d'hémolyse entre 15 et 60 min, ensuite les taux chutent progressivement à des valeurs inférieures (**figure 07**).

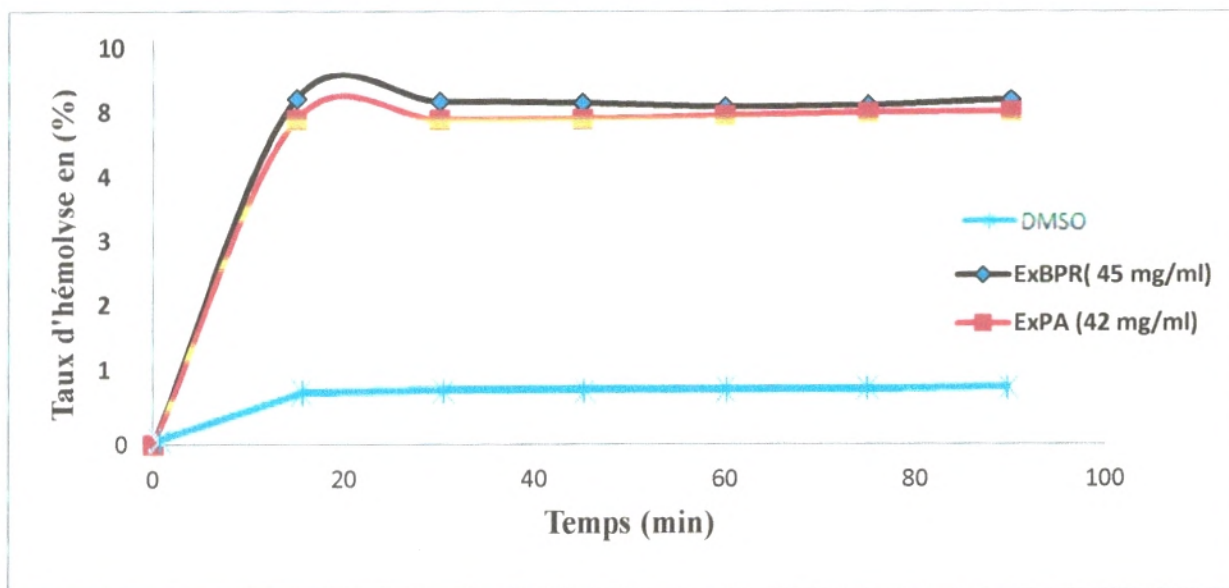


Figure 06: Taux d'hémolyse induit par les extraits bruts (eau/AceOH) des deux parties de la plante *Fredolia aretioides* vis-à-vis des globules rouges

ExBPR :Extrait brut partie racine.

ExBPA :Extrait brut partie aérienne.

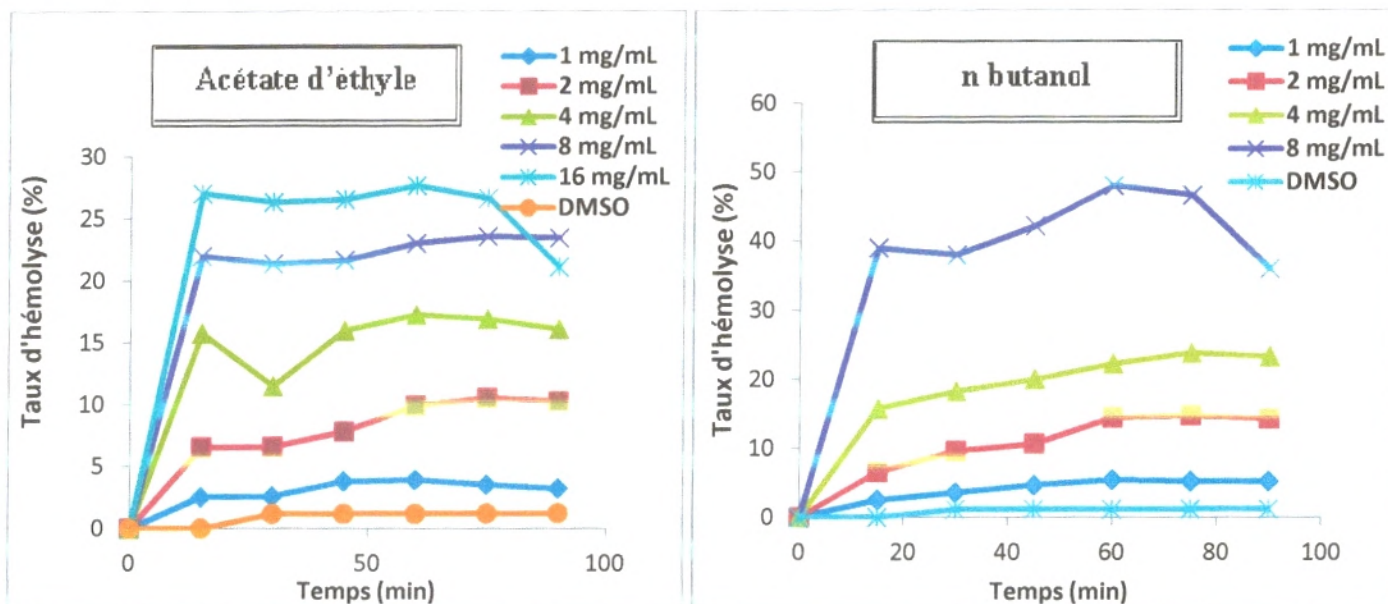


Figure 07: Taux d'hémolyse induit par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des parties aériennes de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des globules rouges

1.3. L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie racines de *Fredolia aretioides* :

Nous remarquons que le pourcentage d'effet hémolytique des extraits de plante augmente au cours du temps en fonction de la concentration.

L'hémolyse maximale (50,6%) est obtenue avec l'extrait acétate d'éthyle à la concentration 19 mg/mL. Cet extrait à 19 mg/mL est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, tous les extraits butanoliques des racines aux concentrations 1 à 17,5 mg/mL ont montré la plus basse activité..

Nous constatons que le DMSO(1%) ne présente aucun effet d'hémolyse significatif vis-à-vis des globules rouges (**Figure 08**).

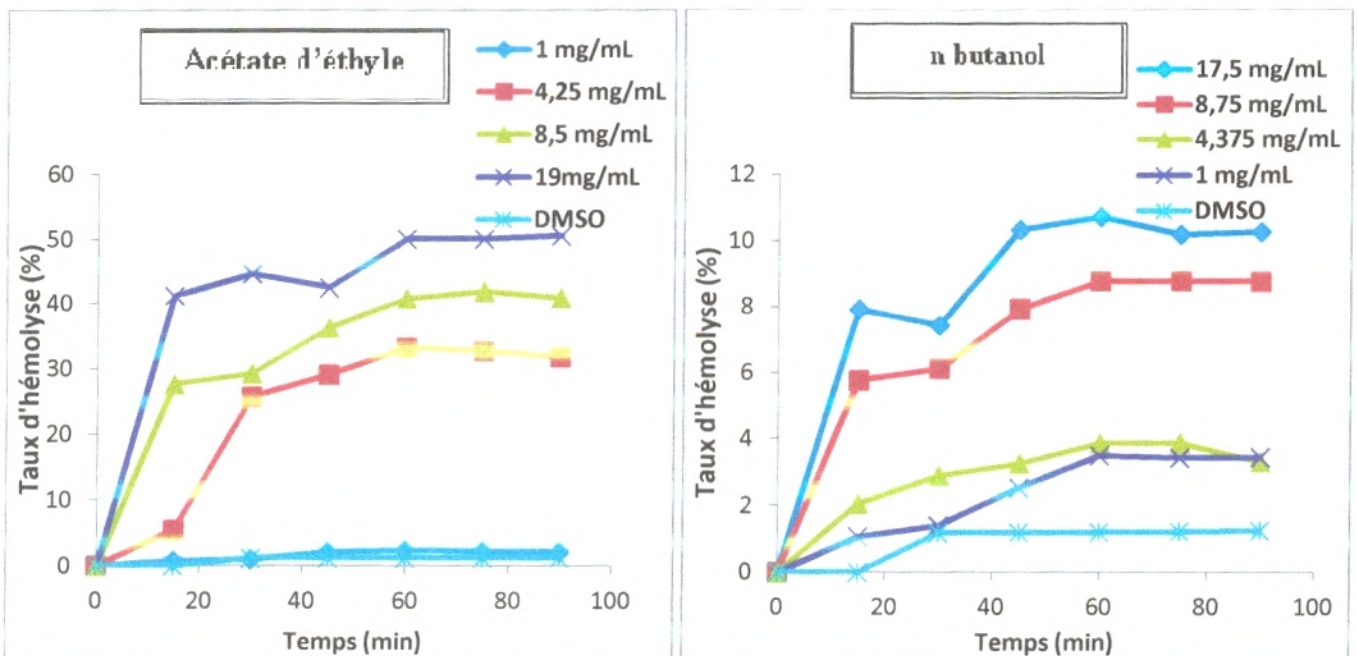


Figure 08: Taux d'hémolyse induit par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des globules rouges

1.4. L'activité hémolytique des extraits bruts des parties aérienne et racines d'*Echium vulgare* :

Nous remarquons dans la **figure 9** que les extraits bruts hydrométhanoliques présentent une activité hémolytiques presque similaires entre les deux parties.

À une concentration de 44 mg/mL l'extrait des racines présente un taux d'hémolyse de 9 % et qui reste stable de 15 à 90 minutes.

1.5. L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie aérienne d'*Echium vulgare* :

Les extraits acétate d'éthyle des parties aériennes ont montré des niveaux d'activité hémolytique variant entre 14 % à la concentration 1mg/mL et 45% à la concentration 13 mg/mL , l'activité hémolytique à cette concentration diminue a 33 % au-delà de 60 min d'incubation (**Figure 10**).

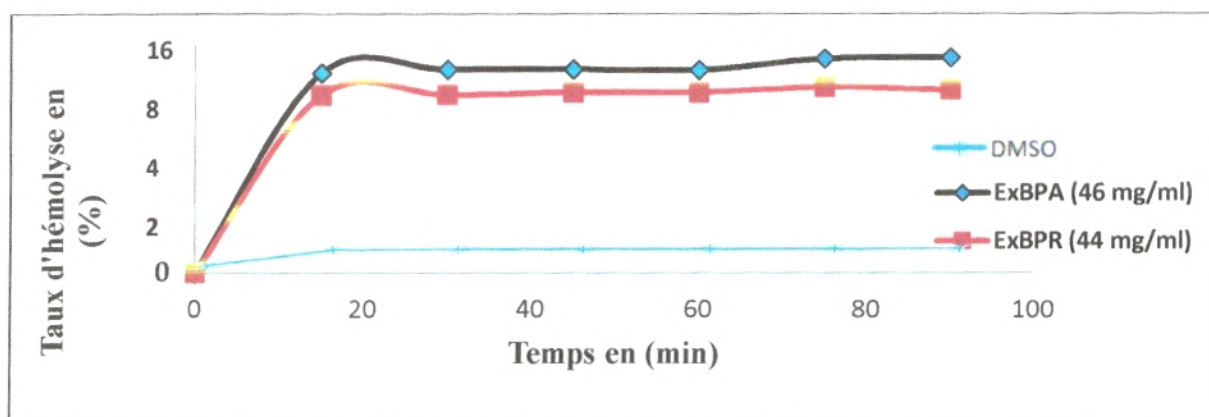


Figure N°09 : Taux d'hémolyse induit par les extraits bruts (eau/MeOH) des deux parties de la plante *Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouges

ExBPR :Extrait brut partie racine.

ExBPA :Extrait brut partie aérienne.

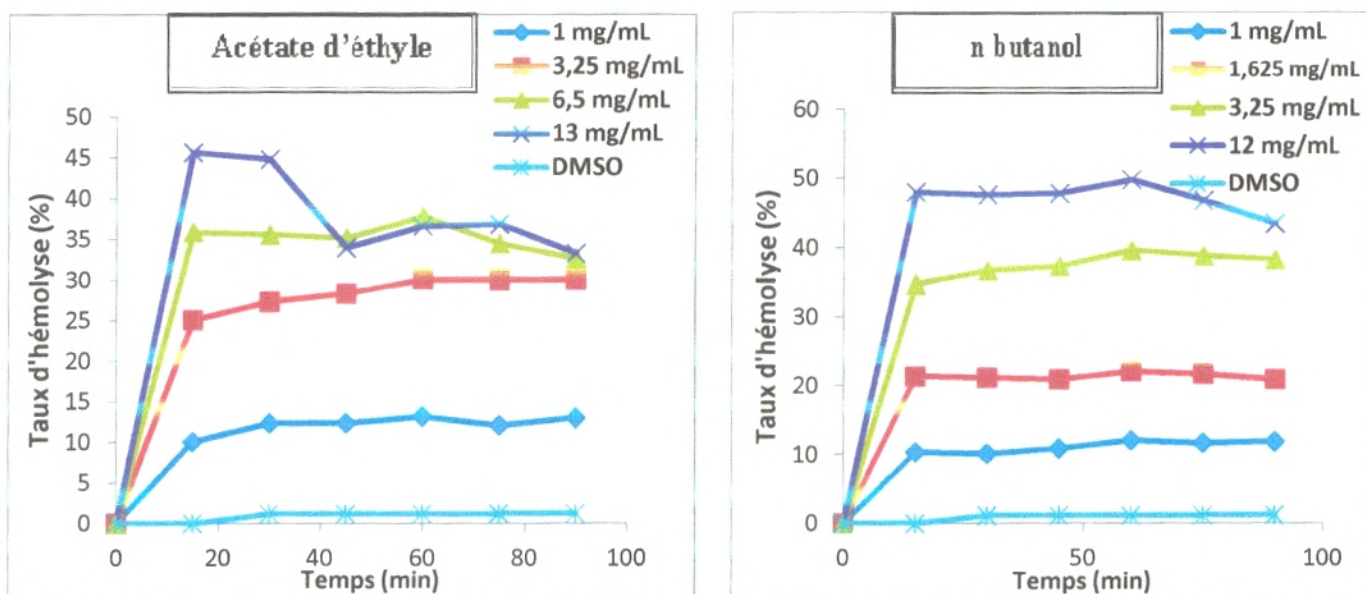


Figure 10: Taux d'hémolyse induit par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des parties aériennes d'*Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouges..

1.6. L'activité hémolytique des extraits acétate d'éthyle et n butanol partie racine d'*Echium vulgare* :

Les résultats, représentés dans la **figure 11**, montrent des niveaux différents d'activité hémolytique. La cytotoxicité des extraits à la concentration 0,625 et à 0.825 mg/mL sont les plus faibles. L'hémolyse maximale (34%) est obtenue avec l'extrait acétate d'éthyle des racines à la concentration 6,6 mg/mL.

En revanche, tous les extraits butanoliques des racines aux concentrations 0,625 à 5 mg/mL ont montré la plus basse activité hémolytique comparativement aux résultats obtenus avec les autres extraits et le triton X-100.

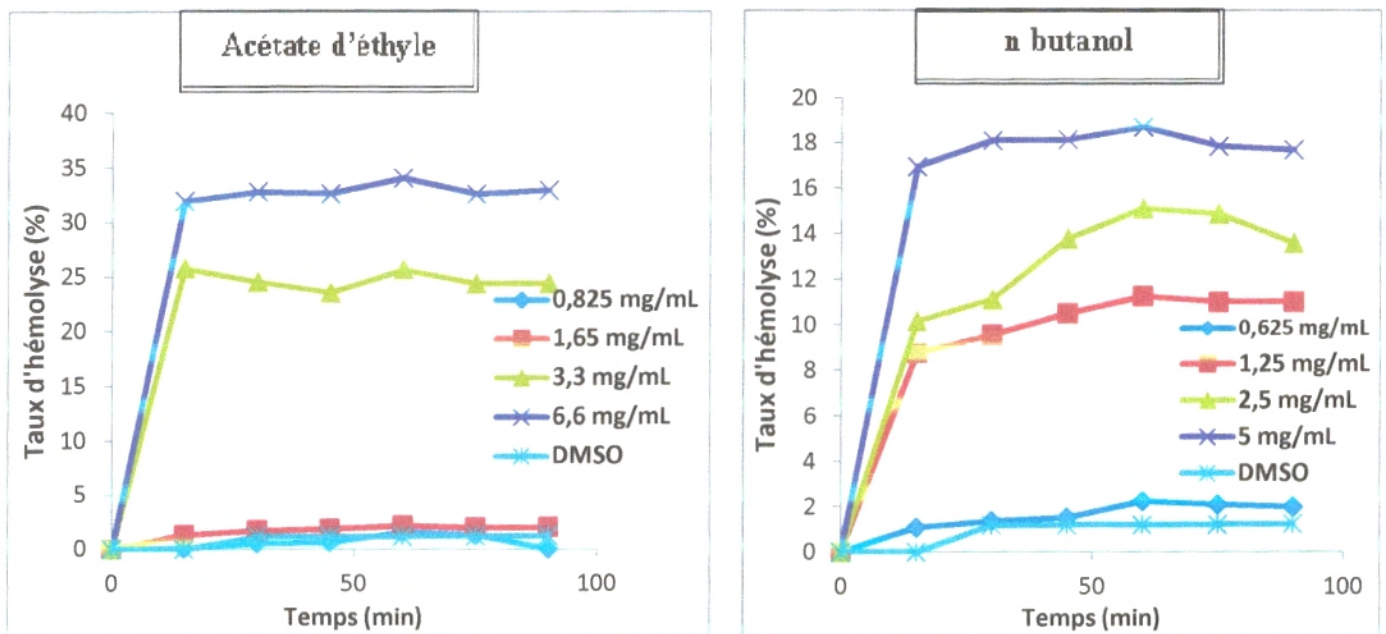


Figure 11: Taux d'hémolyse induit par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des racines d'*Echium vulgare* vis-à-vis des globules rouges

Nous remarquons d'après les figures que les extraits des racines sont moins toxiques vis-à-vis des globules rouges que les parties aériennes et ceci pour les deux plantes.

Conclusion et perspectives

Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme, l'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité soit étudiée.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à effectuer une étude phytochimique et à évaluer l'activité hémolytique des extraits de notre deux plantes vis-à-vis des globules rouge humain.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence différentes familles de composés chimiques dans les deux parties des plantes *Fredolia aretioides* appartenant a la famille des chénopodiacées récoltée de la région de Béchar et *Echium vulgare* appartenant a la famille des borraginacées poussant spontanément dans la région de Tlemcen.

A lumière des résultats obtenus dans notre étude, on peut conclure que la plante *Fredolia aretioides* est riche en tanins, composés réducteurs, terpènes, coumarines, quinones libres et en saponosides dans les deux parties de la plante, avec une faible présence des stéroïdes et une absence total des alcaloïdes et des flavonoïdes. Concernant la plante *Echium vulgare*, les tests phytochimiques montrent la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins, composés réducteurs, terpènes et en quinones libres. Par contre, nous constatons une faible présence des stéroïdes avec une absence totale des alcaloïdes.

Les tests d'hémolyse réalisée par la méthode spectrophotométrique on montré que les extraits acétate d'éthyle et n-butanol des racines d'*Echium vulgare* ainsi que l'extrait acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* ne présentent aucun effet toxique à 1mg/mL.

L'accomplissement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives.

Ce travail reste préliminaire et ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances responsables de la toxicité, il est intéressant d'approfondie cette étude par purification des molécules phytochimiques responsables de l'activité biologique et évaluer leurs effet toxique *in vivo*.

Références bibliographiques

1. **Akrout A., Gonzalez L.A., El Jani H.J., Madrid P.C., (2011).** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.*; 49: 342–347.
2. **Albreht A., Vovk I., simonovska B., Srbinoska M.,(2009).** Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium Italicum* L. *Journal of chromatography A, Elsevier*, 1216:3156-3162.
3. **Aline oliveira da conceição., (2010).** Effet d'extraits de plantes médicinales sur la différenciation cellulaire et le transport du calcium par les cellules syncytiotrophoblaste-like humaines. Thèse de doctorat de l'université du Québec à Montréal, 2 p.
4. **Anonyme., (2007).** Bien utiliser les plantes en situations des soins. 27 :641.
5. **Anyinam C., (1995).** Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Social Science and Medicine* ; 4: 321-329.
6. **Bahorun T., (1997).** Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. *Food and Agricultural. Research Council. Mauritius, Amas* ; 30 (5), 457p.
7. **Baratto M C., Tattinib M., Galardic C., Pinellie P., Romanic A., Visiolid F., Basosia R., Pogni R., (2003).** Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radic Res.*; 37 (4), 405–412.
8. **Belboukhari N., Cheriti A., (2009).** Analysis and Isolation of Saponins from *Limoniastrum feei* by LC-UV. *Chem. Nat. Comp.*; 45(5): 756-758.
9. **Belloum M., Bouheroum F., Benayache H., Benayache S., (2013).** Secondary metabolites from the aerial part of *Inula crithmoides* .*Chemistry of Natural Compounds*; 17(5): 54-61.
10. **Belouad A., (1998).** Plantes médicinales en Algérie. Office des publications nationale ; Algérie : 273.
11. **Benkhnig O., Zidane L., Fadli M., Elyacou H., Rochdi A., DouiRa A., (2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* ; 53: 191-216 .
12. **Benmahdi H., (2000).** Synthèses des molécules à double activité anti-HIV. Thèse de doctorat à l'université de Béchar, p75.

13. **Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. Springer Pharmacognosie. ISSN 1765-2847. Biology, 100: 84-91.
14. **Bock Benoit., (2012).** Tela Botanica. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France ; BDNFF v 4. 02.
15. **Boual Z., Kemassi A., Oudjana H.A., Michaud P., Didi OE., (2013).** Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *malva parviflora* L. (malvaceae): activité prébiotique. Université Kasdi Merbah-Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides, p 41.
16. **Bouanani S., Henchiri C., Migianu-Griffoni E., Aouf N., Lecouvey M., (2010).** Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. Journal of Ethnopharmacology; 129(1), 38-45.
17. **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3ème édition ; 17(5): 54-61
18. **Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4e éd. revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
19. **Burchard, H., (1890).** Beitragezur Kenntnis des Cholesterins. Chem. Zentralbl. 61,25.
20. **Chaouche T., (2010).** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques (antioxydants et antibactérienne) des extraits de la plante d'*Echium pycnanthum pomel* (hemimch).Magister en biologie. Département de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté des sciences Université Tlemcen, P 96.
21. **Chaudhri M., Paronychia C., Murbeck S., (1988).** *Chlorothyrsa* (Caryophyllaceae) in the Iberian Peninsula. Anales del Jardin Botanico de Madrid; 45(1), 361.
22. **Cosson E., Durieu M.C., (1885).** Notes sur nouvelles espèces d'Algérie .Bull .Soc. Bot. France, 2 :305.

23. Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Caus M., Pompei R., Bonsignore L., (2008). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*; 8, 302-305.
24. Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Hassani L.M., BADOUC A., Gmira N., (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibère marocaine, *thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 142, 61-78.
25. El Mansouri L., Ennabilli A., Bousta D., (2011) Socio economic interest and valorization of medicinal plants from the Rissani oasis (SE of Morocco). *Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* ; vol 1, pp. 30-45.
26. El shazly A., Ateya A., Abdel .Ali M., El dahmy S., Tel A., Wink M., (1999). pyrrolizidine alkaloids from *Echium rauwolfu* and *Echium horridum* (Borraginaceae). *Z. Naturforschung*; 54:295 -300.
27. El shazly A., sarg T., Ateya A., Abdel azziz E., El dahmy S., Witte L., Wink M., (1996 a). Pyrrolizidine alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. *Journal of naturel products*; 59:310-313.
28. El shazly A., sarg T., Ateya A., Abdel azziz E., El dahmy S., Witte L., Wink M., (1996 b). Pyrrolizidine and tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. *Phytochemistry*; 42:225-230.
29. El-Shazli A.M., Dora G., Wink M., (2005). Alkaloid of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss. (Chenopodiaceae). *Pharmazie* ; 60(12), 949-52.
30. Fourasté I., (2000). Rappel de la toxicité de quelques plantes. *Revue Française des Laboratoires* ; Vol 2000, Issue 323. pp 51-55.
31. Fukui H., Tsukada M., Mizukami H., Tabata., (1982). Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinones derivatives in *Echium lycopsis* Callus culture. *Phytochemistry*; 22(2):252-258.
32. Ghourri M., Zidane L., Douira A., (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences* ; Vol.17, ISSN 2071-7024.
33. Gibbs PE., (1971). Taxonomic studies of the genus *Echium*. I. An outline revision of the Spanish species. *Lagascali* ; 1:27-82.
34. Graves M., Mangold J., Jacobs J., (2010). Biology, ecology, and management of blueweed (*Echium vulgare* L). Montana State University Extension. Bozeman, MT. EB0195.

35. Hammouda F.M., Ismail S.I., Abdel-Azim N.S., Shams K.A., (2005). *Citrullus colocynthis* L. A Guide to Medicinal Plants in North Africa; 87-89.
36. Harborne J.B., (1998). Phytochemical method. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
37. Herbert R.B., (1989). The biosynthesis of secondary metabolites. 2nd edition Chapman and Halle; 11-115. p2.
38. Jain S.C., Sharma R., Jain R., Sharma R.A., (1996). Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. *Fitoterapia*; 67(3): 275-277.
39. Kabera J. N., Kakana P., Bigendako M., Tomani J.C., (2000). Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie de l'IRST A la recherche des composés bioactifs à base de plantes : cas du RWANDA .Lebanese Science Journal, Vol.14, No.2.
40. Kaoubaia G., Ayachb N., Elhafidb N., Bennanib S., Elkhayatb G., Medkourib M., Zamdb K., Hachimb M., Benghanemb B., Ramdanib G., (2011). Toxicité rénale secondaire à la prise de m'khinza. *Néphrologie & Thérapeutique* 7 ; 411–447.
41. Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., (2004). Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (baume du pomme). *Journal of medicine and scientific*.4(3) ,179-182.Negeria. ISSN 1682-4474.
42. Khattabi A., Rhalem N., Chabat A., Skali S, Soulaymani-Bencheich R., (2010). Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc* ; 2: 3-4.
43. Khedache Z., (1999). Etude écologique et fonctionnelle de quatre populations de *Fredolia aretioides* sur la transe Béchar-Béni-Abbès. Contribution à l'analyse architecturale de *Fredolia aretioides* Coss et Moq. Thèse magister USTHB, Alger, 122 p.
44. Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y., Song K.Y., et Hong S.J., (2002). Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* ; 296: 1238–1244.
45. Li W. C., Zhou J., Guo S. Y. and Guo L. D., (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*; 25: 69-80.

46. **Liebermann, N. C., (1885).** Uber das Oxychinoterpen. Ber. 18, 1803
47. **Mahmoudi Y., (1987).** La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Blida, Edition ANES Palais du livre ; 01 : 105.
48. **Meddour A., Yahia1 M., Benkiki., N Ayachi A., (2013).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. Lebanese Science Journal ; Vol. 14, No. 1, 49.
49. **Merzouki A., Ed-derfoufi F., Molero Mesa J., (2000).** Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). Fitoterapia; 71: 278-307.
50. **Mitkov S., Obreshkova D., Ilieva I., Pangarova T., Pencheva I., (2002).** Poisonings in agriculture. Acta Pharmacology Turcica ; 44: 43–48.
51. **Mohammedi zohra., (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat ; 2p.
52. **Muenschler W.C., (1975).** Poisonous plants of the United States. Revis- ed Edition. Collier Books, New York. 277 pp.
53. **Mulas M., (2004).** Strategic potentiality of use of the plants of the kinds *Atriplex* and *Opuntia* in the fight against the turning into a desert. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP), 91p.
54. **Nafisi S., Bonsaii M., Maali P., Khalilzadeh MA., Manouchehri F., (2010).** Beta-carboline alkaloids bind DNA. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 100: 84-91.
55. **Oloyede O. I., (2005).** Chemical Profile of unripe Pulp of *Carica papaya*. Pakistan Journal of Nutrition ; 4 (6): 379-381.
56. **Ouedraogo y.,Nacouima.,Guissou i.p.,Guede gulna f.j.,(2001).** Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* (willd).o.(rubiaceae).Pharm.med.tra.Alr. ; Vol 1, pp13-29.
57. **Papageorgiou V.P., (1999).** Naturally occurring isohexenyl naphthazarin pigments: a new class of drugs .Planta Medica; 38:193-203.
58. **Pardo F., Perich F., Torres R., Delle- Monache F., (2000).** Stigmast-4-ene-3,6-dione, an unusual phytotoxic sterone from the roots of *Echium vulgare* L. Biochemical Systematics and Ecology; 28: 911-913.

59. **Quezel P., Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
60. **Sezik E., Yessilaa E., Tabata M., Honda G., Takaishi Y., Fujito T., Tanaka T., Takeda Y., (1997).** Traditional Medicine in Turkey: Folk medicine in East Anatolia, ERZURUM, ERZINCAN, AGRI, KARS, IGDİR provinces. *Economic Botany*; 51(3) pp195-211.
61. **Soulaymani A., (2010).** Intoxication par *Atractylis gummifera* L. Données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc. *Springer*; 46(3):144–6.
62. **Tomas-barbarberan F.A., Tomas-lorente F., Ferreses F., Garcia-viguera C., (1986).** Flavonoids from *phlomis lychnitys*. *Phytochimistry*; 25, 1253.
63. **Trease E., Evans W.C., (1987).** *Pharmacognosy*. Billiaire Tindall. London 13th edition. pp61-62.
64. **Tron I., Piquet O., Baert A., Mouton C., (2002).** *Toxon Manuel de Toxicologie*. Guide technique. ADEME, Angers; 128p.
65. **Upton T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-ghamdi F., Chen F- II.,(2000).** Leaf flavonoides as systematic characters in the *Genera lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systematic and ecology*; 28,991-1007.
66. **Veiga Junior V.F., Pinto AC., (2005).** «Plantas medicinais: cura segura? » *Quimica Nova*; vol. 28, p 519-528.
67. **Viala A., Botta A., (2007).** *Toxicologie*, 2ème édition, Lavoisier ; pp 03-10.
68. **Wang W.J., Yi M.G., Zhu X.Y., (1988).** A study on absorption, distribution and excretion of tritiated shikonin in mice. *Acta Pharm. Sin.* ; 23:246-251.
69. **Younos C., Soulimani R., Seddiqi N., Baburi O., Dicko A., (2005).** Etude ethnobotanique et historique des tamaris (*Tamarix sp.*, tamaricaceae) et leurs usages actuels en Afghanistan. *Phytothérapie* ; 6, 248-251.
70. **Zakaria I., Ahmat N., Jaafar FM., Widyawaruyanti A., (2012).** Flavonoids with antiplasmodial and cytotoxic activities of *Macaranga triloba*. *Fitoterapia* ; 83:968-972.
71. **Zhang M., Wang A., Xia T., He P., (2008).** Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-κB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett.* ; 179:1–5.