وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique**

جامعة محمد الصديق بن يحي–جيجل-


**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.**

**Département** : **Biologie Moléculaire et Cellulaire**

كلية عـــلوم الطـبيعة والحـــياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية


***Mémoire de Fin d'Etudes***

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie**


جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة


Filière : Sciences Biologiques

Option : Sciences pharmacologiques

***Thème :***

# Evaluation de l'activité antioxydante et de la cytotoxicité des extraits de *Nerium oleander in vitro*


**Membres de jury :**

**Présidente :** Dr. ZABAIOU Nada
**Examinatrice :** Dr. KHELFELLAH Amina
**Encadrante :** Dr. LAHOUEL Asma

**Pésenté par :**

LEMOUARI Nihed

LEFOUILI Meryem


**Année Universitaire : 2021/2022**

Numérod'ordre (bibliothèque):……

# *Remerciements*

*Avant tout, nous remercions ''**Allah**''le tout puissant de nous avoir donné la santé,la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur **Dr.LAHOUEL Asma** qui nous dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le tempsqu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous remercions très sincèrement, les membres de jury **Dr.ZABAIOU Nada** qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, **Dr.KHELFELLAH Amina** d'avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.*

*Enfin, nous adressons nos sincères remerciements à tous les membres du laboratoire du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'université de Jijel pour leur aide.*

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude*

*A dieu de tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.*

*A mes très chers parents, que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidé dans ma vie et qui n'ont cessés de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, que dieu les garde en bonne santé.*

*A mes frères pour leurs tendresses et leurs permanentes présence à mes cotés sans oublié mes grands parents pour leurs soutient et encouragement.*

*Je le dédie aussi à tous les enseignants de notre faculté qui ont toujours guidé tout au long de mon parcours éducatif A mes amis qui ont cru en moi et qui ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliables.*

***Nihed***

## ***Dédicaces***

*je remercie avant tous **ALLAH**, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, la compétence et le courage pour dépasser toutes les difficultés, et finaliser ce modeste travail de recherche.*

*A mes parents, mes frères et ma soeur*

*Je souhaite vous remercier tout particulièrement car vous m'avez toujours soutenu, tant moralement que financièrement. qui m'ont permis finalement d'écrire cette thèse, pour ma plus grande satisfaction.*

*A mes amis qui ont crus en moi et qui ont toujours encouragés*

***Meryem***

# Table des matières

Remerciement

Dédicace

Table des matières ..... i

Liste des figures ..... iv

Liste des tableaux ..... v

Liste des Abréviations ..... vi

Introduction ..... 1

## SECTION I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I. *Nerium oleander*

1. Généralités sur *Nerium Oleander* ..... 3
2. Etude taxonomique de *Nerium Oleander* (Linn.) ..... 3
   2.1. Classification botanique ..... 3
3. Description botanique ..... 4
4. Distribution géographique ..... 4
5. Utilisations médicinales et traditionnelles dans le monde ..... 5
6. Composition chimique de *Nerium Oleander* ..... 6

## Chapitre II. Toxicité et bio activité du *Nerium oleander*

1. Toxicité ..... 8
   1.1. Généralités ..... 8
   1.2. Doses toxiques ..... 8
      1.2.1. Chez l'animal ..... 8
      1.2.2. Chez l'homme ..... 9
   1.3. Toxicité animale ..... 9
      1.3.1. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le poumon ..... 9
      1.3.2. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le foie ..... 9
      1.3.3. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le rein ..... 9
      1.3.4. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le cœur ..... 10
   1.4. Toxicité clinique de *N. Oleander* ..... 10

1.5. Traitement ..... 11
2. Bioactivité du *Nerium Oleander* ..... 11
2.1. Activité antimicrobienne ..... 11
2.1.1. Activité antibactérienne ..... 11
2.1.2. Activité antifongique ..... 12
2.1.3. Activité antivirale ..... 12
2.2. Activité antidiabétique ..... 13
2.3. Activité antioxydants ..... 14
2.4. Activité anticancéreuse ..... 15

## SECTION II : ETUDE PRATIQUE

## Chapitre I. Matériel et méthodes

1. Matériel ..... 17
1.1. Matière végétale ..... 17
2. Méthode ..... 17
2.1. Séchage et broyage ..... 17
2.2. Préparation des extraits de plante ..... 17
2.2.1. Préparation des extraits brutes méthanolique des feuilles et fleures par macération ... 17
2.2.2. Extraction des alcaloïdes des feuilles et pour les fleures du *Nerium Oleander* ..... 17
2.3. Détermination de rendement d'extraction ..... 18
2.4. Caractérisation photochimique et activité antioxydante ..... 18
2.4.1. Caractérisation photochimique ..... 18
2.4.1.1. Dosage des polyphénoles ..... 18
2.4.1.2. Dosage des flavonoïdes ..... 19
2.4.1.3. Dosage des alcaloïdes ..... 20
2.4.2. Activité antioxydante ..... 20
2.4.2.1. Test de la capacité antioxydant totale (TAC) (réduction de molybdate d'ammonium) ..... 20
2.4.2.2. Test de DPPH ..... 20
2.4.2.3. Test de FRAP (Test de la réduction du fer/ Ferricreducing-antioxidant power) ..... 22
2.5. Tests de Cytotoxicité ..... 22
2.5.1. Test d'induction de la trypsine ..... 22
2.5.2. Test de dénaturation des protéines (BSA) ..... 23
2.5.3. Peroxydation lipidique ..... 23

2.5.4. Inhibition de la prolifération cellulaire ..... 24
3. Etude statistique ..... 25

## Chapitre II. Résultats et discusion

1.Rendement de l'extraction par macération ..... 26
2. Teneurs en polyphénols totaux ..... 27
3. Teneurs en flavonoïdes totaux ..... 28
4. Teneurs en alcaloïdes totaux ..... 29
5. Le test de piégeage du radical DPPH ..... 29
6. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : FerricbReducing Antioxydant Power) ..... 31
7. Capacité antioxydante total (Test de réduction de molybdate d'amoniume) ..... 32
8. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la peroxydation lipidique ..... 33
9. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la dénaturation de la protéine BSA ..... 35
10. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur l'induction de la trypsine ..... 36
11. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la prolifération des levures ..... 37
Conclusion et perspective ..... 39
Référence bibliographiques ..... 40
Annexes
Résumé

# Liste des figures

Figure 1 : Plante *Nerium Oleander .L*.....4

Figure 2 : *Nerium Oleander* (fleurs blanches, roses et rouges) .....4

Figure 3 : Activité anti-diabétique de *Nerium Oleander*. .....13

Figure 4 : Structure chimique de radicale libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).....21

Figure 5 : Réaction de test DPPH .....21

Figure 6 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferricreducingantioxidant power) .....22

Figure 7 : Rendement des extraitsméthanolique, acétique et chloroformique des feuilles et fleurs de *Nerium Oleander*.....26

Figure 8: Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'extrait brut, chloroformique, l'extrait d'acide acétique, et l'acide ascorbique à différentes concentrations.....30

Figure 9 : Pouvoir réducteur de fer des extraits à différentes concentrations par la méthode FRAP.....31

Figure 10 : Pourcentagede peroxydation lipidique induite par FeCl3, l'extrait chloroformique, et l'extrait acétique, à différentes concentrations.....33

Figure 11 : Pourcentage de peroxydation lipidique par FeCl3, la quèrcitine, l'extrait brut. .34

Figure12: Pourcentage de dénaturation de BSA par l'HCl, l'extrait brut, chloroformique et l'extrait acétiqueà différentes concentrations. .....35

Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des levures par les extraits de *Nerium Oleander* à la concentration de 50µg/ml.....37

Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération de levure par les extraits de *Nerium Oleander*à la concentration de 100µg/ml.....38

# Liste des tableaux

Tableau 1: Principales utilisations de *Nerium Oleander* en médecine traditionnelle selon les Pays. ..... 5

Tableau2:Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium Oleander*. ..... 7

Tableau3: Rendement de différentes méthodes d'extraction des feuilles et fleurs de *Nerium Oleander*. ..... 26

Tableau 4 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Nerium Oleander*..... 27

Tableau 5 : Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Nerium Oleander*..... 28

Tableau 6 : Teneur en alcaloïde totaux dans les différents extraits de *Nerium Oleander*. .... 29

Tableau 7 : Le pouvoir antioxydant (exprimé par IC50en ug/ml) des antioxydants de références et des extraits testés. ..... 30

Tableau 8 : La capacité antioxydante totale qui correspondent l'absorbance à 0,5 nm..... 32

Tableau 9 : Pourcentage d'induction de l'activité de la trypsine, par les différents extraits de *Nerium Oleander*. ..... 36

## Liste des Abréviations

**A :** Acide

**Abs:** Absorbance

**AC :** Acide ascorbique

**AG :** Acide gallique

**AlCl3 :** Chlorure d'aluminium

**BSA :**Albumine de sérum bovin

**C° :** Température

**C2H4O2 :** Acide acétique

**CHCl3 :** Chloroforme

**DPPH :** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**E :** Extrait

**ED :** Eau distillé

**FeCl3 :** Chlorure ferrique

**FRAP :** Ferricb Reducing Antioxydant Power

**g :** Gramme

**H :** Heure

**H2SO4 :** Acide sulfurique

**HCl :** Acide chlorhydrique

**IC50:** Concentration inhibitrice à 50%

**KCL :**Chlorure de potassium

**MDA :** Malone-dialdéhyde

**mg/ml :** Milligramme par millilitre

**min :** Minute

**ml :** Millilitre

**N :** Nerium

**NaCl :** Chlorure de Sodium

**NaCN:** Cyanure de sodium

**NaOH :** Hydroxyde de sodium

**R % :** Rendement en pourcentage

**TBA :** Acide thiobarbiturique

**TCA :** Acide trichloroacétique

**TP :** Tampon phosphate

**Ug :** Microgramme

**Ug EAG/ml d'extrait :** Microgramme équivalant de l'acide gallique par millilitre

**Ug EAN/ml :** Microgramme équivalant de l'acide nicotinique par millilitre

**Ug EQ/ml :** Microgramme équivalant de quercitine par millilitre

**Ug /ml :** Microgramme par millitre

**% :** Pourcentage

# INTRODUCTION

# Introduction

La médecine traditionnelle est une partie importante du patrimoine culturel d'une société et elle s'est développée en fonction du mode de vie et des pratiques culturelles de la société **(Dey et Chaudhuri, 2014).**

Au cours des dernières décennies, le domaine de la phytothérapie a connu une croissance exponentielle. Elle est de plus en plus populaire dans les pays développés et en développement en raison de son origine naturelle et de ses effets secondaires réduits. Les plantes produisent généralement de nombreux métabolites secondaires qui sont dérivés de manière biosynthétique des métabolites primaires et constituent une source importante de produits chimiques utilisés comme produits pharmaceutiques, agrochimiques, arômes, parfums, couleurs, biopesticides et additifs alimentaires **(Al-Snafi, 2020).**

*Nerium Oleander* est l'une des plantes les plus toxiques connues dans le monde. Elle contient de nombreux composés toxiques, dont beaucoup peuvent être mortels pour l'homme, en particulier les jeunes enfants. Les plus importantes de ces toxines sont l'oléandrine et la nérine, qui sont des glycosides cardiaques. Elles sont présentes dans toutes les parties de la plante, mais sont plus concentrées dans la sève, qui peut bloquer les récepteurs de la peau et provoquer un engourdissement. L'ingestion de cette plante peut affecter le système gastro-intestinal, le cœur et le système nerveux central. On pense que cette plante peut contenir de nombreux autres composés inconnus qui peuvent avoir des effets dangereux **(Ebrahimi et *al*.,2018).**

Malgré sa grande toxicité, *Nerium Oleander* a montré une activité antibactérienne, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antinociceptive et antitumorale il est utilisée même contre les problèmes cardiaques, l'asthme, l'épilepsie, le cancer, les menstruations douloureuses, la lèpre, le paludisme, la teigne, l'indigestion et les maladies vénériennes, ainsi que les médicaments dérivés de cette plante sont utilisé dans le traitement du cancer **(Farooqui etTyagi, 2018; Sinha et Biswas, 2016).**Ce travail vise à evaluer particulierment la cytotoxicité de *NeriumOleander in vitro.*

Notre travail est réalisé en deux parties. La première partie concernant l'étude bibliographique, relative à la plante étudiée, aux ompositions chimiques et bioactivité. La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à l'évaluation de la cytotoxicité des extraits de *Nerium Oleander*. Nous avons choisi l'extraction méthanolique et éthanolique acedique et chloroformique de la plante (feuille, fleur). Une étude phytochimique et évaluaion de

l'activité antioxydante des différents extraits ont été effectués, suivi par une étude de cytotoxicité. La cytotoxité des différents extraits a été évaluée par une gamme des tests in vitro qui comportent particulièrement le test d'induction de peroxydation lipidique, de dénaturation des protéines et d'inhibition de la prolifération cellulaire.

# SECTION I :

## Rappels bibiographiques

# Chapitre I.

# *Nerium oleander*

## 1. Généralités sur *Nerium Oleander*

Le *Nerium Oleander* (Syn. N. indicum), est un arbuste qui appartient à la famille des Apocynaceae, communément appelé laurier-rose (appelée localement Défla), en raison de sa ressemblance superficielle (non apparentée) avec l'olive *Olea*. De nombreux cultivars de *Nerium Oleander* ont été sélectionnés et développés par des particuliers, des pépinières et des institutions publiques. Cette plante peut être propagée par graines mais, étant allogame et fortement hétérozygote, elle présente une grande variabilité dans les populations de semis **(Ebrahimi et *al*., 2018).**

*Nerium Oleander* est connu sous différentes dénominations communes selon les pays et les régions considérées :**(Al-Snafi, 2020).**

- ✓ Afriquain: selonsroos
- ✓ Arabe :Difla , Ward Al-Hemar, Sim Al-Hemar
- ✓ Anglaise : Oleander, Rose bay, Rose laurel
- ✓ Française : Oleander
- ✓ Allemand : Oleander
- ✓ Japonaise : kyōchiku-tō
- ✓ Portugaise : Espirradeira, oleandro
- ✓ Espagnole : Adelfa, Balandre, Laurel rosa, Pascua

## 2. Etude taxonomique de *Nerium Oleander* (*Linn*.)

### 2.1. Classification botanique

Selon **Verma et *al*., (2018)** *Nerium Oleander* appartient au

- ✓ Royaume :Plantae
- ✓ Sous royaume : Viridiplantae,Streptophyta
- ✓ Superdivision : Embryophyta
- ✓ Division : Tracheophyta
- ✓ Subdivision : Spermatophytina
- ✓ Classe : Magnoliopsida
- ✓ Superordre : Asteranae
- ✓ Ordre : Gentianales
- ✓ Famille : Apocynaceae
- ✓ Genre : *Nerium*

- ✓ Espèce : *Nerium Oleander L*

**Figure 1 :** Plante *Nerium Oleander .L* **(Sinha et Biswas, 2016).**

## 3. Description botanique

*N. Oleander L*. est un petit arbuste à feuilles persistantes ou un arbre densément ramifié de 2-5 m de hauteur. Les feuilles mesurent de 5 à 20 cm de long, sont coriaces, vert foncées dessus et vert plus clair dessous, et deviennent jaunes avant de tomber. Les plantes ont un système racinaire étendu et sont souvent utilisées pour stabiliser le sol dans les zones plus chaudes. Les fleurs sont produites en grappe terminale d'environ 5 cm de diamètre avec cinq pétales et différentes couleurs qui varient du lilas, rouge, saumon, carmin, rose foncé à pâle, violet, cuivre, abricot, orange, blanc, jaune ou bicolore **(Laughlin, 1997).** Le fruit consiste en un follicule étroit de 7,5 à 17,5 cm de long et s'ouvre pour disperser des graines duveteuses **(Sinha et Biswas, 2016).**

**Figure 2 :** *Nerium Oleander* (fleurs blanches, roses et rouges) **(Farkhondeh et *al*.,2020).**

## 4. Distribution géographique

*Nerium Oleander* est une plante originaire d'Europe et d'Afrique et on la trouve couramment dans les régions tropicales et subtropicales du monde. Cette plante est cultivée dans

les régions plus septentrionales, elle pousse spontanément sur les berges rocheuses des rivières, parfois même dans les zones côtières, généralement dévolues à des espèces halophiles. Elle s'adapte à la sécheresse et est très décorative **(Bruneton, 2001).**

Cette plante se distribuait à l'origine dans la région subtropicale de l'Asie et de la Méditerranée, mais elle pousse maintenant dans de nombreuses régions du monde, notamment aux États-Unis, en Australie, en Chine, dans les pays du Moyen-Orient **(Derwich et *al*., 2010)** et dans différents lieux géographiques et écologiques. Elle était distribuée en Afrique (Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Niger), en Asie (Émirats arabes unis, Afghanistan, Chypre, Iran, Irak, Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Turquie, Inde, Népal, Pakistan), et europe (Albanie, Croatie, Grèce, Italie, Malte, France, Portugal, Espagne) et cultivé dans de larges zones, et semble être originaire de la région méditerranéenne et du sous-continent indo-pakistanais **(Sinha et Biswas, 2016).**

## 5. Utilisations médicinales et traditionnelles dans le monde

*Nerium Oleander* est employée en médecine traditionnelle. Les feuilles de ses plantes étaient extrêmementutilisées dans le traitement de certaines maladies chroniques et obstinées de la peau, notamment la lèpre et l'alopécie. La poudre des feuilles était utilisée comme tabac pour traiter l'épilepsie. La racine réduite en poudre avec de l'eau, était appliquée pour soulager les maladies vénériennes et pour le traitement des hémorroïdes **(Khare, 2004).** Le tableau 1 résume les différents usages en médécine traditionnelle de *Nerium Oleander*à travers le monde.

**Tableau 1:** Principales utilisations de *Nerium Oleander* en médecine traditionnelle selon les Pays.

| Parties utilisées | Pays | Indications |
|---|---|---|
| Feuilles fraîches ou séchées | Algérie | Nettoyage et assouplissement des pieds (peau), contre les caries dentaires **(Maftah et *al*., 2003).** |
| | Maroc | Antidiabétique, abortif, démangeaison, mal de tête, hypoglycémiant, anti vertigineux **(Bnouham et *al*., 2002)**, antigale, contre la chute des cheveux et l'eczéma **(Oukal, 2008).** |
| | Afrique du sud | Abortif (**Adom et *al*., 2003)** |
| | Iran | Cardiotonique et diurétique **(Adom et *al*., 2003).** |
| Différents organes | Cuba | Médecine de folklore **(Adom et *al*., 2003).** |
| | Inde et Bangladesh | Antibactérien **(Adom et *al*., 2003)** |

## 6. Composition chimique de*Nerium Oleander*

Le dépistage phytochimique préliminaire montre que la plante est riche en métabolites primaires notamment les glycosides et les stéroïdes cardioactifs comme les glycosides cardiaques et les cardénolides qui sont les composants caractéristiques de cette plante. Notamment les graines contiennent des glucosides (oléandrine, odorosides, adigoside), L'écorce contient également des glucosides (rosaginoside, nerioside, corteneroside) et les racines contiennent des stéroïdes **(Al-Snafi, 2020).**

Le composé majoritaire est l'oléandroside ou oléandrine est la 16 acétylgitoxigénine (oleandrigénine) et la partie osidique l'oléandrose (désoxymethyl-rhamnose). La concentration dans la plante est d'environ 0,08 % **(Hammiche et *al*., 2013).**

La quantité maximale d'oléandrine se trouvait dans les racines, suivies des feuilles, des tiges puis des fleurs. Les concentrations d'oléandrine dans les parties de la plante variaient de 0,18 à 0,31mg/g de poids sec (10-18%) dans les feuilles, et de 0,120 à 23mg/g de poids sec (9-20%) dans la tige, et de 0,34 à 0,64mg/g de poids sec (10-18%) dans les racines **(Tayoub et *al*., 2014).**

Les études phytochimiques effectuées sur le *N. Oleander* ont permi d'isoler également un grand nombre de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des phénols, des saponines, des pregnanes, des triterpénoïdes et des triterpènes **(Chaudhary et *al*., 2015).**

Une grande quantité des polyphénols est présente dans les feuilles de *N. Oleander.* L'acide cinnamique est le composant phenolique principal. Les autres composants phenoliques sont l'épicatéchine, la catéchine et l'acide chlorogénique. L'acide oléandrique et un nouveau triterpène isolé des feuilles fraîches de *N. Oleander* avec plusieurs flavones (0,5%) et huiles volatiles **(Ebrahimi et *al*., 2018).** Le tableau 2 résume la composition phytochimique des différentes parties de *N. Oleander* selon plusieurs études.

**Tableau2:**Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium Oleander.*

| Partie de plante | Groupe de substance | Substances isolées |
|---|---|---|
| Feuilles | Cardénolides**(Sinha et Biswas, 2016).** | L'eneridiginoside, le nerizoside, le neritaloside , l'odoroside-H, roside-H,adynerin, folinerin, kaneroside, neriaside, oleandrin . |
| | Triterpènes**(Farooqui et Tyagi, 2018)** | Les acides nériucoumarique et isoneriucoumarique, et triterpènes de type ursane 1, oléane 2 et dammarane 15 ,l'acide 3beta-hydroxy-12-ursen-28-oïque,acideoléanolique, acide bétulinique, bétuline, taraxasterane, 20beta,28-époxy-28 alpha-méthoxytaraxasteran-3beta-ol et 20 beta, 28-époxytaraxaster-21-en-3beta-ol,ursane. |
| | Glycosides**(Farooqui et Tyagi, 2018)** | l'oléandrine, la nériine, les cardénolides, le gentiobiosyl et l'odoroside. |
| | Alcaloïdes**(Ebrahimi et *al*.,2018)** | Méthyle 6-dioxy-2-o méthyle, β-d-allopyranoside , cycloheptasiloxane , tétradécaméthyle, cyclooctasiloxane, l'hexadécaméthyle, cyclononasiloxane, l'octadécaméthyle, cyclodécasiloxane, l'eicosaméthyle. |
| Racines | Cardénolides **(Paris et *al*.,1971) ;(Huq et *al*.,1999) ;(Hanson,1985)** | neriumogenin-β, neriumoside A-1, neriumoside A-2, neriumoside B-1, neriumoside B-2, neriumoside C-1. |
| Graines | | oleandrin, odorosides. |
| L'écorce | | graciloside, neriodorein, neriodorin, odorobioside -K, odoroside-A, odoroside-B, 1-strophanthin. |
| Graines | Glycosides **(Zibbu et Batra, 2010)** | oléandrine, odorosides, adigoside. |
| L'écorce | | rosaginoside, nerioside, corteneroside. |
| Différent parties | Flavonoides**(Hanson, 1985)** | campherol-3rhamnoglucoside ,quercetin,quercetin-3-rhamnoglucoside, rutin. |

# Chapitre II.

# Toxicité et bio-activité de *N .oleander*

# 1. Toxicité

## 1.1. Généralités

La toxicité de *N. Oléandre*a été découverte depuis l'antiquité. Toutes les parties de la plante, en particulier les graines et les racines, qu'elles soient fraîches, séchées ou bouillies, étaient rapportées toxiques. Les principaux composants toxiques sont les glycosides cardiaques. A leurs effets, même une petite quantité de *Nerium Oleander* peut causer la mort en raison de ses effets sur le cœur **(Turan et *al*.,2006).**

Il est commun que l'ingestion de *Nerium Oleander* provoque des signes et des symptômes à la fois cardiaques, gastro-intestinaux et neurologiques : les signes gastro-intestinaux : nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhée. Les principaux symptômes neurologiques sont : tremblements, somnolence et ataxie. Une hypotension et une perte de conscience peuvent également survenir et aussi des crises d'épilepsie ont été décrites. Les effets cardiaques des glycosides sont dus à une cardiotoxicité **(Farkhondeh et *al*.,2020).**

Les symptômes cliniques comprennent des coliques, de la diarrhée, une respiration laborieuse, des tremblements musculaires, de l'ataxie, une incapacité à se tenir debout, un pouls irrégulier et faible, des extrémités froides en raison de la diminution du débit cardiaque, et des convulsions. La consommation de cinq feuilles de *Nerium Oleander* peut provoquer un empoisonnement mortel. Cependant, il a été signalé qu'une feuille de *Nerium Oleander* avait des effets toxiques graves chez les enfants et les animaux **(Al-Snafi, 2020).**

## 1.2. Doses toxiques

### 1.2.1. Chez l'animal

*N. Oléandre* est toxique en ordre des milligrammes chez la majorité des espèces animales. La dose toxique de feuilles sèches, est estimée à 3 g par voie orale chez le chien. Une seule feuille suffirait à tuer un mouton. La dose mortelle de feuilles séchées a été évaluée et varie de 3 à 14 g/kg chez le mouton. Les premiers signes de toxicité (hépatiques, rénaux, anémie et leucopénie) apparaissent à partir de 0,06 g/kg. Une dose de 11 mg/kg est mortelle pour les ruminants. Pour plusieurs autres espèces animales, 0,5 mg/kg de feuille représente la dose létale **(Hammiche et *al*., 2013).**

### 1.2.2. Chez l'homme

Chez l'enfant, une seule feuille pourrait entrainer la mort. Chez l'adulte, l'ingestion de 3 à 10 feuilles a été responsable de troubles très sérieux selon le cas. La dose létale a été estimée à 4 g de feuilles chez l'adulte, alors qu'une consommation de feuilles supérieure à 0,5 mg/kg causerait la mort d'un sujet insuffisant cardiaque **(Hammiche et *al*., 2013).**

## 1.3. Toxicité animale

### 1.3.1. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le poumon

Le poumon est un organe cible de nombreux produits toxiques. **Abbasi et sescollaborateurs (2014)**, ont étudié la toxicité pulmonaire de *N. Oleander*, chez le rat. Les dommages observés pourraient être dus à un stress oxydatif produit par des substances toxiques, déséquilibre dans le niveau de production/consommation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il y a eu un début de destruction des tissus, des dommages des cellules alvéolaires ainsi que des nodules importants. L'accumulation des macrophages et des cellules mononucléaires autour de l'artériole a été également observé. Cela peut s'expliquer que pendant la réponse inflammatoire, une accumulation de macrophages se produisait libèrant ainsi certains facteurs chimiotactiques qui attirent les neutrophiles **(Abbasi et *al*., 2014)**.

### 1.3.2. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le foie

**Abbasi et ces collègues en 2018**, ont étudié également la toxicité hépatique de l'extrait aqueux de *N. Oleander* chez le rat Wistar. L'injection intramusculaire de la décoction de feuilles a induit des changements significatifs dans l'expression des cytokines de phase aiguë et des gènes régulateurs du fer. Les composants de la décoction de *N. Oleander* ont induit l'expression du gène de l'IL-6 et une altération de l'expression de l'hepcidine pour réguler leniveau de fer sérique. Cela pourrait être dû à une réponse physiologique à l'accumulation du fer dans le foie **(Abbasi et *al*.,2018)**.

### 1.3.3. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le rein

L'étude de toxicité *N. Oleander* sur les reins chez le rat, a révélé des changements histologiques dégénératifs et délétères marqués dans les tubules rénaux et une distorsion des cellules épithéliales en général, dans la section du rein. Ces changements pourraient être dus à l'interférence des toxines avec l'intégrité structurelle des glomérules et des tubules rénaux, ce qui pourrait provoquer une fuite d'enzymes lysosomales, causant ainsi une hémorragie et une

desquamation des cellules épithéliales rénales dans les tubules convolutés, un rétrécissement des glomérules et une nécrose des tubules rénaux **(Abbasi et *al*.,2018).**

### 1.3.4. Effets toxiques de *N. Oleander* sur le cœur

**Ozmaie et ses collèges en 2013**, ont révélé que l'administration expérimentale de l'extrait de *N. Oleander* à des moutons a montré une dégénérescence et une nécrose du myocarde associées à une hémorragie grave et à une infiltration de cellules inflammatoires mononucléaires et une nécrose coagulative des cellules musculaires cardiaques **(Ozmaie et *al*., 2013)**.

## 1.4. Toxicité clinique de *N. Oleander*

*N. Oleander* est hépatotoxique, hématotoxique, neurotoxique et toxique également sur le cœur et le système respiratoire. De plus, la quantité de glycoside toxique dans la plante varie en fonction de la taille des feuilles, de la saison et d'autres paramètres environnementaux dans lesquels cette plante a poussé. Cependant, la dose létale de feuilles de *N. Oleander* pour les patients était documentée d'environ 4 g, mais d'autres études doivent être menées pour déterminer la dose létale exacte. La dose létale de cette plante dans les études animales n'est pas similaire car certaines études ont utilisé des feuilles séchées et d'autres des plantes vertes **(Osterloh et *al*., 1982).**

L'empoisonnement humain dû à *N. Oleander* peut être causé par une consommation accidentelle ou intentionnelle, une consommation à des fins médicinales, ou un empoisonnement criminel. L'empoisonnement par *Nerium Oleander* a été observé dans certains pays ; en Europe, aux Etats-Unis, en Asie et en Afrique, ainsi qu'en Australie. Cependant, eu de rapports de cas associés à l'empoisonnement au *N. Oleander* ont été documentés **(Eddleston et *al*.,1999).**

Dans ce contexte, un cas d'empoisonnement par *N. Oleander* d'une femme âgée de 96 ans a été rapporté et qui adécédé suite à la consommation de *N. Oleander* **(Osterloh et *al*.,1982).** Un autre cas d'une femme de 83 ans a survécu à un empoisonnement par *N. Oleander* qu'elle avait ingéré pour se suicider, tandi, qu'une femme caucasienne de 58 ans a décédé suite à la consommation de *N. Oleander* pour s'empoisonner elle-même **(Driggers et *al*.,1989).**

Un empoisonnement au *Nerium Oleander* a été signalé chez une femme de 21 ans. Elle a été admise à l'hôpital avec des vomissements, des vertiges et un bloc cardiaque **(Khan et *al*.,2010).**

## 1.5. Traitement

Le traitement des patients empoisonnés est celui de l'intoxication digitalique : faire vomir le plus tôt possible, garder les vomissements, effectuer un lavage gastrique avant l'apparition de troubles cardiaques.

Doser la kaliémie car l'hyperkaliémie détermine la gravité de l'intoxication, corriger l'équilibre électrolytique, corriger la bradycardie par de l'atropine, surveiller en permanence l'ECG (monitoring cardiaque) et administrer des anticorps anti digitaliques.

Les anticorps anti digitaliques sont des fragments Fab qui déplacent les digitaliques de leurs sites membranaires et favorisent leur élimination rénale sous forme inactive. Du fait de l'analogie structurale de l'oleandrine avec la digoxine et la digitoxine, ces anticorps spécifiques de la digoxine sont prescrits, souvent avec succès. L'élimination du toxique demande une à deux semaines **(Hammiche et *al*.,2013).**

## 2. Bioactivité du *Nerium Oleander*

Plusieurs études expérimentales ont révélé que*Nerium Oleander*est dotée d'une large gamme d'activités pharmacologiques.

## 2.1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de *Nerium Oleander* a été examinée contre différentes souches de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, de levures de moisissures et de virus **(Ali et *al*., 2010).**

### 2.1.1. Activité antibactérienne

L'extrait chloroformique, éthanolique et méthanolique de *Nerium Oleander* ont montré une forte activité antibactérienne, contre toutes les souches bactériennes testées. Les zones d'inhibition produites par les extraits testés ont été comparables aux zones produites par les antibiotiques standards **(Hussain et Gorsi, 2004).** On effet, les extraits de feuilles de *N. Oleander*à 80-100 % peuvent être utilisés comme antibactériens locaux et pour le traitement des plaies ouvertes **(Minnat, 2016).**

**En 2016, Minnat**a montré que le traitement local de plaie par l'extrait aqueux de *N. Oleander* a induit une guérison complète et sans complication au bout de 6 à 7 jours par rapport à l'antibiotique local fucine en pommade. Alors, les extraits aqueux de feuilles de *N. Oleander*ont

une activité inhibitrice contre les bactéries gram-positives et gram-négatives, ce qui indique la présence de composés antimicrobiens **(Minnat, 2016)**.

Dans une autre étude, les extraits aqueux et éthanoliques de *Nerium* ont été testé pour leur activité contre les bactéries gram positives et gram négatives isolées de la culture d'infection de brûlures. Cette étude a révélé que l'extrait éthanolique de la plante a montré une activité plus élevée que l'extrait aqueux. Ces extraits des plantes contre les bactéries gram négatives, ont montré une activité dans un pH acide seulement, contrairement aux bactéries gram positives qui ont été sensibles aux extraits indépendamment au pH **(Aboud, 2015).**

### 2.1.2. Activité antifongique

**Siddiqui et *al*., 2016**, ont rapporté que l'extrait chloroformique de racine de *Nerium* a réduit la croissance du champignon à son maximum, suivi par l'extrait cétonique. L'extrait chloroformique de feuilles a montré la meilleure activité antifongique suivi par les extraits de feuilles méthanolique, acétonique et éthanolique. En comparant l'activité de feuilles et deracines, les racines se sont avérées être les plus efficaces pour réduire la croissance du champignon **(Siddiqui et *al*., 2016).**

### 2.1.3. Activité antivirale

L'activité antivirale d'un extrait chaud et froid de *Nerium Oleander* contre six virus différents tels que le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), le virus de la polio de type 1 (Sb-1), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le réovirus de type 1 (Reo-1), le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) et le virus de la fièvre jaune (YFV) ont été testé *in vivo* par **Sanna et ces collaborateurs (2021)**. Ils ont rapporté que l'extrait chaud et l'extrait froid de *Nerium Oleander* ont tous deux inhibés l'infection virale Sb-1. L'extrait de *Nerium Oleander* exerçait son effet après la période d'infection, en particulier pendant les deux premières heures suivant l'infection **(Sanna et *al*., 2021).**

**Singh et ces collèges en 2013**, ont rapporté que l'extrait aqueux commercial de *N. Oleander* (Anvirzel™) possède une activité anti VIH. Il limite la production de virus par l'inhibition de la réplication virale. Le traitement avec Anvirzel™ a également entraîné la production de progéniture de virus avec une capacité significativement réduite d'infecter les cellules cibles, et réduit de manière significative l'ineffectivité du virus produit à partir de cellules infectées. Cet effet anti-VIH novateur d'Anvirzel™/oléandrine a été observé à la fois contre les souches du VIH-1 tropiques pour les cellules T.

L'oleandrine est le composé principal d'Anvirzel™. Il est déjà connu par son activité antivirale sur le virus du sarcome aviaire en inhibant son ineffectivité *via* la réduction de la quantité de glycoprotéine de l'enveloppe virale **(Singh et *al*., 2013).**

## 2.2. Activité antidiabétique

Les extraits de différentes parties de *Nerium Oleander* sont utilisés comme remède antidiabétique dans les systèmes médicinaux traditionnels de différentes parties du monde.

**En 2015, Dey et *al*.,** ont démontré que l'extrait de feuille de *Nerium Oleander* possède une activité antihyperglycémique en réduisant de 73,79% le niveau de glucose dans le sang après 20 jours de traitement. La diminution du pourcentage de différents enzymes marqueurs dufoie était significative, ainsi que la diminution des niveaux de triglycérides et de cholestérol, démontrant une puissante activité antihyperlipidémique. L'activité de la peroxydase et de la catalase dans le foie, les reins et les muscles squelettiques a été significativement restaurée en plus de la réduction marquée de la peroxydation lipidique et de la normalisation du niveau de glycogène hépatique chez les souris alloxanisées **(Dey et *al*., 2015)**.

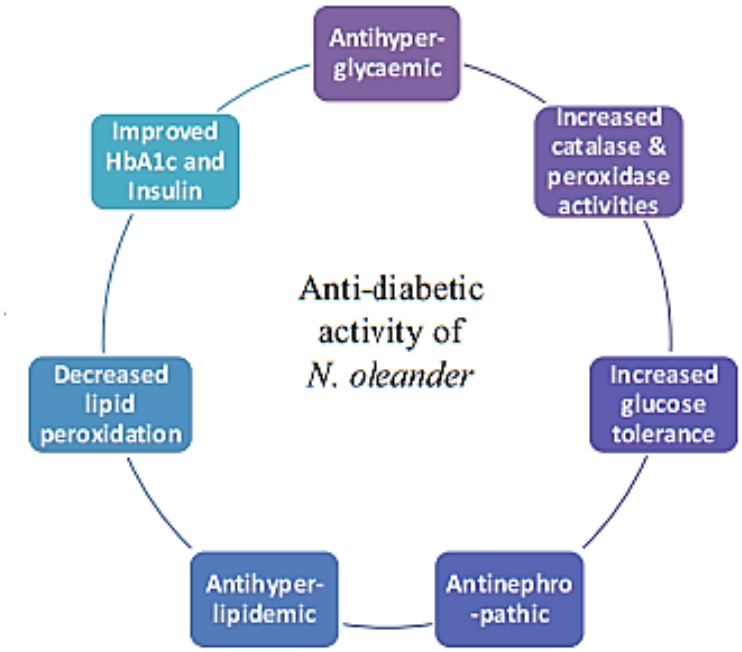



**Figure 3 :** Activité anti-diabétique de*Nerium Oleander*.

Dans une autre étude, l'extrait de *Nerium Oleander* a montré une activité comparable à celle du glimépiride sur la sécrétion de l'insuline, les niveaux de glucose et certaines activités des

enzymes hépatiques dans un modèle expérimental de rat diabétique induits par la streptozotocine **(Mwafy et Yassin, 2011)**.

**Dey et *al*., en 2019**, ont montré que l'extrait hydrométhanolique de tige et de racine de *Nerium Oleander* améliore la résistance à l'insuline chez les souris alloxanisées. Cela suggère que les extraits de tige et de racine de plante n'ont pas directement atténué la toxicité des cellules β pancréatiques induite par l'alloxane. Cependant, ils ont amélioré l'absorption du glucose médiée par une meilleure signalisation de l'insuline pancréatique et/ou à un meilleur métabolisme hépatique du glucose. Ces extraits limitent non seulement l'hyperglycémie aiguë et la résistance à l'insuline mais atténuent également les complications associées au diabète telles que la dyslipidémie et les lésions hépatiques et rénales **(Dey et *al*., 2019).**

## 2.3. Activité antioxydantes

L'activité antioxydant des extraits de *Nerium Oleander* est particulièrement due aux composés phénoliques connus par leur pouvoir neutralisant des radicaux libres.

Cette plante possède une activité antioxydante efficace, qui comprend le piégeage des radicaux libres et le pouvoir réducteur. Différents extraits de feuilles et de fleurs de *Nerium Oleander* ont montré différents niveaux d'activité antioxydante dans différents systèmes de test d'une manière dépendante de la concentration. L'activité antioxydante a été corrélée avec la quantité de contenu phénolique total présent dans les extraits respectifs dans chaque test **(Mohadjerani, 2012).**

Les extraits méthanoliques et aqueux des feuilles du *N. Oleander* contenant la plus grande quantité de phénols totaux, étaient les agents réducteurs les plus puissants, tandis que l'extrait acétonique a montré l'activité la plus faible. Les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs, présentent particulièrement une activité très puissante de réduction du radical DPPH. Cependant, Il est intéressant de noter que les extraits de feuilles ont montré une activité de piégeage du DPPH relativement élevée par rapport aux extraits de fleurs de *Nerium Oleander* **(Singhal et Gupta, 2012 ; Mohadjerani, 2012).**

Plusieurs recherches ont révélé que les extraits de *N. Oleander* possèdent un effet antioxydant *in vivo*. **Singhal et ses collaborateurs (2012)**, ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de la plante est avéré être un agent hépatoprotecteur ainsi qu'un antioxydant considérable qui possède la capacité d'inhibition de la peroxydation dans le foie (**Singhal et *al*., 2012).**

## 2.4. Activité anticancéreuse

La toxicité élevée des extraits de *N. Oleander*, suggèrent également qu'ils possèdent une activité anticancéreuse importante. Afin d'évaluer l'effet anticancéreux de cette plante plusieurs étudesexpérimentaleset même clinques étaient réalisées. L'activité antitumorale a été testée en tant que capacité d'inhibition de la croissance de la lignée de cellules de carcinome et le résultat obtenu a indiqué une augmentation progressive de l'activité antitumorale dépendante de la concentration des extraits de la plante **(Ali et *al*., 2010).**

**Al-Hakak et *al*. (2019),** ont montré que l'extrait alcoolique de *Nerium Oleander* a exercé un effet cytotoxique remarquable contre la lignée cellulaire du cancer du foie HEPG2. *In vivo*l'administration de 1ml/kg du même extrait à des souris Wistar albinos pendant 2 semaines a induit de nombreuses lésions tissulaires au niveau du foie. L'analyse histologique a révélé une distension focale des cellules du foie et des vaisseaux sanguins. Des biomarqueurs de la mort cellulaire programmée ainsi qu'une hémorragie sanguine contenant des granules d'hématoïdine jaunes ont été également constaté **(Al-Hakak et *al*., 2019)**.

Les cardénolides sont des composés majeurs des extraits aqueux de *N. Oleander*. **Rashan et ces collègues (2011),** ont rapporté que ces composés exercent des effets cytotoxiques sur des lignées cellulaires tumorales humaines gastrique (GXF 251L), pulmonaire (LXFA 629L, LXFL 529L), mammaire (MCF7, MAXF 401L), rénale (RXF 944L, RXF 486L), carcinome utérin (UXF 1138L), et mélanomes (MEXF 462NL, MEXF 514L). Ces composés ont altéré particulièrement la viabilité cellulaire et le cycle cellulaire (blocage à la phase G2/M ou à la phase S dans les cellules tumorales, respectivement). Les effets cytotoxiques sont induits principalement par l'inhibition de la Na+/K+-ATPase liée à la membrane plasmique **(Rashan et *al*., 2011 ; Cao et *al*., 2018)**.

Dans le cadre de la poursuite de la recherche sur l'activité antitumorale de l'extrait de *N. Oleander*, les capacités relatives de l'oleandrine et de l'oleandrigénine sur deux lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate DU145 et PC3 ont été examiné. **Smith et *al*. (2001)** ont rapporté que ces deux composés inhibent l'exportation du FGF-2 d'une manièr dépendante de la concentration et du temps par une interaction membranaire avec la protéine Na1 K1-ATPase. L'oléandrine produit des métaphases anormales qui pourraient être responsables en partie de la mort cellulaire. Il provoque une augmentation du calcium intracellulaire qui à son tour libère le cytochrome C mitochondrial, déclenchant ainsi le

mécanisme d'apoptose dépendant des caspases. En outre, l'oléandrine bloque l'activation du NF-kB dans les cellules tumorales.

La cytotoxicité et les dommages à l'ADN induits par l'extrait de *Nerium Oleander* étaient légèrement plus élevés dans les cellules dépourvues de BRCA2 (déficientes dans la réparation de la recombinaison homologue) que dans les cellules parentales ; ceci indique que l'induction de dommages à l'ADN peut également jouer un rôle dans la cytotoxicité de l'extrait. L'extrait de la plante a induit une inhibition marquée de la glycolyse dans les cellules A549, comparable à celle du dichloroacétate, un inhibiteur de la glycolyse actuellement en développement clinique pour le traitement du cancer **(Calderón-Montaño et *al*., 2013).**

Plusieurs scientifiques attribuent l'activité antiproliférative, l'inhibition de la migration cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire à l'extrait chloroformique de feuilles de *Nerium Oleander*. **Mohapatra et ces collèges (2021)** ont montré que l'extrait chloroformique des feuilles de *Nerium Oleander* contient des composés bioactifs potentiels qui inhibent la croissance des cellules cancéreuses cervicales HeLa *in vitro*. Cet extrait a particulièrement inhibé la migration cellulaire et a bloqué le cycle cellulaire en phase G2/M. De plus, l'expression du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et les niveaux de p-Rb phosphorylé (Ser780) ont été significativement diminué **(Mohapatra et *al*., 2021).**

Il est intéressant de noter que la cytoxicité de l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *Nerium Oleander* contre les lignées cellulaires cancéreuses est significativement plus élevée que celle contre la lignée cellulaire non maligne, avec une puissance et une sélectivité similaire à celles de l'anticancéreux cisplatine. De plus, le prétraitement des cellules A549 avec les antioxydants N-acétylcystéine et catalase a légèrement empêché la cytotoxicité de l'extrait, suggérant ainsi que la formation d'espèces réactives de l'oxygène participe à son activité cytotoxique mais ne joue pas un rôle majeur. **(Calderón-Montaño et *al*., 2013).**

On outre des études expérimentales, les extraits de *N. Oleander* ont présenté des effets anticancéreux remarquables dans des études cliniques. Les résultats obtenus chez des patients atteints de cancer du poumon sont prometteurs et soutiennent le possible avancement dans les essais cliniques de phase II pour le traitement de ce type de cancer **(Calderón-Montaño et *al*., 2013).**

# SECTION II :

# ETUDE PRATIQUE

# Chapitre I.

# Matériel et méthodes

# 1. Matériel

Le matériel expérimental et les réactifs utilisés durant le travail pratique sont rapportés en (Annexe1).

## 1.1. Matière végétale

Le matériel végétal représenté par les feuilles et les fleurs de la plante *Nerium Oleander* a été récolté en mois de Mai 2022 au campus de l'université de Mouhamed Sedik ben Yahia de la Wilaya de Jijel.

# 2. Méthode

## 2.1. Séchage et broyage

Une fois récoltées, les fleurs et les feuilles ont été lavées à l'eau distillée etséchées par l'étuve bien réglé à 45 C° pour éviter la perte des substances actives. Après le séchage les feuilles et les fleurs ont été broyés séparément dans un broyeur et conservées à l'ombre chacune dans des petites boites de pétri en verre, étiquetées et conservés jusqu'à utilisation ultérieure**.**

## 2.2. Préparation des extraits de plante

### 2.2.1. Préparation des extraits brutes méthanolique des feuilles et fleures par macération

La macération est une méthode traditionnelle couramment employée. Elle consiste à la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Dans cette méthode on utilise des quantités considérables de solvants. En plus, elle se déroule à températureambiante, ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules **(Budić-Leto et *al*.,2005).**

Dans la présente étude, 3 g du matériel végétal ont été peséet macéré dans 150 ml du méthanol pur avec agitation pendant 24 heures à température ambiante. Après filtration avec papier Wattman n° 3, le macérat a été évaporé sous vide à 55 C°. L'extrait sec a été pesé et conservé à l'ombre à 4 C° jusqu' à utilisation ultérieure.

### 2.2.2. Extraction des alcaloïdes des feuilles et fleures du *Nerium Oleander*

#### 2.2.2.A. Extraction liquide-liquide par le solvant organique en milieu alcalin (chloroforme)

L'extraction a été effectuée suivant la méthode de **(Ramawat et *al*.,2000)** avec modifications. 3g du matériel végétal ont été pesé et macéré dans 150 ml du méthanol pur avec agitation pendant 24 heures à température ambiante. Après filtration avec papier Wattman n° 3,

le macérat a été évaporé sous vide à 55 C°. Ensuite, l'extrait sec a été traité avec 40 ml du $H_2SO_4$à 1 %. L'extraction a ensuite été effectuée dans 30 ml de chloroformeen utilisant une ampoule à décanter. La phase organique de chloroforme a été rejetée et la phase aqueuse a été basifiée avec $NH_4OH$ à 30 % (pH = 9-10). Encore, l'extraction a été faite dans 20 ml de chloroforme et la phase organique du chloroforme a été recueillie dans un ballon. L'extraction a étérépété avec du chloroforme frais et séché sousvide. L'extrait sec a été pesé et conservé à l'ombre à 4 C° jusqu' à utilisation ultérieure.

#### 2.2.2.B. Extraction par l'alcool acidique

L'extraction a été effectuée suivant la méthode de **(Khan et *al*.,2010)** avec modifications.3,0 g de poudre ont été macéré dans 100 ml d'acide acétique à 20 % dans de l'éthanol pendant 4h. Ensuite, une filtration a été réalisée et l'extrait a été concentré sur un bain-marie au quart du volume d'origine. En suite, de l'hydroxyde d'ammonium concentré ($NH_4OH$) a été ajouté goutte à goutte pour compléter la précipitation. On a laissé la solution se déposer. Le précipité a été recueilli par filtration et pesé. L'extrait sec a été pesé et conservé à l'ombre à 4 C° jusqu' à utilisation ultérieure.

## 2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement des différentes extractions est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R\ (\%) = [M1 / M0] \times 100$$

**R %** : Rendement des extraits.

**M1** : Masse de l'extrait sec obtenu exprimée en g.

**M0** : Masse initial de l'organe de la plante séché exprimée en g.

## 2.4. Caractérisation phytochimique et activité antioxydante

## 2.4.1. Caractérisation phytochimique

#### 2.4.1.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu **(Singleton et *al*.,1999).** Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique.

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés **(Boizot et Charpentier,2006).**

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **Singleton et Rossi, (1965).** En y apportant quelques modifications.

La préparation du milieu réactionnel qui possède un volume de 0,2 ml de chaque extraita été ajouté à un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu (10% Folindilué dans l'eau distilleé) et incubé 15min à température ambiante. Puis, 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium ($Na_2CO_3$ à 7 %) et 3 ml de $H_2O$ont été ajouté. Les tubes ont été agités et conservés pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance était lue à 765 nmcontre un blanc préparé dans les mêmes conditions**.** Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (1mg/ml ;0,4mg/ml ;0,2 mg/ml et 0,1mg/ml). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme de matière sèche (µg EAG/ mg) (Annexe 2).

**2.4.1.2. Dosage des flavonoïdes**

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl3) cité par **Djeridane et *al.*, (2006),** a été utilisée pourquantifier le contenu en flavonoïdes des extraits étudiés. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (-OH) libre, en position 5 qui estsusceptible de former avec son groupement -CO et le chlorure d'aluminium un complexe coloré. L'apparition de la couleur jaune indique la formation de ce complexe. Ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deuxoxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons **(Ribéreau-Gayon, 1968).**

Le milieu réactionnel était constitué de 0,5 ml de chaque extrait ou de la quercétine a une gamme de concentration de (5 ug/ml ; 10 ug/ml ; 25 ug/ml ; 50 ug /ml ;75 ug/ml ; 100 µg/ml ; 200 µg/ml) et 0,5 ml de la solution d'$AlCl_3$(2 % préparé dans l'éthanol). Après une heure d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 420$ nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La quantification des flavonoïdes totaux a été établie en fonction d'une courbe d'étalonnage établis par la quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de matière sèche (µg Quer/ mg) (Annexe 3).

#### 2.4.1.3. Dosage des alcaloïdes

Le dosage des alcaloïdes a été réalisé selon la méthode de **(Duriket *al*.,1950)** avec modifications. 0,3 ml de chaque extrait ou de la nicotine commealcaloïde standard ont été ajouté à 2,5 ml de tampon phosphate (pH 5,3) et 2,5 ml du pourpre de bromocresol (0,5 mg/ml). Le mélange a subi une série d'extractions successives par le chloroforme (0,5 ml, 1 ml et 1,5 ml). Les phases chloroformiques obtenues ont été accumulées et extraites avec 3 ml de NaOH 0,05M. La phase aqueuse a été récupérée, et l'absorbance a été lu à 470nm.

La quantification des alcaloïdes totaux a été établie en fonction d'une courbe d'étalonnage établie par la nicotine comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la nicotine par milligramme de matière sèche (µg nicotine/mg) (Annexe 4).

### 2.4.2. Activité antioxydante

#### 2.4.2.1. Test de la capacité antioxydante totale (TAC) (réduction de molybdate d'ammonium)

La capacité antioxydant totale (TAC) des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO42- à molybdène Mo (V) MoO2+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide **(Ahmad et *al*.,2013).**

Bref, un volume de 0,1 ml de chaque extrait méthanolique à différentes concentrations ou de l'acide ascorbique comme référence ont été mélangé avec 1 ml de solution du composée de 0,6 M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes ont été incubés à 95C° pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 765 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en absorbance en fonction de concentration. A partir des courbes obtenus les concentrations correspondantes à l'absorbance 0,50 pour l'acide ascorbique et les différents extraits ont été également calculé.

#### 2.4.2.2. Test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α, α-diphényl-β-picrylhydrazyle) DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant **(Blois, 1958).** Il possède un électron non apparié sur un atomedu pont d'azote **(Popovici et *al*., 2009),** la structurechimique de radicale libre DPPH présentés dans la figure 4**.**

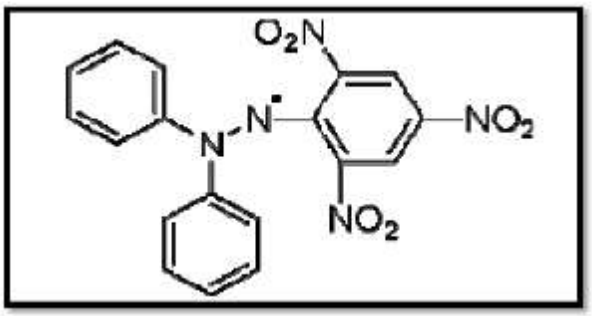



**Figure 4 :** Structure chimique de radicale libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) **(Atmani et *al*.,2009).**

La réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm provoquée par les antioxydants**(Molyneux, 2004).**En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPHde couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune **(Maataoui, 2006),** laréaction de test DPPHprésentésselon la figure 5.

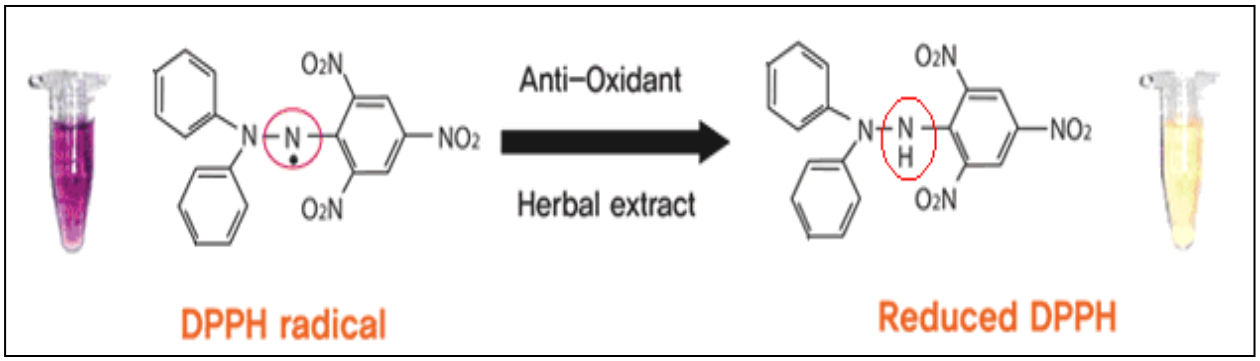



**Figure 5** : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).

La capacité de piégeage du radical libre (DPPH) a été mesurée comme elle a été décrite par **Brand et *al*., (1995).** Le DPPH a été fraichement préparé par solubilisation de 1,6 mg de DPPH dans 75ml du méthanol avec une agitation pendant 30 min à l'obscurité.

0,1 ml de chaque extrait ou de l'acide ascorbique (comme antioxydant de référence) à différentes concentrations ont été ajouté à 0,9ml de la solution méthanolique de DPPH et incubé pendant 45min à l'abri de la lumière. Après agitation, la lecture de l'absorbance a été faite au spectrophotomètre à 515nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité en fonction de concentration, calculés selon l'équation suivante :

**% Activité= (Densité optique de blanc- Densité optique de l'échantillon/ Densité optique de blanc)X 100**

A partir des équations des courbes obtenues, la concentration correspondante à 50 % de l'effet (EC50) a été également calculée.

### 2.4.2.3. Test de FRAP (Test de la réduction du fer/ Ferricreducing-antioxidant power)

Le pouvoir réducteur du fer ($Fe^{3+}$) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **OYAIZ (1986)**, **(BOUGANDOURA, 2013).** La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (**OU et *al*., 2001)** selon la figure 6.

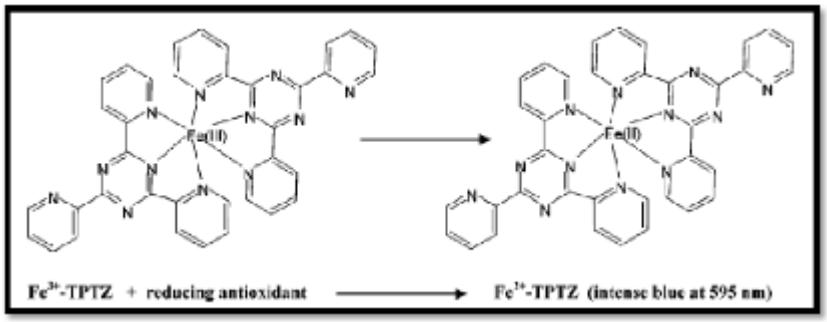



**Figure 6 :** Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferricreducingantioxidant power) **(PRIOR et *al*., 2005).**

Bref, 100µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide ascorbique comme référence ont été ajouté à 0,15ml de tampon phosphate (0 ,2 M, pH 6,6) et 0,25ml de fercianide (1%) et incubés à 50 C° pendant 20 min. Après incubation, 0,35 ml du TCA 10% ont été ajoutéet centrifugé à 3000 g pendant 10 min. 0,25 ml du surnagent obtenu ont été centrifugés et ajouté à 0,5ml de FeCl3 1% et 4 ml de $H_2O$ puis l'absorbance a été mesuré immédiatement à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en absorbance en fonction de concentration. A partir des courbes obtenus les concentrations correspondantes à l'absorbance 0,50 pour l'acide ascorbique et les différents extraits ont été également calculé.

## 2.5. Tests de Cytotoxicité

### 2.5.1. Test d'induction de la trypsine

La capacité des extraits à induire l'activité de la trypsine a été évalué selon la méthode de **(Mohan et *al*., 2018, Truong et *al*.,2019)** avec modifications. Le milieu réactionnel a été constitué de 0,2 ml de TP (150 mM, pH 7,4), 0,2 ml de différents extraits ou de méthanol pour le control et 0,4ml de la trypsine à la concentration de 1mg/ml. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 min à 37C°. A la fin de l'incubation, 0,8 ml de la caséine (1% diluée dans l'eau

distillé et incubée préalablement à 100C° pendant 90min), ont été ajouté et incubé une deuxième fois pendant 30 min à 37C°. A la fin de l'incubation0,5 ml de TCA 10% ont été ajouté pour stopper la réaction. Le mélange a été centrifugé pendant 15 min à 10000g pour faire précipiter les grandes molécules. La DO du surnageant contenant seulement les acides aminés a été mesuré par spectrophotomètre à 280nm.

**% Activité d'induction = (Densité optique del'échantillon - Densité optique de control/ Densité optique del'échantillon) X 100.**

## 2.5.2. Test de dénaturation des protéines (BSA)

La capacité de dénaturation des protéines de différents extraits a été étudié sur le BSA en utilisant le HcL comme agent dénaturant de référence selon la méthode de **(Sava et *al*.,2021)** avec modifications.

1ml de BSA 1% (préparée dans le NaCl 0,9 %) ont été ajouté à 0,1 ml des extraits à différentes concentrations ou de l'HcL 10mM comme agent dénaturant. Le volume a été complété à 6ml par l'NaCl 0,9%. Le mélange a été incubé 2h à 37C° suivi par la lecture de la DO à 439 nm. Un control contenant du méthanol au lieu des substances testées a été également préparé dans les mêmes conditions.

Le pourcentage de dénaturation des protéines est calculé selon la réaction suivante :

**%de dénaturation de BSA = (Densité optique del'échantillon - Densité optique de control / Densité optique de control) X 100.**

## 2.5.3. Peroxydation lipidique

La capacité des différents extraits à induire la peroxydation lipidique été évaluée*in vitro*selon le protocole de **(Sharma et *al*., 2016)** avec modifications.

Le foie utilisé dans cet essai provenait de rat *Wistar* albinos adulte et sain, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, (Algérie). Le sacrifice du rat a été réalisé au niveau de l'animalerie de l'université de Jijel en utilisant le chloroforme comme agent anesthésique. La dissection a été réalisée immédiatement après le sacrifice sur la glace. Le foie a été prélevé et préservé à -20 C° jusqu'à utilisation ultérieure.

Pour la préparation de l'homogénat du foie, 1g du foie a été rincé, homogénéisé et broyédans 10 volumes de tampons phosphate froid (150mM, pH 7,4, KCl 1,5%). L'homogénat a

été centrifugé à 800 g pendant 315 min. Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé comme matrice biologique pour l'induction de la peroxydation lipidique *in vitro*.

Pour tester le pouvoir d'induction de la peroxydation lipidique par les extraits de *N. Oleander,* 0,1 ml de chaque extrait à différentes concentrations ont été ajouté à 0,6 ml de tampon phosphate et 0,5 ml de l'homogénat de fois préalablement préparé. Un control positif contenant le FeCl3 20mM au lieu des extraits (agent inducteur de peroxydation lipidique de référence) a été préparé. Un control contenant 0,1 ml du méthanol au lieu des extraits a été également préparé dans les mêmes conditions. Le milieu réactionnel a été incubé dans un bain marie à 37C°pendant 2h. A la fin de l'incubation, 0,5 ml de TBA 57% préparé dans le TCA ont été ajouté au milieu réactionnel. Le mélange a été incubé une deuxième fois à 95C° pendant 90 min et centrifugé à 800g pendant 15min. L'absorbance du surnageant obtenu a été lu à la longueur d'onde 535nm.

Le pouvoir de l'extrait brut à inhiber la peroxydation lipidique a été évaluée séparément suivant le même protocol en utilisant le FeCl3 comme agent inducteur de la peroxydation et la quercétine comme agent antioxydant de référence. Ainsi le milieu réactionnel a été constitué de 0,1 ml de l'extrait brut ou de la quercétine 1mg/ml, ajouté à 0,5 ml de tampon phosphate, 0,5 ml de l'homogénat et 0,1ml de FeCl3 20mM.

Le pourcentage d'induction de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante **:**

**% d'induction de la peroxydation lipidique = (Densité optique del'échantillon - Densité optique de control / Densité optique de l'échantillon) X 100.**

## 2.5.4. Inhibition de la prolifération cellulaire

La capacité des différents extraits à inhiber la prolifération cellulaire a été évalué *in vitro* sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*selon la méthode de **(Yamashoji et *al*., 2020)** avec modifications.

Des cellules de levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*ont étaientutilisées dans cet essai. Les cellules ont été cultivées dans un tube à essai rempli de milieu nutritionnel (glucose à 2 %,1 % de peptone et 0,5 % d'extrait de levure) à 30 C° pendant 15 h. Le tube à essaia été dégazé et scellé pendant la culture et agité de temps en temps. A la fin de la période de l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois à l'eau distillée par centrifugation, et l'absorbance de la suspension de cellules de levure a étéajusté à 1,6 à 600 nm avec du milieu nutritionnel.

1,5 ml de la suspension de levure a été incubé avec 50µl ou 100µl de chaque extrait ou de NaCN (1mg/ml) comme agent cytotoxique de référence. Un tube control a été préparé dans les même conditions et contenant que le méthanol au lieu des extraits. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 48 h à température ambiante. La lecture de DO a été effectué à différentes points de temps (2h, 5h, 48h) à 600nm.

Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire a été calculé selon l'équation suivantes: **% d'inhibition de la prolifération cellulaire= (Densité optique decontrol - Densité optique de l'échantillon/ Densité optique de control) X 100.**

## 3. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ±standard d'erreur (SD). Une analyse statistique a été réalisée par le test ANOVA suivi par une multicomparaison t-student par rapport au groupe de référence. Le degré de signification a été déterminé à ($P<0,05$). Les logiciels Excel et Graph Pad ont été utilisé pour la réalisation des différentes calcules et tests statistiques.

جامعة محمد الصديق بن يحيى
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة

# Chapitre II.

# Résultats et discussion

## 1. Rendement de l'extraction par macération

Les extraits bruts des feuilles et fleurs ont été préparés par macération dans le méthanol, alors que l'extraction des alcaloïdes a été effectué par l'éthanol acidique ou par le chloroforme. Les rendements des différentes extractions sont présentés dans le tableau (3) et figure 7.

**Tableau3:** Rendement de différentes méthodes d'extraction des feuilles et fleurs de *Nerium Oleander*.

| Echantillon | | Masse initial (g) | Masse final (g) | Rendement (%)± Ecart type |
|---|---|---|---|---|
| Feuilles | Extrait brut | 2,75 | 0,90 | 40%± 20,5 |
| | Extrait chloroformique | 2,66 | 0,17 | 6,4%± 1,33 |
| | Extrait avec acide acétique | 3 | 1,79 | 60% |
| Fleur | Extrait brut | 1 | 0,295 | 29,5%±1,5 |
| | Extrait chloroformique | 1 | 0,13 | 13% |

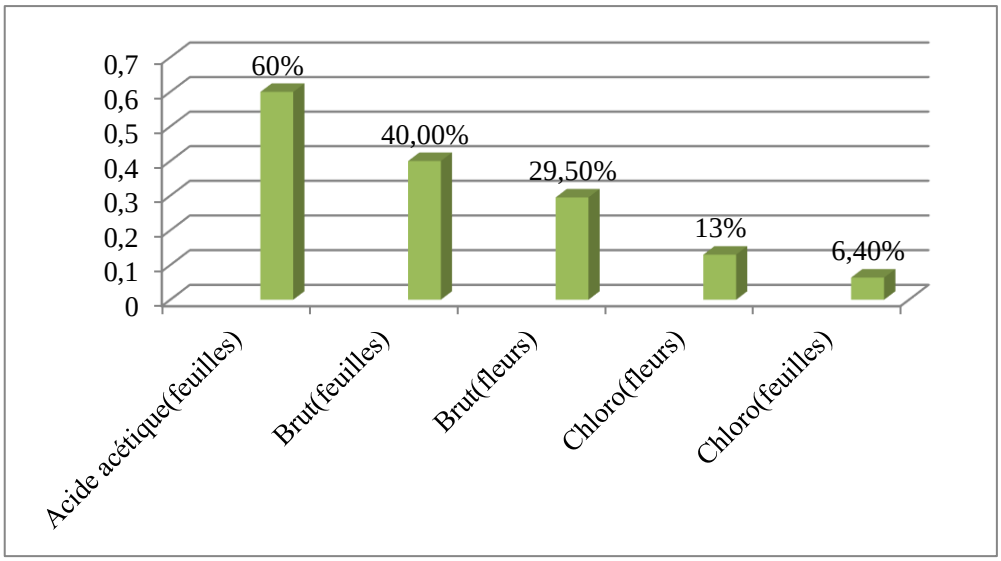



**Figure 7 :** Rendement des extraitsméthanolique feuilles (n= 4) et fleurs (n=2), acétique (n=1) et chloroformique des feuilles (n=3) et fleurs (n=1) de *Nerium Oleander*.Les résultats sont exprimés en moyenne ± ecart type.

Il existe une différence entre les valeurs de rendement d'extraction *Nerium Oleander* dans cette étude. La plus grande valeur revient àla méthode d'extraction par l'éthanol acétique (60 %),

tandis que les extraits chloroformiques feuilles et fleurs ont présenté les moins valeurs, (6,4%±1,33) et 13% respectivement.

D'autre part, l'extrait brut feuille (40%±20,5) à une valeur élevée par rapport à l'extrait brut fleur (29,5%±1,5) indiquant ainsi que les feuilles sont plus riches en métabolites que les fleurs.

## 2. Teneurs en polyphénols totaux

Les concentrations des polyphénols totaux des différents extraits sont calculés à partir des équations de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Y=0,004 X - 0.013) où Y représente l'absorbance et X représente la concentration. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme de l'extrait (µg EAG/mg d'extrait). Les résultats sont présentés sur le tableau 4.

**Tableau 4 :** Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Nerium Oleander* (n=1).

| Les extraits | Polyphenols totaux en ug EAG/mg d'extraits |
|---|---|
| Brut feuille | 398,25 |
| Brut fleur | 79,5 |
| Extrait éthanolique avec l'acide acétique feuille | 3,3 |
| Extrait chloroformique feuilles | 0,82 |
| Extrait chloroformique fleurs | ND |

Le tableau (4) montre que l'extrait brut des feuilles possède la plus haute teneur en polyphénols(398,25µgEAG/mg), suivi par l'extrait brut fleurs (79,5µg EAG/mg) et l'extrait chloroformique fleur est notée comme non définie(ND). Au contraire, **Mohadjerani**, **(2012)** a rapporté dans son étude que le contenu phénolique des fleurs de *NeriumOleander* était supérieur à celui des feuilles.

Les extraits acétique et chloroformique dans cette étude n'ont présentéque des traces des polyphénols par rapport aux extraits methanoliques, (3,3µg EAG/mg) et (0,82µg EAG/mg) respectivement. Selon **Redha, (2020),** la quantité de contenu phénolique total est plus élevée dans l'extrait méthanolique pour les feuilles et les fleurs respectivement. Le méthanol est parmi lessolvants les plus efficaces pour l'extraction du contenu phénolique des feuilles et des fleurs de

*Nerium Oleander*, respectivement. Ceci est en accord avec les rapports dans la littérature indiquant que le méthanol est un solvant largement utilisé et efficace pour l'extraction des phénols qui sont habituellement polaires. En effet, la force du méthanol peut provoquée l'extraction même des composés phénoliques peu polaires.

## 3. Teneurs en flavonoïdes totaux

Les concentrations des flavonoïdes totaux des différents extraits sont calculées à partir des équations de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (Y= 0,030X +0.003), (Y=0,015X+0 .006) où Y représente l'absorbance et X représente la concentration.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la quercétine par un milligramme de l'extrait (µg EQ/mg d'extrait). Les résultats sont présentés sur le tableau (5).

**Tableau 5 :** Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Nerium Oleander* (n=2).

| Les extraits | Flavonoïdes totaux en µg EQ/ mg d'extrait |
|---|---|
| Brut feuilles | 29,86±11,86 |
| Brut fleurs | 18,13±0,6 |
| Extrait éthanolique avec l'acide acétique feuille | 0,83±0,17 |
| Extrait chloroformique feuilles | 0,0037 |
| Extrait chloroformique fleur | ND |

On constate que les teneurs en flavonoïdes suivent le même ordre queles teneurs en polyphénols dont l'extrait brut des feuilles possède la plus haute teneur (29,86±11,86µg EAG/mg), suivi par l'extrait brut fleurs (18,13±0,6µg EAG/mg),alorsque les extraits acétique et chloroformique ne contiennent que des traces, (0,83±0,17µg EAG/mg) et (0,0037µg EAG/mg) respectivement, et l'extrait chloroformique fleur est notée comme non définie (ND).La propriété polaire du méthanol a permis d'extraire une quantité considérable de flavonoïdes qui sont également des composés polaires. La force du méthanol peut avoir également permis d'extraire des composés flavonoïdes moins polaires **(Redha, 2020).**

## 4. Teneurs en alcaloïdes totaux

Les concentrations des alcaloïdes totaux des différents extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la nicotine (Y= 0,0005X - 0,0007) où Y représente l'absorbance et X représente la concentration.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de lanicotine par un milligramme de l'extrait (µg EAG/mg d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des alcaloïdes totaux contenus dans les échantillons de *Nerium Oleander.*

**Tableau 6 :** Teneur en alcaloïde totaux dans les différents extraits de *NeriumOleander* (n=1).

| Les extraits | Alcaloïdes totaux en ugEnico/mgd'extrait |
|---|---|
| Brut feuille | 274,6 |
| Brut fleur | ND |
| Extrait éthanolique avec l'acide acétique feuille | 1,48 |
| Extrait chloroformique de feuille | 2,51 |
| Extrait chloroformique de fleur | 0,98 |

Le tableau (6) montre que l'extrait brut feuille possède la plus haute teneur en alcaloïdes (274,6ugEAN/mg)par contre l'extrait brut fleur est notéecomme non définie (ND), suivi par l'extrait chloroformique de feuilles (2,51 ugEnico/mg), puis par l'extrait d'acide acétique des feuilles(1,48ugEnico/mg), enfin par l'extrait chloroformique de fleur (0,98ugEnico/mg).

Les résultats ont confirmé que les feuiles possèdent la plus grande quantité des alcaloïdes par rapport à les fleurs qui marqué juste des traces car les feuilles riches en des métabolites secondaires.

## 5. Le test de piégeage du radical DPPH

Les valeurs de pourcentage de pouvoir anti radicalairedu radical DPPH par l'extrait brut, chloroformique, l'extrait d'acide acétique, et l'acide ascorbique comme standard à différentes concentrations sont présentées sur la figure (8).

Nous avons déterminé également pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH (EC50). Les résultats sont présentés sur le tableau (7).

**Tableau 7 :** Le pouvoir antioxydant (exprimé par IC50en ug/ml) des antioxydants de références et des extraits testés(n=2).

| Echantillon | EC50±Ecart type (En ug/ml) |
|---|---|
| Acide ascorbique | 4,12±0,06 |
| Brut (feuilles) | 3,22±0,007 |
| Acide acétique | 50,86±3,07 |
| Chloroformique(feuilles) | 464,59±122,15 |

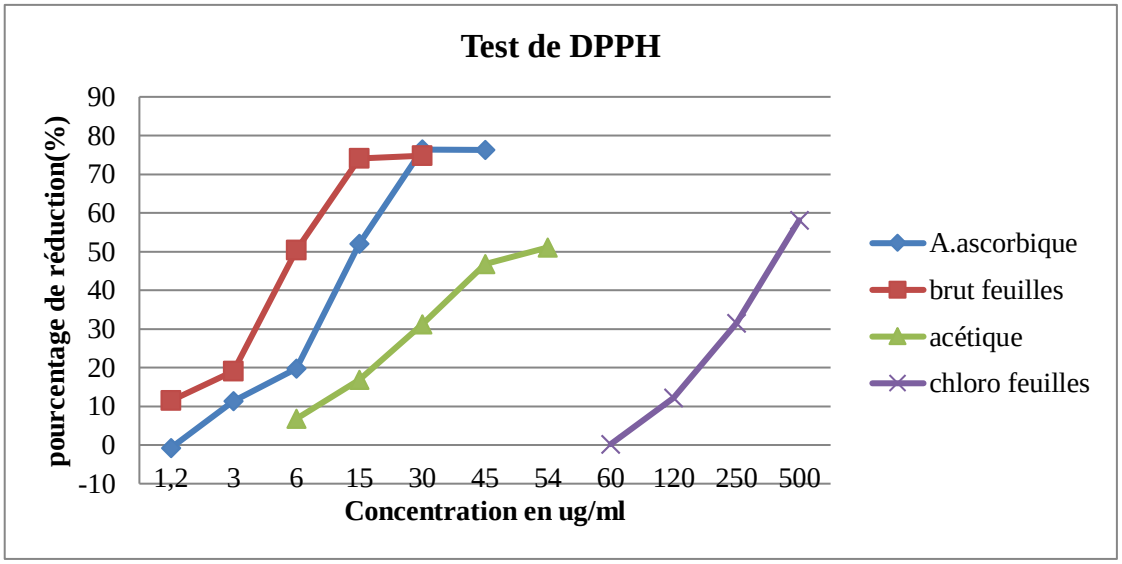



**Figure 8:** Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'extrait brut, chloroformique, l'extrait d'acide acétique, et l'acide ascorbique à différentes concentrationsLes résultats sont exprimés en moyenne±ecart type (n=2).

D'après les résultats de la figure (8) on constate que le pouvoire anti radicalaire de l'acide ascorbique et de l'extrait brut sont comparables. L'acide ascorbiquea présenté une activité de réduction de DPPH maximale (76,27% ±0,10) à la concentration de 45ug/ml et une EC50=4,12±0,06, tandis que l'extrait brut a présenté une activité maximale (74,78%±0,53) à la concentration de 30ug/ml et une EC50=3,22±0,007. L'activité de l'extrait acétiques était moins importante ou on a enregistré une activité maximale (51,07%±4,87) à la concentration de 54ug/ml et une EC50=50,86±3,07.

D'autre part l'activité de l'extrait chloroformique est presque négligeable par rapport à l'activité des autres extraits, ou l'activité maximale enregistrée était (58,11%±15,07) à la concentration de 500ug/ml et une EC50=464,59±122,15.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Mohadjerani, (2012).** Ces derniersont rapporté que les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Nerium Oleander* qui contenaient les plus grandes quantités de composés phénoliques totaux, se sont avérés être les piégeurs de radicaux les plus actifs, suivis des extraits aqueux de méthanol et d'acétone. Les extraits éthanoliques de *N. Oleander* ont également été étudiés pour leur activité antioxydante par le test de piégeage du DPPH. Les résultats ont clairement montré que l'extrait éthanolique possède un pouvoir antioxydant comparable à celui de standard ce qui explique en partie l'activité antioxydante considérables de l'extrait acétiques enregistrée dans la présente étude ou on a utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction.

Il est intéressant de noter que toutes ces études ont rapporté que l'activité antioxydante élevé de *N. Oleander* est principalement dû à la présence et à la diversité des composés phénoliques dans la plante. Les principaux composés phénoliques rapportés dans *N. Oleander* sont la rutine, la catéchine, l'épicatéchine, la quercitine et l'acide quenonique, et sont rapportés à la fois dans les feuilles et les fleurs. Il est largement admis que les composés phénoliques ont une forte activité antioxydante, y compris le piégeage des radicaux libres et le pouvoir réducteur **(Mouhcine et *al*.,2019).**

## 6. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : FerricbReducing Antioxydant Power)

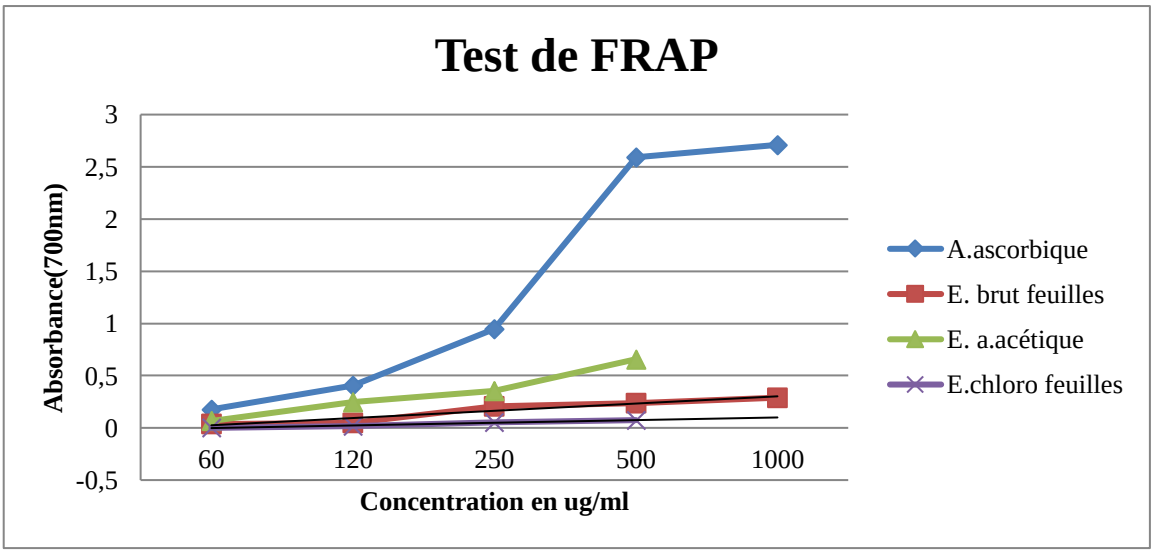



**Figure 9 :** Pouvoir réducteur de fer des extraits à différentes concentrations par la méthode FRAP (n=1).

A partir des résultats obtenus de la figure (9), on remarque que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation à la concentration des extraits. Cependant, les résultats obtenus montrent que la capacité des extraits à réduire le fer est négligeable par rapport à celle de l'acide ascorbique. A la concentration de 500 ug/ml, l'acide ascorbique a présenté une absorbance de 2,6 (nm), alors que l'extraitbrut et acétique des feuilles a présenté des absorbances inferieurs à 0,5(nm). L'absorbance de l'extrait chloroformique dans la même concentration était négligeable.

Le pouvoir réducteur des composés bioactifs est associé à l'activité antioxydante. Les extraits méthanoliques et aqueux des feuilles contenant la plus grande quantité de phénoliques totaux, étaient les agents réducteurs les plus puissants, tandis que l'extrait acétique contenant qui a montré la plus petite quantité de contenu phénolique, était le plus faible dans l'activité **(Mohadjerani, 2012).**

## 7. Capacité antioxydante total (Test de réduction de molybdate d'amoniume)

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO42- à molybdène Mo (V) MoO2+ en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V) à un pH acide **(Prieto et *al.*, 1999)**. On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant.

**Tableau 8 :** La capacité antioxydante totale qui correspondent l'absorbance à 0,5 nm.

| Les extraits testés | [C]±Ecart type (ug/ml) qui correspondent à DO=0,5nm |
|---|---|
| Acide ascorbique | 1,87±0,12 |
| E. brut (feuilles) | 6,13±0,29 |
| E. brut (fleur) | ND |
| E.A.acétique | 4,60±0,39 |
| E.chloroformique feuille | ND |
| E.chloroformique fleurs | ND |

L'utilisation du dosage du phosphomolybdène, qui est une méthode quantitative pour évaluer la capacité antioxydante hydrosoluble et liposoluble (capacité antioxydante totale)

**(Mohadjerani, 2012)** montre que les extraits ont présenté des différents niveaux d'activité de manière concentration dépendante.

D'après les résultats obtenus (tableau 8), on remarque que l'acide ascorbique atteignaitl'absorbance 0,5nm à la concentration de (1,87 ± 0,12ug/ml). L'extrait brut et acétiques ont atteignaitcette absorbance aux concentrations de (6,13±0,29ug/ml et 4,60±0,39ug /ml) respectivement, pour l'extrait chloroformique (feuille, fleur) et l'extrait brut (fleur)sont notées commes nons définies (ND). Ce qui reflète une activité antioxydante totaleproche à celle de l'acide ascorbique. Il est intéressant de noter que l'extrait acétique a présenté une teneur faible en polyphénols. On suggère alors qu'il contenait des métabolites d'autres familles qu'ils lui conféraient cette activité.

## 8. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un important paramètre du stress oxydatif et un biomarqueur principal de lésion cellulaire **(Singhal et Gupta,2012)**.

La figure (10) présente le pourcentage de la peroxydation lipidique induite in vitro par les extraitsacétique et chloroformique en comparaison avec le FeCl3.

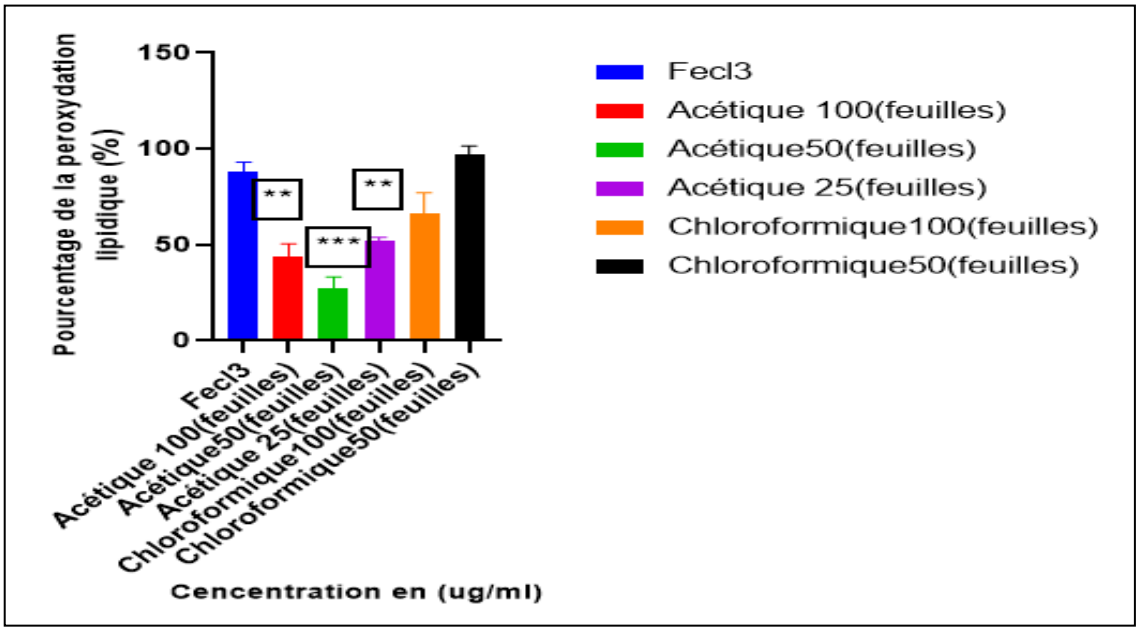



**Figure 10 :** Pourcentage de peroxydation lipidique induite par FeCl3, l'extrait chloroformique, et l'extrait acétique, à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en moyenne±ecart type(n=2).

D'après les résultats obtenus on constate que les extraits acétique et chloroformique induisaient la peroxydation lipidique *in vitro*. Bien que l'effet peroxydant de l'extrait acétique était significativement inférieur à celui de FeCl3 (P<0,05), l'extrait chloroformique aux concentration 50µg/ml et 100µg/ml a présenté un effet statistiquement similaire à l'effet peroxydant de FeCl3, (97,32%±4,19 ; 66,50%±10,59 et 87,78%±5,34) respectivement et les extraits acétique (25ug/ml, 50ug/ml,100µg/ml) (52,15%±1,61 ; 27,45%±5,88 ; 44,08%±6,45) respectivementl'extrait acétique (25ug/ml,100µg/ml) était significativement inférieur à celui de FeCl3 (P<0,01) et acétique 50ug/ml (P<0,001) .

Vu que l'extrait brut méthanolique est riche en composés phénolique, on a vérifié sa capacité à inhiber la peroxydation lipidique induite par le FeCl3en utilisant la quercétine comme référence. Selon la figure 11 on constate que la quercétine a inhibé significativement la peroxydation lipidique (21,37 % ±2,29) induite par le FeCl3 (P<0,01), par contre l'extrait brut incubé avec l'FeCl3 (72,13% ±8,01) n'a pas affecté l'effet peroxydant de FeCl3 malgré sa richesse en composés phénoliques.

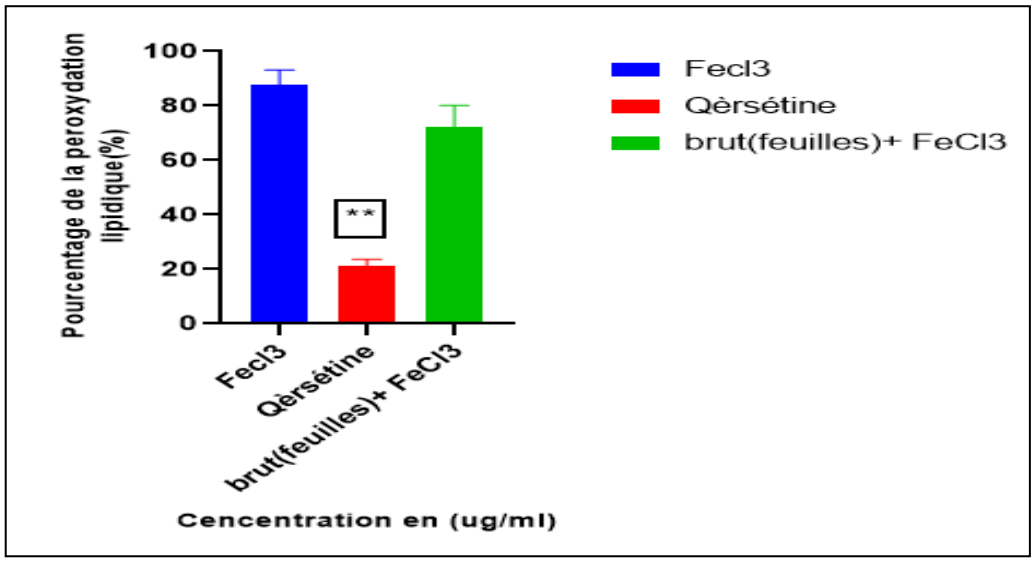



**Figure 11 :** Pourcentage de peroxydation lipidique par FeCl3, la quèrcitine, l'extrait brut (n=2).

D'après les résultats on constate que l'extrait brut n'est pas inhibés la peroxydation lipidique par l'FeCl3 malgré sa richèsse on polyphénols. Cela est dû au fait que l'extrait contient plusieur molécule cytotoxique et antioxydante et dans ce cas selon les mécanismes utilisée les molécules antioxydante elles se font une action antagonisme sur les molécules cytotoxiques.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Alhazmi et *al*., (2021)**. L'extrait ethanolique de *Nerium Oleander* a induit une peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie de rat Wistar via la production des d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une autre étude également rapportait que l'extrait de *NeriumOleander*a provoquédeslésions histopathologiques dans le tissu hépatique **(Alhazmi et *al*., 2021).** Par contre, **Singhal et Gupta (2012)** ont rapporté que l'extrait metahnolique de *Nerium Oleander* a exercé un effet hepato-protecteur contre la toxicité induite par le CCL4 chez le rat, notamment par l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Singhal et Gupta ,2012).**

## 9. Effet des extraits de *Nerium Oleander*sur la dénaturation de la protéine BSA

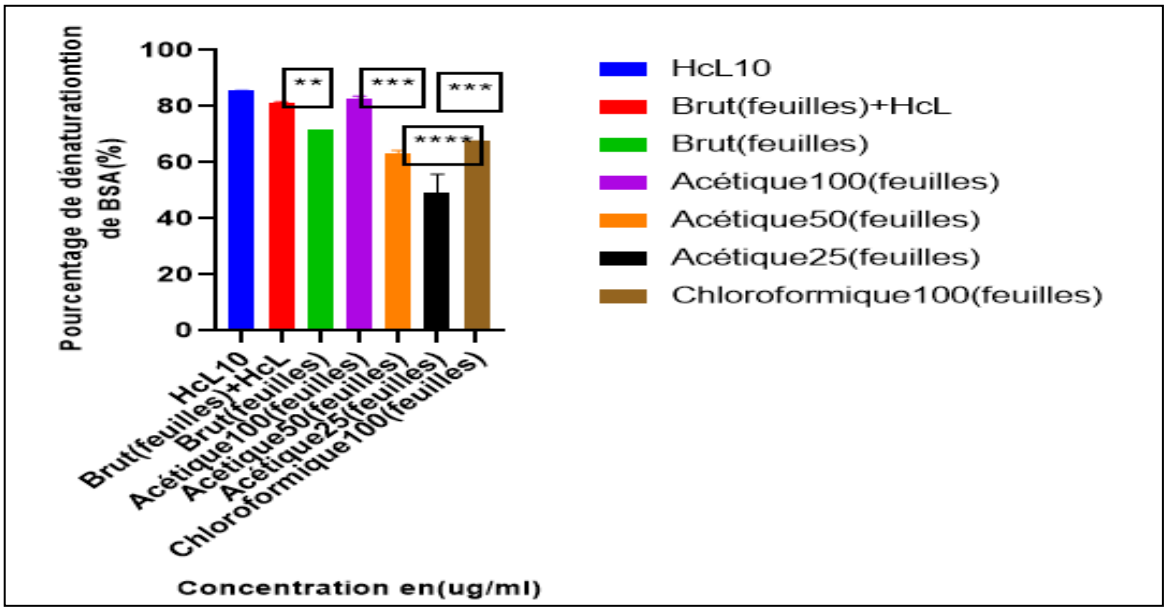



**Figure12:** Pourcentage de dénaturation de BSA par l'HCl, l'extrait brut, chloroformique et l'extrait acétiqueà différentes concentrations.Les résultats sont exprimés en moyenne±ecart type (n=2).

On constate que tous les extraits à différentes concentrations ont exercé un effet dénaturant sur la BSA. L'effet de l'extrait acétique à la concentration la plus élevé était similaire à celui de l'HCl (l'extrait acétique (100ug/ml) 82,69%±0,95, HCl (10ug/ml)85,62%±0,09) respectivement(P>0,05)tandis que l'effet exercé par les autres extraits (l'extrait acétique (50ug/ml), (25ug/ml) 63,47%±0,85 et 49,18%±6,60) respectivement,l'extrait chloroformique(100ug/ml) et brut(100ug/ml) 67,56%±0,13 ; 71,98% respectivement) était significativement inférieur à celui de l'HCl (l'extrait acétique (50ug/ml), chloroformique(100ug/ml), l'extrait acétique(25ug/ml) et brut(100ug/ml) (P<0,001),

(P<0,0001) , (P<0,01) respectivement. Notamment, l'extrait brut malgré sa richesse en poly phénols n'a pas affecté l'effet dénaturant de l'HCl quand les deux ont été incubés avec la BSA. Ces résultats indiquent alors que les extraits de *Nerium Oleander* (l'extrait brut, acide acétique, chloroformique) à différentes concentrations ont un effet cytotoxique présenté par un pourvoir dénaturant des protéines *in vitro*comparable à celui de l'HCl.

Contrairement à nos résultats, **Mary et *al*., (2017)**, ont montré que l'extrait éthanolique des fleurs de *Nerium Oleander*a présenté une activité antiinflammatoire *in vivo et in vitro* par l'inhibition de la dénaturation des protéines (albumine) à une concentration comprise entre 100 et 500 µg/ml. La valeur IC50 de l'extrait éthanolique de *Nerium Oleander*était de 236,03 µg/ml alors que celle du diclofénac sodique était de 231,76 µg/ml.

## 10. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur l'induction de la trypsine

L'effet des différents extraits sur l'activité de la trypsine est présenté sur le tableau (9).

**Tableau9 :** Pourcentage d'induction de l'activité de la trypsine, par les différents extraits de *Nerium Oleander*. Les résultats sont exprimés en moyenne±ecart type (n=3).

| Echantillon | Pourcentage(%)d'induction de trypsine ± Ecart type |
|---|---|
| E.A.acétique | 63,24±7,45 |
| E.brut feuilles | ND |
| E.brut fleurs | ND |
| E.chloroformique feuilles | ND |
| E.chloroformique fleurs | ND |

Bien que l'activité antiprotéase est considérée comme un mécanisme antiinflammatoire, l'activation des protéases est considérée un des mécanismes de cytotoxicité **(Sukharev et *al*., 1997).**

D'après les résultats présentés sur le tableau (9) on constate que, uniquement l'extrait acétique a exercé une induction importante de l'activité de la trypsine (63,24±7,45) à la concentration de (80mg/ml). La trypsine est une enzyme de référence utilisée souvent pour évaluer l'activité protéase/antiprotéase des différentes substances. **Padul et *al*., (2012)**, ont mené une étude *in vitro*, qui a révélé que des extraits de feuilles, graines et fleurs de *Nerium Oleander* ont montré une activité négligeable sur la trypsine. On suggère alors que l'extrait

acétique dans la présente étude contient un composant caractéristique qu'il lui confère une activité inductrice des protéases.

## 11. Effet des extraits de *Nerium Oleander*sur la prolifération des levures

La figure (13) présente le pourcentage d'inhibition de la prolifération de levure par l'extrait brut, chloroformique, l'extrait d'acide acétique et le NaCN, à la concentration 50µg/ml, à différent points de temps (2h, 5h,48h).

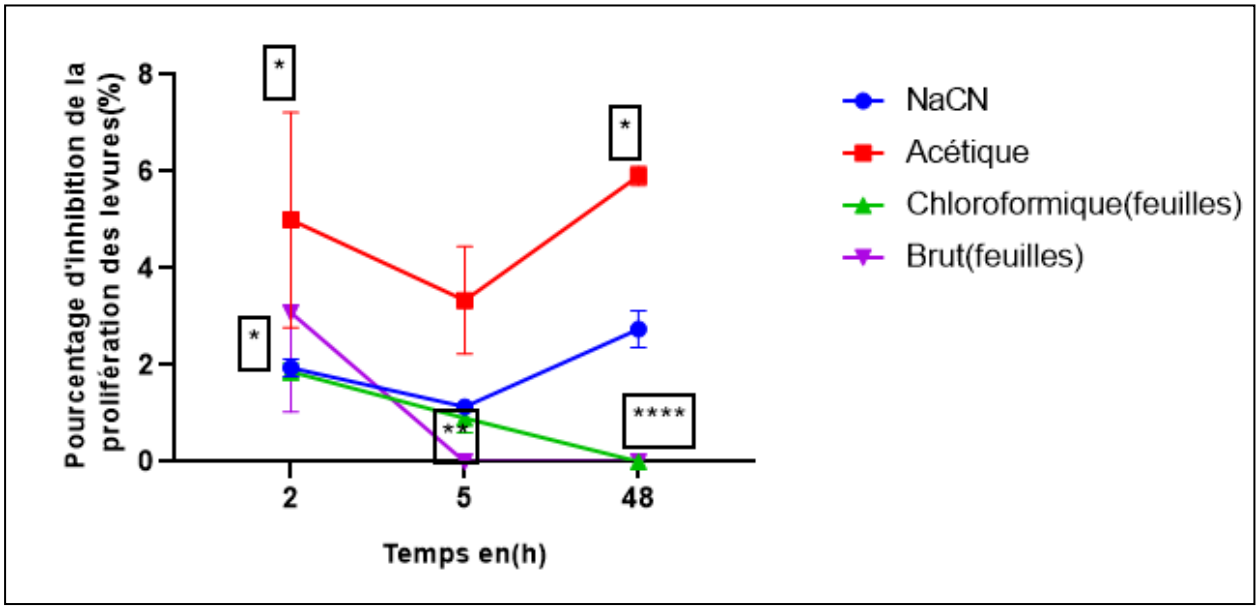



**Figure 13 :** Pourcentage d'inhibition de la prolifération des levures par les extraits de *Nerium Oleander* à la concentration de 50µg/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne±ecart type (n=3).

On constate qu'après 2h d'incubation, tous les extraits ont inhibé la prolifération cellulaire (l'extrait acétique 5%±2,22 ; l'extrait chloroformique 1,86 %±0,17 ; l'extrait brut 3,08%±2,05).

Après 5h d'incubation, l'effet des extraits chloroformiques (0,90%±0,30) et brut (0%), (P<0,01) ont été diminué et devenus négligeables après 48 h d'incubation. Par contre l'effet de l'extrait acétique était significativement supérieur à celui de NaCN dans tous les temps de mesure et notamment après 48 h d'incubation (P<0,05).

La figure (14) présente le pourcentage d'inhibition de la prolifération des levures par les différents extraits, à la concentration de 100ug/ml, à différent points de temps (2h, 5h,48h).

A la concentration 100µg/ml, l'activité antiproliférative des extraits brut et chloroformique dans tous les temps de mesure était négligeable par rapport à l'activité induite par le NaCNou

l'extrait acétique. Bien que l'activité de l'extrait brut fût négligeable, son incubation avec le NaCN a potentialisé significativement l'effet de ce dernier notamment après 48 h d'incubation.

Il est intéressant de noter que à la concentration de 100µg/ml l'effet de l'extrait acétique était supérieur à celui de NaCN, notamment après 48 h d'incubation ou on a enregistré une activité de (6,72%±0,18) pour le NaCN et (39,23%±2,92) pour l'extrait acétique (P<0.001). Cela indique clairement que l'extrait acétique est noté d'une activité antiproliférative importante et dépendante de la concentration.

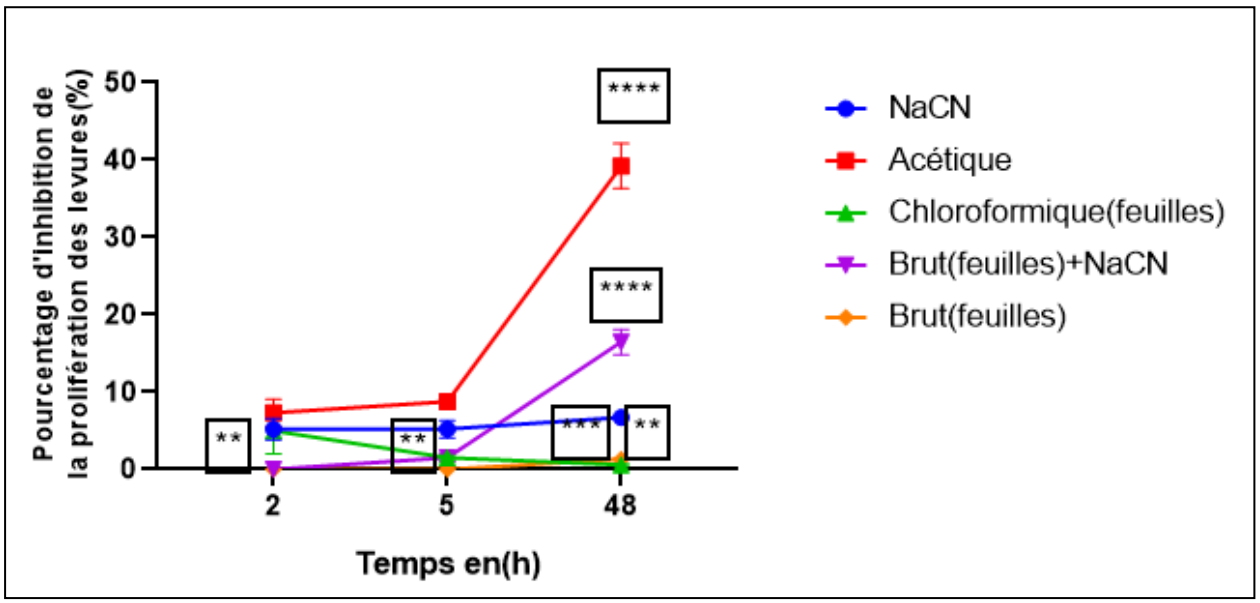



**Figure 14 :** Pourcentage d'inhibition de la prolifération de levure par les extraits de *Nerium Oleander*à la concentration de 100µg/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne±ecart type (n=3).

En effet l'activité antiproliférative de *N. Oleander* était documentée dans plusieurs études, notamment sur les lignés cellulaires cancéreuses. Par exemple, **Mohapatra et *al*., (2021)** ont rapporté que le traitement d'une lignée cancéreusedes cellules cervicale par l'extrait chloroformique de feuilles de *Nerium Oleander*ainduit une inhibition de la croissance et la migration cellulaire, et a arrêtéle cycle cellulaire en phase G2/M (**Mohapatra et *al*., 2021). Ruta et *al*. (2020)** ont testé la cytotoxicité de l'oleadrin sur un modèle de *Saccharomyces cerevisiae.* Ils ont rapporté que ce composé majeur de *Nerium Oleander*inhibela pompe Na+/K+-ATPase et altèrel'homéostasie cellulaire de $Ca^{+}$ et $Mg^{+}$.

# Conclusion et perspective

## Conclusion et perspective

*Nerium Oleander* est une des plus plantes toxiques dans le monde. Elle contient de nombreux composés particulièrement cytotoxiques, à activité anticancéreuse potentielle.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer la cytotoxicité des différents extraits de *Nerium Oleander in vitro.*

L'évaluation de l'activité antioxydante, par estimation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur de fer FRAP et la réduction de molybdate d'ammonium a revelé que l'extrait brut est notamment doté d'une activité antioxydante considérable. On suggere que cette activité est principalement liée à la teneur elevée de l'extrait brut en composés phenoliques.

La cytotoxicité a été evalué par estimation de la capacité de l'induction de la peroxydation lipidique, de la dénaturation de BSA, de l'induction de la trypsine et de l'inhibition de la prolifération cellulaire sur le model de *Saccharomyces cerevisiae*. Les extraits chloroformique et acetique ont presenté une capacité considerable de l'induction de la peroxydation lipidique et de denaturation de prorteines. L'extrait acetique seul a presenté une activité antiproliférative importante sur le model de *Saccharomyces cerevisiae*. On suggere alors que *Nerium Oleander*posséde plusieurs mecanismes de cytotoxicité grace à sa compostion phytochimique riche et diversifiée.

L'etude approfondie des mecanismes de cytoxicité et de synergismes entre les diffrents composés *Nerium Oleander* sempble prometeu pour developer unereponse globale de cytotoxicité efficace et selective aux cellules cancereuse.

# Référence bibliographiques

## Référence bibliographiques

Abbasi, M. H., Fatima, S. A., & Sheikh, N. A. D. E. E. M. (2014). Histological comparison of natural lung injury in Rattus norvegicus induced by a natural herb (Nerium oleander) and a known carcinogen (thioacetamide). *Biologia*, 135-138.

Abbasi, M. H., Fatima, S., Khawar, M. B., Jahan, S., & Sheikh, N. (2018). An In Vivo Study on intoxicating effects of Nerium oleander Water based extract on multiorgans of Wistar rat. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*.

Aboud, A. S. (2015). Antimicrobial activities of aqueous and ethanolic extracts from Nerium oleander used in the treatment of burns infections isolates. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci*, *2*(4), 248-258.

Adom. R. O., Gachichi. J. W., Onegi. B., Tamale. J., Apio. S. O. (2003). The cardiotonic effect of the crude ethanolic extract of Nerium oleander in the isolated guinea pig hearts. African health sciences., vol. 3, pp. 77-82.

Ahmad, B., Khan, M. R., Shah, N. A., & Khan, R. A. (2013). In vitro antioxidant potential of dicliptera roxburghiana. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(1), 1-10.

Al-Hakak ZM, Khaleel ZI and Fadel MA. (2019). Study the effect of the toxic alcoholic extract of Nerium oleander on the liver cancer cell line in vivo and the effects on the liver histology in Mus Musculus. J Pharm Sci & Res ; 11(1): 201-205.

Alhazmi, A., Salih, M., Aldairi, A., Alghamdi, A., Almalki, A., Almehmadi, M., ...& Felemban, S. (2021). PROTECTIVE AND THERAPEUTIC EFFECT OF ZAMZAM WATER ON VARIOUS ORGANS IN MICE INDUCED BY ETHANOLIC EXTRACT OF Nerium Oleander. *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, *30*(7 A), 9197-9205.

Ali, H. F. M., El-Ella, F. M. A., & Nasr, N. F. (2010). Screening of chemical analysis, antioxidant antimicrobial and antitumor activities of essential oil of oleander (Nerium oleander) flower. *International journal of biological Chemistry*, *4*(4), 190-202.

Al-Snafi, A. E. (2020). Bioactive ingredients and pharmacological effects of Nerium oleander. *IOSR Journal of Pharmacy*, *10*(9), 19-32.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ...& Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food chemistry*, *112*(2), 303-309.

Blois,M.S.(1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200.

Bnouham. M., Mekhfi. H., Legssyer. A., Ziyyat. A.(2002).Ethno pharmacology forum. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int. J. diabetes et Metabolism., vol.10, pp. 33-50.

Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.

Bruneton. J. (2001). Plantes toxiques : V´eg´etaux dangereux pour l'Homme et les Animaux, Lavoisier, Paris, France, 2nd edition.

Budić-Leto, I., Lovrić, T., Pezo, I., & Gajdoš Kljusurić, J. (2005). Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the Babić grape variety. *Food Technology and Biotechnology*, *43*(1), 47-53.

Calderón-Montaño, J. M., Burgos-Morón, E., Orta, M. L., Mateos, S., & López-Lázaro, M. (2013). A hydroalcoholic extract from the leaves of Nerium oleander inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells. *Planta Medica*, *79*(12), 1017-1023.

Cao, Y. L., Zhang, M. H., Lu, Y. F., Li, C. Y., Tang, J. S., & Jiang, M. M. (2018). Cardenolides from the leaves of Nerium oleander. *Fitoterapia*, *127*, 293-300.

Chaudhary K, Prasad DN and Sandhu BS.(2015). Preliminary pharmacognostic and phytochemical studies on Nerium oleander Linn. (White cultivar). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry ; 4(1): 185188.

Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by Bacillus subtilis IMR-NK1. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(8), 2454-2458.

Clark, R. F., Selden, B. S., & Curry, S. C. (1991). Digoxin-specific Fab fragments in the treatment of oleander toxicity in a canine model. *Annals of emergency medicine*, *20*(10), 1073-1077.

Derwich E, Benziane Z and Boukir A. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil 782 Human and Experimental Toxicology.

Dey P, Saha MR, Chowdhuri SR, et al. (2015). Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant Nerium oleander through alloxan induced diabetes in mice. J Ethnopharmacol ;161:128-137.

Dey, P., & Chaudhuri, T. K. (2014). Pharmacological aspects of Nerium indicum Mill: a comprehensive review. *Pharmacognosy reviews*, *8*(16), 156.

Dey, P., Saha, M. R., Roy Choudhuri, S., Sarkar, I., Halder, B., Poddar-Sarkar, M., ...& Chaudhuri, T. K. (2019). Oleander stem and root standardized extracts mitigate acute hyperglycaemia by limiting systemic oxidative stress response in diabetic mice. *Advances in pharmacological sciences*.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, *97*(4), 654-660.

Driggers, D. A., Solbrig, R., Steiner, J. F., Swedberg, J., & Jewell, G. S. (1989). Acute oleander poisoning. A suicide attempt in a geriatric patient. *Western journal of medicine*, *151*(6), 660.

Durick, F., King Jr, J. S., Ware, P. A., & Cronheim, G. (1950). A colorimetric method for the estimation of some tropine alkaloids. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, *39*(12), 680-682.

Ebrahimi, F., Ghorbani Nohooji, M., & Miri, S. M. (2018).October. Agronomic and pharmacological aspects of Nerium oleander: an important medicinal plant. In *The First National Congress and International Fair of Medicinal Plants and Strategies for Persian Medicine that Affect Diabetes* (pp. 9-11).

Eddleston, M., Ariaratnam, C. A., Meyer, W. P., Perera, G., Kularatne, A. M., Attapattu, S., ...& Warrell, D. A. (1999). Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree

(Thevetia peruviana) in northern Sri Lanka. *Tropical medicine & International health*, *4*(4), 266-273.

Farkhondeh, T., Kianmehr, M., Kazemi, T., Samarghandian, S., & Khazdair, M. R. (2020). Toxicity effects of Nerium oleander, basic and clinical evidence: A comprehensive review. *Human & experimental toxicology*, *39*(6), 773-784.

Farooqui, S., & Tyagi, T. (2018). Nerium oleander: It's application in basic and applied science: A Review. *Int J Pharm Pharm Sci*, *10*(3), 1-4.

Hammiche, V., Merad, R., & Azzouz, M. (2013). Laurier rose. In *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* ,Springer, Paris. (pp. 157-166).

Hanson. J. R. (1985) The chemistry of natural products, (R. H. Thomson ed.), chapter 4. Blackie USA: Chapman et Hall, New York, pp. 42-92.

https://www.memoireonline.com/03/15/8988/m_Methodes-d-etudes-d-activite-des-antioxydants-des-plantes-medicinales12.html. Consulé en 3-09-2022.

Huq. M. M., Jabbar. A., Rashid. M. A., Hasan. C. M. (1999). A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of Nerium oleander. Fitoterapia., vol. 70, pp. 5-9.

Hussain, M. A., & Gorsi, M. S.(2004). Antimicrobial activity of Nerium oleander Linn. *Asian Journal of Plant Sciences*.

Khan, H., Saeed, M., Khan, M. A., Dar, A., & Khan, I. (2010). The antinociceptive activity of Polygonatum verticillatum rhizomes in pain models. *Journal of ethnopharmacology*, *127*(2), 521-527.

Khan, I., Kant, C., Sanwaria, A., & Meena, L. (2010). Acute cardiac toxicity of nerium oleander/indicum poisoning (kaner) poisoning. *Heart views: the official journal of the Gulf Heart Association*, *11*(3), 115.

Khare, C. P. (2004). *Encyclopedia of indian medicinal plants: rational western therapy, ayurvedic and other traditional usage, botany*. Springer.

Laughlin, Ch.W. (1997). Oleander. Ornamentals and Flowers. 4: 1-3.

Maataoui, B. S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006). Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [Opuntia ficus indica]. *Lebanese science journal*, *7*(1), 3-8.

Maftah. T., Sengui. R., Djennas. A. K. (2003). Programme UICN d'Afrique du Nord, cosmétologie au naturel. Algérie, p. 11.

Minnat, T. R. (2016). In vivo and in vitro antibacterial assessment of Nerium oleander aqueous leaf extract against bacterial pathogens and its effect in treatment of wounds. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, *15*(2), 31-39.

Mohadjerani, M. (2012). Antioxidant activity and total phenolic content of Nerium oleander L. grown in North of Iran. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *11*(4), 1121.

Mohapatra, S., Biswal, A. K., Dandapat, J., & Debata, P. R. (2021). Leaf Extract of Nerium oleander L. Inhibits Cell Proliferation, Migration and Arrest of Cell Cycle at G2/M Phase in HeLa Cervical Cancer Cell. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, *21*(5), 649-657.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, *26*(2), 211-219.

Mouhcine, M., Amin, L., Saaid, A., Khalil, H., & Laila, B. (2019). Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of Nerium oleander collected in Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *12*(1), 32.

Mwafy SN and Yassin MM. (2011). Antidiabetic activity evaluation of glimepiride and Nerium oleander extract on insulin, glucose levels and some liver enzymes activities in experimental diabetic rat model.Pak J Biol Sci ; 14(21): 984-990.

Osterloh, J., Herold, S., & Pond, S. (1982). Oleander interference in the digoxin radioimmunoassay in a fatal ingestion. *Jama*, *247*(11), 1596-1597.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, *49*(10), 4619-4626.

Oukal. Z. (2008). Les principales plantes toxiques chez les animaux domestiques au Maroc. (Thèse de Doctorat), Maroc.

Ozmaie, S., Akbari, G., Asghari, A., Sakha, M., & Mortazavi, P. (2013). Experimental oleander (Nerium oleander) poisoning in sheep: Serum biochemical changes and pathological study. *Annals of biological research*, *4*(1), 194-198.

Padul, M. V., Patil, M. T., Chougale, A. D., Zambare, V. P., Patil, R. M., Ghule, R. B., ... & Salve, A. N. (2012). In vitro screening of proteinase inhibitors (trypsin, chymotrypsin and Helicoverpa gut proteinase inhibitors) in different plant tissue extracts. *Trends Biotechnol Res*, *1*, 7-14.

Paris. R.R et Moyse. H. (1971) . Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III), pp.32-52

Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, *4*(8).

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, *269*(2), 337-341.

Ramawat KG, Merillon JM. (2000). Biotechnology: Secondary Metabolites. Science Pub Inc.

Rashan, L. J., Franke, K., Khine, M. M., Kelter, G., Fiebig, H. H., Neumann, J., & Wessjohann, L. A. (2011). Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from Nerium oleander and Streptocaulon tomentosum. *Journal of ethnopharmacology*, *134*(3), 781-788.

Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux.

Sanna, G., Madeddu, S., Serra, A., Collu, D., Efferth, T., Hakkim, F. L., & Rashan, L. (2021). Anti-poliovirus activity of Nerium oleander aqueous extract. *Natural product research*, *35*(4), 633-636.

Sava, A., Buron, F., Routier, S., Panainte, A., Bibire, N., Constantin, S. M., ...& Profire, L. (2021). Design, synthesis, in silico and in vitro studies for new nitric oxide-releasing indomethacin derivatives with 1, 3, 4-Oxadiazole-2-thiol scaffold. *International journal of molecular sciences*, *22*(13), 7079.

Sharma, U. K., Sharma, A. K., & Pandey, A. K. (2016). Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon. *BMC complementary and alternative medicine*, *16*(1), 1-11.

Siddiqui, I., Bokhari, N. A., & Perveen, K. (2016). Antifungal ability of Nerium oleander against Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii and Macrophomina phaseolina. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, *26*(1).

Singh, S., Shenoy, S., Nehete, P. N., Yang, P., Nehete, B., Fontenot, D., ...& Sastry, K. J. (2013). Nerium oleander derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity. *Fitoterapia*, *84*, 32-39.

Singhal, K. G., & Gupta, G. D. (2012). Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of Nerium oleander against CCl4–induced liver injury in rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *5*(9), 677-685.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* . Academic press,(Vol. 299, pp. 152-178) .

Sinha, S. N., & Biswas, K. (2016). A concise review on Nerium oleander L.—an important medicinal plant. *Trop. Plant Res*, *3*, 408-412.)

Smith, J. A., Madden, T., Vijjeswarapu, M., & Newman, R. A. (2001). Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochemical pharmacology*, *62*(4), 469-472.

Tayoub G, Sulaiman H and Alorfi M. (2014). Analysis of oleandrin in oleander extract (Nerium oleander) by HPLC. Journal of Natural Products ; 7: 73-78.

Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of Severinia buxifolia. *Journal of food quality*.

Turan, N., Akgün-Dar, K., Kuruca, S. E., Kiliçaslan-Ayna, T., Seyhan, V. G., Atasever, B., ...& Çarin, M. (2006). Cytotoxic effects of leaf, stem and root extracts of Nerium oleander on leukemia cell lines and role of the p-glycoprotein in this effect. *J Exp Ther Oncol*, *6*(1), 31-38.

Verma, R. K., & Yadav, M. (2018). TAXONOMICAL STUDIES OF NERIUM OLEANDER (LINN.) WILD (A LATEX YIELDING PLANT).

Yamashoji, S., Al Mamun, A., & Bari, L. (2020). Visual and simple determination of glucose-induced acidification by yeast cells: application to rapid cytotoxicity test. *Heliyon*, *6*(5), e03924.

# Annexes

**Annexe (1) :** Une série des réactifs chimiques et matériels du laboratoire, Appareillage ont été utilisés pour la réalisation de ce travail de recherche.

1. **Réactifs chimiques**

| Réactifs chimiques | |
|---|---|
| Éthanol | La quarsétine |
| Méthanol | Plomb Pb |
| Acide acétique(C2H4O2) | Fercianide |
| Tompan de phosphate K2HPO4 | Eau distillée |
| Chloroforme (CHCl3) | Acide chlorhydrique(HCl) |
| L'acide ammoniaque NH4OH | Chlorure de fer(FeCl3) |
| Acide ascorbique | Acide sulfurique (H2SO4) |
| Acide gallique | Réactif de Folin-ciocalteu |
| TBA | KCL |
| BSA | NaCl |
| TCA | ALCL3 |
| NaCO3 | KH2PO4 |
| Trypsine | Caséine |
| La solution de DPPH | H2O2 |
| L'acide nicotinique | La levure |
| NaoH | Molybdate d'ammonium |
| NacN | violet de bromocrésol |
| l'eau déminéralisée | Glucose |
| Peptone | Na2HPO4 |
| NaHCO4 | bicarbonate de sodium |

**2.Matériels du laboratoire**

| Matériels du laboratoire | |
|---|---|
| L'étuve | Porte-tubes à essai |
| Éprouvette graduée | Les empeules |
| Réfrigérateur | Papier filtre |
| Les épandorfes | Bain marie |
| Centrifugeuse | Creuset |
| Balance analytique | Une ampoule à décanter |
| Boite de pétri | Micropipette 0-10 ul |
| Fiole jaugée | Tubes à essai |
| Papier aluminium | Béchers |
| Mortier | Spatule |
| Gants chirurgicaux | Micropipette 10-1000µl |
| Papier absorbant | Barre d'agitation magnétique |
| Cuve en plastique et en verre | Vortex |
| Pissette | Agitateur et pH mètre |

**3. Appareillage**

Les appareils utilisés dans cette travaille de recherche sont :

Plaque chauffante

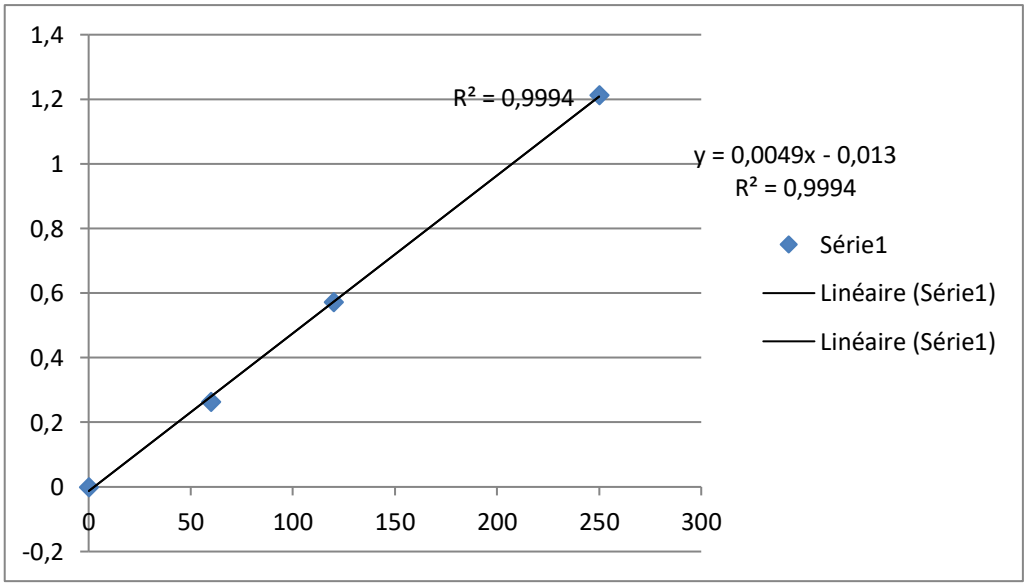
Balance de précision

Rotavapeur

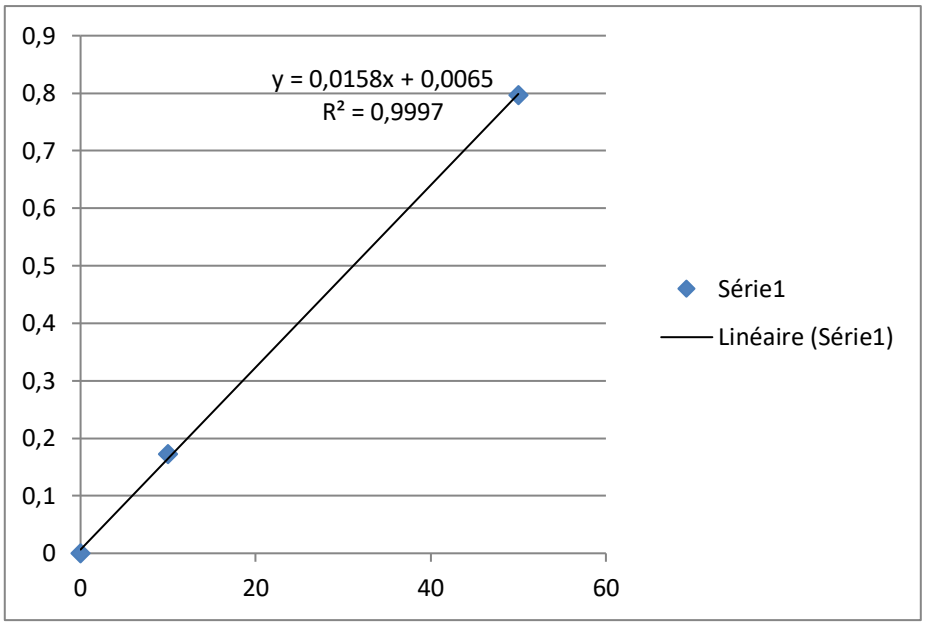
Spectrophotomètre UV-visible

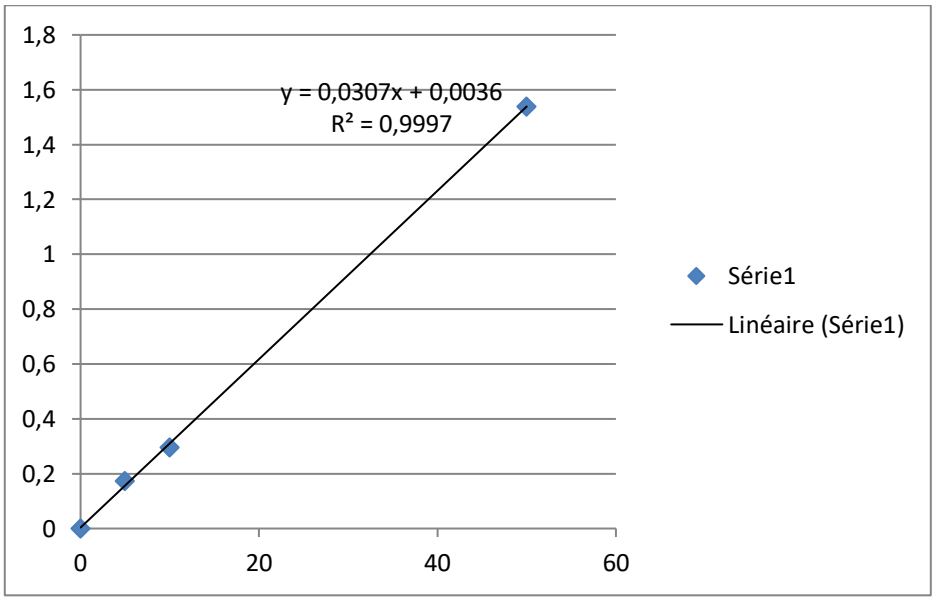
**Annexe (2) :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

| Concentration (mg /ml) | 0 | 60 | 120 | 250 |
|---|---|---|---|---|
| Absorbance à (765nm) | 0 | 0,264 | 0,572 | 1,213 |

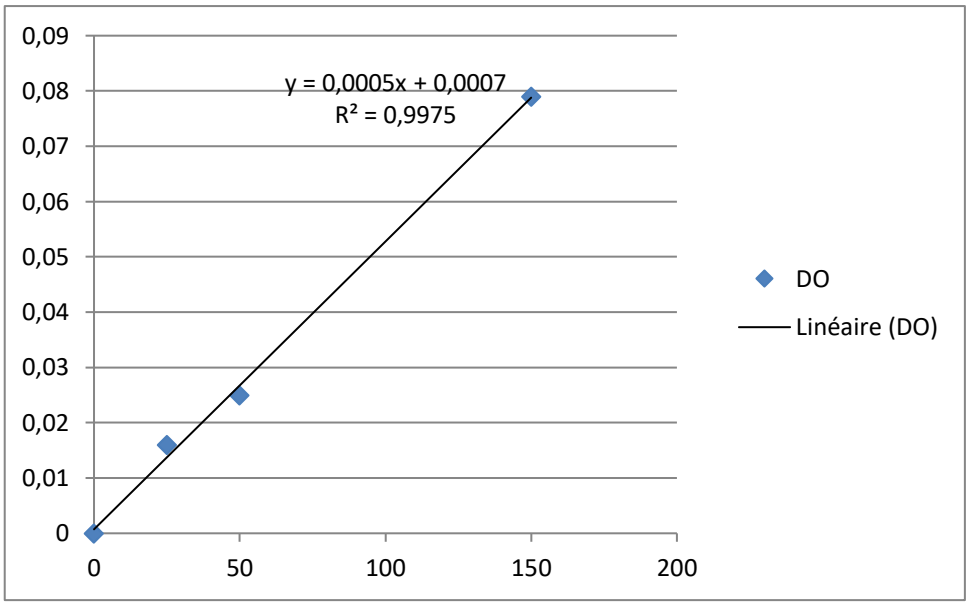


**Annexe (3) :** Courbe d'étalonnage de la quercétine.



**Annexe (4) :** Courbe d'étalonnage de la nicotine.




**Annexe (5) :** Rendement des extraits d'éthanol et les extraits méthanolique de plant *Nerium Oleander*.

| Les extraits | L'extrait sec en (g) | Rendement (%) |
|---|---|---|
| Acide acétique(feuille) | 1,79 g | 60% |
| Brut (feuille) | 0,90g | 40,00% |
| Brut (fleurs) | 0,295g | 29,50% |
| Chloro(fleurs) | 0,13g | 13% |
| Chloro(feuille) | 0,17g | 6,40% |

**Annexe (6) :** Pourcentage de la peroxydation lipidique par FeCl3, l'extrait chloroformique, l'extrait d'acide acétique, à différentes concentrations.

| Les composés | FeCl3 | E.chloro50 | E.chloro100 | E.A.acét25 | E.A.acét50 | E.A.acét100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| % | 87,78 | 97,32 | 66,50 | 52,15 | 27,45 | 44,08 |

Pourcentage l'inhibition de peroxydation lipidique par la quèrsétine, l'extrait brut, FeCl3.

| Les composés | FeCl3 | Qèrsétine | E.brut |
|---|---|---|---|
| % | 87,78 | 21,37 | 72,13 |

**Annexe (7) :**Pourcentage de dénaturation de BSA par l'HCL, l'extrait brut, chloroformique, l'extrait d'acide acétique, à différentes concentration.

| Les composés | HCL10 | E.brut | E.brut+HCL | E.A.acét25 | E.A.acét50 | E.A.acét100 | E.chloro100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % | 85,62 | 71,98 | 81,41 | 49,18 | 63,47 | 82,69 | 67,56 |

**Annexe (8) :**Pourcentage d'inhibition de la prolifération de levure par l'extrait de *Nerium Oleander* en fonction de différent temps (2h, 5h,48h) à concentration de 50ul.

| Les composés | | E.Acide acétique | NaCn | E. brut | E.Chloroformique |
|---|---|---|---|---|---|
| % | **Après 2h** | 5 | 1,94 | 3,08 | 1,86 |
| | **Après 5h** | 3,34 | 1,14 | 0 | 0,90 |
| | **Après 48h** | 5,91 | 2,74 | 0 | 0 |

Pourcentage d'inhibition de la prolifération de levure par l'extrait de *Nerium Oleander* en fonction de différent temps (2h, 5h,48h) à concentration de 100ul.

| Les composés | | E.Acide acétique | NaCn | E.brut | E.Chloro.feuille |
|---|---|---|---|---|---|
| % | **Après 2h** | 7,32 | 5,23 | 0 | 25,49 |
| | **Après 5h** | 8,75 | 5,21 | 0 | 1,03 |
| | | | | E.brut+NaCn | |
| | | | | 1,51 | |
| | **Après 48h** | 39,23 | 6,72 | E.brut | 5,9 |
| | | | | 1,31 | |
| | | | | L'E.brut+NaCn | |
| | | | | 16,48 | |

جامعة محمد الصديق بن يحيى
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Réalisée par :** LEMOUARI Nihed

LEFOUILI Meryem

**Encadré par :** Dr. LAHOUEL Asma

# Evaluation de l'activité antioxydante et de la cytotoxicité des extraits de *Nerium oleander in vitro*

## Résumé

L'objectif de notre étudeest l'évaluation la cytotoxicité de différents extraits (methanolique, acetique, chloroforrmique) de *Nerium oleander*.La Mesure des composes polyphénoliques et alcaloïdes des extraits a été effectué suivi par une evaluation l'activité antioxydante par le test de DPPH, FRAP, et molybdate d'ammoniumet les tests de cytotoxicité par l'evaluation del'induction de la peroxydation lipidique dans l'homogénat du foie, la dénaturation de protéine (BSA), l'induction de trypsine et le test de l'inhibition de prolifération des levures. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait brut de *Nerium oleander* est doté d'une activité antioxydante considerble. Les extraits acétique et chloroformique (alcaloïdes) ont presenté un effet remarquable de l'induction de la peroxydation lipidique et de denaturation des proteines tandi que l'extrait acétique seul a inhibé la proliferation cellulaire dans le modle de levures *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus dans cette etude confirment la cytotoxicté *Nerium oleander* d'une part. D'autre part sa richesse particulierment en comosés phenolique lui confert un caractere cytoprotecteur. Dans context, cette plante peut être candidat pour le développement des traitment à la fois ctytoxiques ciblant les cellules cancéreuses et cytoprotecteurs pour les cellules saines.

**Mots clés:** *Nerium oleander*, l'activité de cytotoxicité, l'activité antioxydant, les alcaloïdes, les composés polyphénoliques.

## Abstract

The objective of our study is to evaluate the cytotoxicity of different extracts of *Nerium oleander*.The Measurment of the polyphenolic compounds and alkaloids of the the difrent extracts was carried out followed by an evaluation of the antioxidant activity the DPPH test, FRAP, andand ammonium molybdate reduction test and the tesrs of cytotoxicity by the evaluation of the induction of lipid peroxidation in the homogenate liver, protein denaturation (BSA), trypsin induction, and the yeast cells proliferation inhibition test. The results obtained indicate that the crude extract of *Nerium oleander* has a considerable antioxidant activity.The acetic and chlorophotm extracts showed a remarkable effect of inducing lipid peroxidation and protein denaturation, wihlt the acetic extract alone inhibited cell proliferation in the model of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*. The results obtained in this study, confirm the cytotoxicity of *Nerium oleander* in one hand. On the ther hand, its richness particularly in phenolic compounds, garnties to it a cytoprotectibe character. In this context, this plant could be a potential condidate for the develomeny of both cytotoxic treatments targeting cancerous cells and protective for nomal cells.

**Key words:** *Nerium oleander*, cytotoxicity activity, antioxidant activity, alkaloids ,polyphenols.

## ملخص

الهدف من دراستنا هو تقييم السمية الخلوية للمستخلصات المختلفة من نبات الدفلى(الميثانول،الخليك،الكلوروفورميك).تم اجراء قياس مركبات البوليفينول الكلي ، القلويدات للمستخلصات متبوعا بتقييم لنشاط مضادات الأكسدة عن طريق اختبارDPPH، FRAP ، و اختبار الحد من موليبدات الأمونيوم واختبارات السمية الخلوية عن طريق تقييم تحريض بيروكسيد الدهون في تجانس الكبد ، وتمسخ البروتين (BSA، اختبار تحريض التربسين وتثبيط تكاثر الخميرة). تشير النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلص الخام للنبات له نشاط كبير كمضاد للأكسدة.اظهرت مستخلصات حمض الخليك والكلوروفورميك (قلويدات) لها تأثير تحريض بيروكسيد الدهون ، وتمسخ البروتين في خلاصة حمض الأسيتيك فقط. حيث انه وحده منعتكاثرخلايا الخميرة*Saccharomyces cerevisiae*. تؤكد النتائج السمية الخلوية لنبات الدفلى من ناحية ومن ناحية اخرة ثراءها خاصة في المركبات الفينولية ,cytoprotective cterus. وهذا النبات مرشحًا لتطويركل العلاجات السامة للخلايا التي تستهدف الخلايا السرطانية و الحماية الخلوية للخلايا .

**الكلمات الرئيسية:** نيريوم الدفلى، نشاط السمية الخلوية، نشاط مضادات الأكسدة، قلويدات، بوليفينول.