

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى -جيجل-

Université Mohammed Seddik Ben Yahia –Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية



Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie

Thème

*Evaluation de la cytotoxicité in vitro des extraits
aqueux, acétique et méthanolique des feuilles de
Nerium oleander*

Membres de Jury :

Présidente : Dr. LEKROUN Zouhra

Examinatrice : Dr. BENSEGHIER Salima

Encadrante : Dr. LAHOUAL Asma

Présenté par :

M^{elle} : ABOUD Afef

M^{elle} : HARMA Aida

M^{elle} : RIDA Chafia

Année Universitaire 2022/202

Numéro d'ordre :

Remerciements

On remercie avant tout Dieu, qui nous a donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail, et de surmonter tous les obstacles.

A nos chers parents qui sont la source de notre enthousiasme et notre réussite.

*Nos sincères remerciement et tous nos respect pour notre directrice de recherche, **LAHOUAL ASMA**, pour ses orientations et ses conseils précieux.*

Nos remerciements vont également à l'ensemble des membres de jury

*A madame **LEKROUN Zouhra** pour l'honneur qu'elle nous a accordé en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos remerciements pour madame **BENSEGHIER Salima** qui nous a honoré avec sa présence dans le jury et d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.*

Nous adressons nos remerciements aux ingénieurs du laboratoire de science de la nature et de la vie, pour leur disponibilité tout au long de l'expérimentation.

Nous adressons aussi nos remerciements à toutes les personnes qui nous a encouragés et qui ont participé dans la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Avant tout, merci à Dieu le tout-puissant de m'avoir donné le courage, la patience, la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude à mes chers parents pour leurs sacrifices et soutiens et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et le soutien. Puisse Allah vous accorder de santé et de bonheur.

À ma chère sœur et mon cher frère pour leur encouragement et soutien moral, croient en moi et pour avoir toujours été présents à mes côtés. Que Dieux vous protège.

À toute ma famille, qui m'a encouragé dans mon parcours.

Mes partenaires dans ce mémoire, Aida et Chafia pour leur patience et tous ceux qui sont partagés avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail et les bons moments que nous avons passé ensemble.

À mes amies pour leur encouragement et soutien.

ABBOUD Afef

Dédicace

À ma mère, mon père, les bougies qui ne cessent d'éclairer mon chemin.

Chère frères et sœurs.

À mes deux amies fifi et Afef qui ont partagé toutes les difficultés avec moi pour bien mener ce travail

Je tiens aussi à remercier mes amies « Amina » et « Marwa » pour leur soutien et leur encouragement

HARMA Aida

Dédicace

A mes parents : Belkacem et Leila,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour vous.

Papa, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, t'étais toujours présent pour me ressourcer et me rassurer.

Mama, tel que tu es : honorable et aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence et la source de tendresse, de patience et de générosité. Vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, vos prières m'ont beaucoup aidé pour bien mener mes études.

Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes frères Badreddine et Youcef, à travers vos encouragements et votre humour vous m'avez transmis un courage et une volonté indéterminables, vous m'avez donné la force de continuer, vos qualités sont trop longues à énumérer, je suis chanceuse et fière de vous avoir, que dieu vous garde.

A ma chère grande sœur Soumeya, ma noble guerrière, symbole de courage et de persévérance, merci d'être toujours à mes côtés pour me soutenir et m'écouter, je te souhaite une grande réussite dans ton avenir,

A mes grands-parents, symbole de courage et de persévérance.

A toute ma grande famille.

A mes amies et mes accompagnantes, Afef et Aida « Afafus et Aidus » vous étiez toujours présentes avec moi je vous remercie pour les beaux souvenirs et les agréables moments qu'on a passé ensemble, je vous souhaite une carrière fascinante.

A mes amies : chaima, Houssna

RIDA Chafia

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur *Nerium oleander*

1. Description de la plante <i>Nerium oleander</i>	5
2. Description botanique et morphologique	5
3. Types de <i>Nerium oleander</i>	6
4. Taxonomie	6
5. Origine et distribution	7
6. Usage traditionnel de <i>Nerium oleander</i>	7
7. Caractérisation phytochimique de <i>Nerium oleander</i>	9
8. Propriétés pharmacologiques de <i>Nerium oleander</i>	12
9. Toxicité	13
9.1. Effets toxiques de <i>N. oleander</i>	14
9.2. Cas cliniques de toxicités	15

Chapitre II : Cytotoxicité de *Nerium oleander*

1. Cytotoxicité	18
2. Cytotoxicité de <i>Nerium oleander</i>	18
a) <i>Nerium oleander</i> et l'induction d'apoptose	19
b) <i>Nerium oleander</i> et l'arrêt de l'invasion	20
c) <i>Nerium oleander</i> et l'inhibition de la croissance et la prolifération.....	22
d) Etudes cliniques sur <i>Nerium oleander</i>	23

Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Matériel	27
2. Méthodes	27
2.1 Récolte de la plante	27
2.2 Séchage et broyage	27
2.3. Préparations des extraits	28
2.3.1. Préparation de l'extrait aqueux de <i>Nerium oleander</i>	28
2.3.2. Extraction par alcool acétique	28
2.3.3. Préparation de l'extrait méthanolique	28
3. Détermination de rendement d'extraction	28
4. Caractérisation phytochimique	29
4.1. Dosage des polyphénols totaux	29
4.2. Dosage des flavonoïdes	29
4.3. Dosage des alcaloïdes	30
4.4. Détection des glycosides cardiaques	30
4.5. Dosage des métaux lourds	30
5. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	30
5.1. Teste de DPPH	30
5.2. Teste de capacité antioxydante	31
5.3. Détermination de l'activité chélatrice du fer	31
6. Evaluation de l'activité cytotoxique	32
6.1. Teste de dénaturation des protéines	32
6.2. Effet des extraits sur la trypsine.....	32

6.3. Test de peroxydation lipidique	33
6.4. Test de catalase	34
6.5. Test de la prolifération cellulaire	35
6.6. Test de cytotoxicité.....	35
6.7. Détermination de l'acidification induite par le glucose	36
6.8. Dégradation de l'ADN.....	36
7. Analyses statistiques.....	37

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Rendement de l'extraction des différents extraits	39
2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	39
3. Teneurs en alcaloïdes totaux	40
4. Dosage des glycosides cardiaques.....	41
5. Détermination quantitative des métaux lourds dans <i>Nerium oleander</i>	41
6. Test de piégeage du radical DPPH	42
7. Test des capacité antioxydant.....	43
8.Effets des extraits de <i>Nerium oleander</i> sur la trypsine	44
9. Effets des extraits de <i>Nerium oleander</i> sur la chélation du fer	45
10.Effets des extraits de <i>Nerium oleander</i> sur la dénaturation de l'ovalbumine	45
11. Effet des extraits de <i>Nerium Oleander</i> sur la peroxydation lipidique	46
12. Effet des extraits de <i>Nerium oleander</i> sur la catalase	47
13. Effet des extraits de <i>Nerium Oleander</i> sur la prolifération cellulaire	49
14.Effet des extraits de <i>Nerium Oleander</i> sur la consommation de glucose.....	50
15. Effet cytotoxique des extraits de <i>Nerium Oleander</i> sur la prolifération cellulaire	50
16. Effets des extraits de <i>N. oleander</i> sur l'ADN.....	51

Discussion	52
Conclusion.....	60
Références bibliographiques	61
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de la partie aérienne de <i>N. oleander</i> à la période de floraison.....	5
Figure 2 : Différentes parties de <i>N. oleander</i>	6
Figure 3 : Schéma présentatif du mécanisme d'action d'un glycoside cardiaque(oleandrin) sur les cardiomyocytes	15
Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de l'oléandrigénine-3-O-β-D-diginoside.....	20
Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la réserpine dans le cancer de la poche buccale du hamster induite par le DMBA	22
Figure 6 : Résultats de dosage des glycosides cardiaques.....	41
Figure 7 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'extrait aqueux, méthanolique l'extrait d'acide acétique, et l'acide ascorbique à différentes concentrations	42
Figure 8 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par les extraits de <i>N. oleander</i> et l'acide ascorbique	44
Figure 9 : Pourcentage d'inhibition de la trypsine par les extraits de <i>N. oleander</i> et l'acide salicylique	44
Figure 10 : Pourcentage de dénaturation de OV par les extraits de la plante.....	45
Figure 11 : Effets dénaturants des extraits de la plante sous une température de 55°C	46
Figure 12 : Effets des extraits de <i>N. oleander</i> sur la peroxydation lipidique	47
Figure 13 : Un suivie dans le temps des effets inhibiteurs des extraits de <i>N. oleander</i> sur les cellules de levure.....	48
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de la consommation de glucose par les extraits de <i>N. oleander</i> et NaCN.....	49
Figure 15 : Pourcentage de cytotoxicité de <i>N. oleander</i>	50
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de la catalase par les extraits de <i>N. oleander</i> et NaCN..	50
Figure 17 : Migration sur électrophorèse d'ADN des cellules de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> incubé pendant 48h avec les extraits de <i>N. oleander</i> ou NaCN	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types de <i>N. oleander</i>	
Tableau 2 : Différentes nomenclature de <i>N. oleander</i> dans différents pays	6
Tableau 3 : Différentes utilisations de <i>N. oleander</i> dans plusieurs pays	8
Tableau 4 : Constituants chimiques des différentes parties de <i>N. oleander</i>	10+11
Tableau 5 : Singes cliniques après l'ingestion de <i>N. oleander</i>	13
Tableau 6 : Cas d'intoxication par <i>N. oleander</i> chez les animaux et l'homme dans différents pays.....	16
Tableau 7 : Etapes de préparation du matériel végétal pour extraction	27
Tableau 8 : Rendement de différentes méthodes d'extraction des feuilles de <i>N. oleander</i> ...	39
Tableau 9 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux dans les différents extraits de <i>N. oleander</i>	39
Tableau 10 : Teneur en alcaloïde totaux dans les différents extraits de <i>N. oleander</i>	40
Tableau 11 : Tableau présente la concentration des métaux lourds accumulés dans les feuilles et les fleurs de <i>N. oleander</i>	41
Tableau 12 : Tableau présentatif de la concentration nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.....	42
Tableau 13 : Concentration nécessaire pour atteindre la DO 0.5nm	43
Tableau 14 : Activité de la catalase en présence des différents extraits de <i>N.oleander</i>	47

Liste des Abréviations

A : Acide

AlCl_3 : Chlorure d'aluminium

BSA : Albumine de sérum bovin

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$: Acide acétique

CHCl_3 : Chloroforme

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

E : Extrait

FeCl_3 : Chlorure ferrique

FeSO_4 : sulfate de fer (II)

FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

H_2SO_4 : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

KCl : Chlorure de potassium

MDA : Malone-dialdéhyde

N : Nerium

NaCl : Chlorure de Sodium

NaCN : Cyanure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

ov: ovalbumine

Ppm : partie par million

R % : Rendement en pourcentage

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

TP : Tampon phosphate

Tris-HCl : TRIS Hydrochloride

μg EAG/ml d'extrait : Microgramme équivalent de l'acide gallique par millilitre

μg EAN/ml : Microgramme équivalent de l'acide nicotinique par millilitre

μg EQ/ml : Microgramme équivalent de quercétine par millilitre

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité les êtres humains ont compté sur l'utilisation de la richesse florale de la terre pour se soigner (**Sanago, 2006**), en s'appuyant sur ce qu'on appelle la phytothérapie. La phytothérapie est une science allopathique basée sur les savoirs empiriques hérités de père en fils (**Majinda et al., 2001**). Dès le début du XXème la pharmacognosie a été développée, ce qui a permis de la transmuté d'une science basée sur des connaissances à une science basée sur des circonstances scientifiques certifiées (**Wichtl et Anton, 2003**).

De nos jours, on remarque que les maladies qui n'ont pas des traitements curatifs sont en augmentation. Le traitement et la prévention du cancer constituent un défi majeur pour l'ensemble de la communauté scientifique. Un régime alimentaire équilibré, pour obtenir une nutrition adéquate est une meilleure stratégie de prévention que de traitement du cancer (**Moustafa et al., 2020**). Mais jusqu'à aujourd'hui les chercheurs n'ont pas trouvés des solutions radicalaires, ils préconisent d'effectuer une chimiothérapie. Mais elle a beaucoup de conséquences néfastes pour l'organisme, ce qui les attiré à chercher des alternatives naturelles utilisées comme des substances antioxydants naturelles.

Les plantes médicinales possèdent dans leurs différentes parties plusieurs molécules bioactives, conçu pour des vertus thérapeutique (**Chaabi, 2008**). Ces molécules sont des métabolites secondaires extraites, qui peuvent agir contre les bactéries, contre les inflammations ou comme des antioxydants (**Sinha et Biswas, 2016**). Parmi ces plantes on cite la famille des *Apocynaceae*, spécifiquement *Nerium oleander*.

Nerium oleander, est une plante connue par sa barbarie et sa beauté florale. Célèbre par son gout amer et par sa toxicité pour les êtres vivants, littéralement connu par ces toxines tels les alcaloïdes, et les glycosides cardiaques, principalement l'olienderin, qui est impliqué dans le processus de la cytotoxicité.

Malgré sa nocivité, elle reste une plante thérapeutique utilisée dans plusieurs remèdes traditionnels. D'après la littérature, *N. oleander* est dotée de plusieurs propriétés pharmacologique, comme l'effet antibactérien –l'effet antiinflammatoire et par ses effets analgésiques (**Sinha et Biswas, 2016**) contre les douleurs des dents et des muscles ainsi que le pouvoir antiprolifératif et cytotoxique (**Farooqui et Tyagi, 2018**). De même les molécules extraites de cette plante ont été susceptibles d'être utilisé comme des substances curatives, telle que les composés phénoliques qui ont des puissants effets antioxydants et les alcaloïdes qui ont un effet sur l'ADN dans la lutte contre le cancer.

Introduction

Dans le cadre de la valorisation des caractéristiques des plantes, notre travail vise la détermination du pouvoir cytotoxique des feuilles de *Nerium oleander* par l'effectuation des multiples tests *in vitro*.

Notre travail est divisé en trois parties, dont la première s'adresse à l'étude bibliographique de la plante, la phytochimie, ainsi que les capacités bioactives et nocives de la plante. La deuxième partie est conçue pour l'étude expérimentale, pour l'évaluation de la capacité cytotoxique de la plante en réalisant plusieurs méthodes d'extractions à partir des feuilles. La cytotoxicité de la plante a été évaluée par la réalisation d'une gamme de tests *in vitro*, notamment, les tests de peroxydation lipidique, de dénaturation des protéines, le test d'inhibition de la catalase, le pouvoir accumulateur de la plante des métaux lourds, ainsi que les tests antiprolifératifs et cytotoxiques. La troisième partie concerne les résultats obtenus, et la discussion en comparaison avec la littérature, finalement en terminant le travail par une conclusion et des perspectives.

Partie

bibliographique

Chapitre I

Généralités sur *Nerium oleander*

1. Description de la plante *Nerium oleander*

La plante *Nerium oleander* appartient à la famille des Apocynaceae, considérée comme une plante toxique avec des propriétés pharmacologiques, elle est décrite et nommée par Carl von Linné en 1753 et bien illustrée par Pline l'Ancien, qui cite son caractère nuisible et ses fleurs roses semblables à des roses. Elle a été identifiée par les Grecs sous trois noms : rhododendron, rhododaphne et nérion (Seher et al., 2020). Elle est répandue par plusieurs nominations, communément appelée laurier-rose, en raison de sa ressemblance superficielle avec l'olive *Olea* (Ebrahimi et al., 2018), à l'échelle régionale elle est connue par Adefla (Fig1).

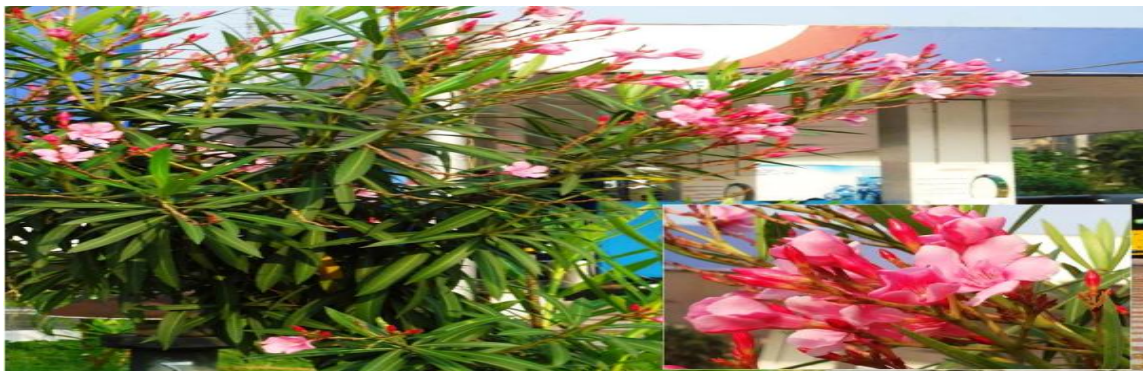


Figure1 : Photographie de la partie aérienne de *Nerium oleander* à la période de floraison. (Sinha et Biswa, 2016)

2. Description botanique et morphologique

Nerium oleander est un petit arbuste à feuilles immuables (Edward et al., 1994), mesure environ 2 à 5 mètres de hauteur (Patel, 2010), avec des branches longues, minces, érigées, densément feuillues dans la partie supérieure. (Strusa, 2001) et portent sur leurs extrémités des fleurs. L'écorce est marbrée, rigide (strusa, 2001) portant de longs rameaux dressés contenant un suc laiteux toxique (Maaouni, 2014). Les Feuilles sont de 5 à 20 cm de longueur et 2.5 à 5cm de largeur. (Al-Snafi, 2020), coriaces, persistantes, épaisses, allongées pointues, à nervures secondaires pennées, opposées ou verticillées par 3, de couleur vert sombre (Hammiche et al., 2013). Les Fleurs de *Nerium oleander* sont produites en grappe terminale d'environ 5 cm de diamètre, formant des bouquets en donnant l'aspect d'une trompette, poilues avec cinq pétales parfois simple ou doublés, les couleurs des fleurs varient de lilas, saumon, carmin, rose foncé à pâle, pourpre, cuivre, abricot, orange, blanc et jaune... (Sinha et Biswa, 2016). La floraison s'effectue à partir de la fin de mois de Mai jusqu'à mois d'Octobre (Genoux

et al., 2020). Les Fruits sont gousses étroites et allongées de 15 cm, de couleur vert-brun, comportent des follicules allongés, renferment des petits graines cotonneux (Sinha et Biswas, 2016 ; Delille, 2007). Ils se forment en automne ou l’hiver, après la floraison. (Genoux et al., 2020). Dernièrement, les graines sont nombreuses, entourées des poils, duveteuses, et surmontées d’une aigrette sessile qui en facilite la diffusion (Hammiche et al., 2013).



Fleur

Feuille

Graine et fruit

Figure 2 : Les différentes parties de *Nerium oleander* (original)

3. Types de *Nerium oleander*

Nerium oleander est connue par sa diversité et variétés ornementales (Hardin et Arena, 1974). Il existe plusieurs modèles et couleurs des fleurs, comme la rouge, l’orange, la blanche, la rose ... Dont la plus connue et la rose, en outre elle présente des fleurs a nombreux pétales tel que Tamouri à pétales double ou Sabra à pétales simples et des parfumes différents (voir annexel tableau 1)

4. Taxonomie

Nerium oleander appartient à la famille des *apocynacées*, du genre *Nerium* et d’espèce *Nerium oleander*. Elle est souvent utilisée comme plante d’ornement en raison de ses fleurs colorées et de son feuillage persistant de division tracheophyta et de classe magoliopsida. (Harju et al., 2004)

Il existe plusieurs appellations de *Nerium oleander* selon les pays et les régions considérées (Ali Esmail, 2020) présenté dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Différente nomenclature de *N. oleander* dans différents pays. (Ali Esmail, 2020)

Arab; Difla, Ward Al-Hemar, Sim Al-Hemar	Espagnole : Adelfa, Balandre, Laurel rosa, Pascua
Anglaise: Oleander, Rose Bay, Rose laurel	Afrique ; selonsroos
Française ; laurier rose	Allemand ; oleandero

5. Origine et distribution

Le nom latin *Nerium* vient du grec *nerion* signifiant « humide » et désignant la prédilection de cette plante pour les zones humides (**Paris et al., 1971**). Le nom spécifique *oleander* vient de l'italien de « *oleandro* » qui vient du latin « *Olea* » qui désigne l'olivier, faisant référence à la ressemblance des feuillages. *N. oleander* est largement propagé sur le globe terrestre, il parvient d'origine de la région méditerranéenne et du sous-continent indo-pakistanaï mais il est également reparti dans différents lieux géographiques et écologiques (**Farooqui et Tyagi, 2018 ; Sinha et Biswas, 2016**). *N. oleander* se trouve en Afrique du Nord ; en Algérie, en Libye, et dans la région Marocaine et Tunisienne, elle marque sa présence en Algérie surtout dans les alluvions et les terrains pierreux ainsi qu'au bord des oueds, dans le Sahara du Nord et se trouve également dans les montagnes du Tassili et du Hoggar (**Chopra et al., 1986**).

6. Usage traditionnel de *Nerium oleander*

Nerium oleander est connue par son aspect toxique est son danger pour les être vivant depuis l'antiquité. Cependant, *N. oleander* est nommée comme plante médicinale et a été utilisé pour le traitement de diverses maladies par plusieurs ethnicités. Les études ethnopharmacologies montrent que la plupart de ses parties végétales, telles que les fleurs, le jus des feuilles et l'écorce, sont utilisées pour le traitement des maladies microbiennes et fongiques (**Sinha et Biswas, 2016**). Cette plante a été utilisée dans plusieurs pays pour traiter différents problèmes de santé tel que les feuilles qui sont utilisées en macération et en friction externe contre la gale, la chute des cheveux, les poux, le diabète et les maux de dents (**Lahsissene et al., 2009**). L'huile obtenue à partir de la racine est utilisée dans le traitement de la lèpre et des maladies de la peau. En outre, des produits de soins de la peau à base de laurier-rose à application topique ont été commercialisés avec succès et plusieurs parties de la plante ont montré des propriétés anticancéreuses et antivirales (**Dey, 2020**). Le **tableau 3** résume les différentes utilisations de *N. oleander* dans plusieurs pays.

Tableau 3 : Différentes utilisations de *N. oleander* dans plusieurs pays

Pays	Parties de la plantes	Utilisation	Mode d'emploi
Russe et la chine (Dey, 2020)	Toutes les parties	Traitement des anomalies cardiaques	_____
	Les fleurs	Traitement des maladies de la peau (cicatrices) Anti-inflammation	Préparation de teintures vertes
Kenya (Dey, 2020)	Les feuilles et les graines	Traité des infections respiratoires et les infectons gastro-intestinales	Extrait d'eau chaud
Ancien Mésopotamie (Sharma et al., 2023)	Les Feuilles	Cancer	_____
Turquie (Dey, 2020)	Différentes parties	Traiter la paralysie, les douleurs extrêmes, les gonflements et la rhume	_____
Iles de caraïbes (Trinidad, Tobago) (Dey, 2020)	Différentes parties	Utilisées pour les problèmes de reproduction	Extrait de la plante
Algérie (Dey, 2020)	Différentes parties	Utilisées comme médicament antidiabétiques.	_____
Philippines (Sharma et al., 2023)	Différentes parties	Traité la fièvre, les maux de tête et les problèmes dermatologiques	_____
Maroc (Dey, 2020)	Différentes parties	Traité le diabète et l'hypertension (2023)	_____
Pakistan (Sharma et al., 2023)	Feuilles	Infection cutanée, diabète, Troubles gastro-intestinaux.	_____
Inde (Dey, 2020)	Ecorce de la tige	Traité les douleurs de l'oreille	Extrait
Italie (Calabre) (Sharma et al., 2023)	Différentes parties	Malaria	_____

7. Caractérisation phytochimique de *Nerium oleander*

Les études phytochimiques effectuées sur *N. oleander* révèlent que la plante contient plusieurs métabolites secondaires (**Bekkouche et al., 2022**). Les principaux métabolites secondaires de *N. oleander* sont les alcaloïdes, les cardénolides principalement l'oléandrine, les glycosides cardiaques, les composés phénoliques incluant les flavonoïdes, les tanins et les saponines, les stéroïdes, les pregnanes, les triterpènes et les triterpénoïdes (**Al-Snafi, 2020**). Ces métabolites sont responsables de plusieurs propriétés pharmacologiques, telles que les activités anti-inflammatoire, anticancéreuse, antioxydante, l'activité hépato-protectrice et neuroprotectrice (**Dey, 2020**). Ils sont très nombreux, variés et largement distribués sur les différentes parties de la plante (fleur, tige, feuille, graine et racine) (**Macheix et al., 2005**). Plusieurs études indiquent que la composition de cette plante varie en fonction des conditions géographiques et climatiques, l'organe considéré, le mode de culture, l'origine et le cycle végétatif de la plante, la conservation de la plante et la méthode d'extraction (**Zaid et al., 2022**). **Bakir Çilesizoğlu et al., (2022)** ont montré que les feuilles de *N. oleander* contiennent des : saponines, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, alcaloïdes, des glycosides cardiaques et des acides gras. Ils ont montré aussi que les fleurs contiennent des : phénols, tanins, coumarines, alcaloïdes et des stérols en même temp. **Al-Snafi, (2020)** a rapporté que les fleurs partagent 1,76 % d'huile totale de la plante, dont 34 composées ont été identifiées dans ses huiles. **Dey, (2020)** a rapporté que les racines contiennent des alcaloïdes, des composés phénoliques, des cardénolides et de l'acide ascorbique. L'écorce et les rameaux contiennent les prégnanes et la tige contient des cardénolides. **Sharma et al., (2023)** ont rapporté que l'écorce des tiges et les rameaux contiennent des dérivés stéroïdiens bioactifs tels que le neridienone A et le neridienone B. La répartition de ses métabolites secondaire entre les différentes parties de la plante est variée. **Dey, (2020)** a rapporté que les feuilles contiennent une grande quantité de saponine, riboflavine, thiamine et de tanins alors que les racines contiennent une forte concentration d'alcaloïdes et d'acide ascorbique. Pour les composés phénoliques totaux, les racines contiennent la plus grande quantité (87,5 %) que les feuilles qui contiennent la plus grande quantité des flavonoïdes (93,1%), toutes les parties de *N. oleander* contiennent des cardénolides lipophiles suivant l'ordre : feuille < fruit < racine = graine. Alors que **Al-Snafi, (2020)** a indiqué que la quantité maximale d'oléandrine se localise dans les racines (0,34 à 0,64 mg/g), suivies des feuilles (0,18 à 0,31mg/g), des tiges (0,23mg/g) et des fleurs (0,12 à 0,23 mg/g). D'après les expériences de l'étude de **Kadri et Yahia, (2015)** qui étudie l'influence de l'environnement sur les métabolites secondaires de *N. oleander* dans 3 régions du territoire national algérien dont la wilaya de

Constantine, la wilaya d'EL Oude et à Mila. Ils ont rapporté que les facteurs environnementaux n'affectent pas la qualité des métabolites secondaire, mais influent sur la quantité. La plus grande quantité des glycosides a été trouvée à Mila (47%), suivie par El-oued (27 %), puis Constantine (26 %). Ils ont constaté que l'accumulation des glycosides dans *N. oleander* est favorisée dans le sol argilo, riche en matière organique et les éléments minéraux (P, K, N...), la température élevée et un faible taux d'humidité. Le **tableau 4** résume la composition phytochimique des différentes parties de *N. oleander* selon plusieurs études.

Tableau 4 : Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium oleander*. (Al-Snafi, 2020 ; Dey, 2020)

Parties de la plante	Composés	Dérivés
Feuilles	Flavonoïdes	Riboflavine, rutine, quercétine, acide chlorogénique, catéchine, épicatechine
	Alcaloïdes	Méthyle 6-dioxy-2-o méthyle, β -d-allopyranoside, cycloheptasiloxane, tétradécaméthyle, cyclooctasiloxane, l'hexadécaméthyle, cyclononasiloxane, l'octadécaméthyle, cyclodécasiloxane, l'eicosaméthyle, Réserpine
	Triterpènes	L'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acide bétulinique, tri terpénoïde, coumaryloxy, triterpénoïdes, nériucoumarique et isonériucoumarique, alpha-neriursate, beta-neriursate, acide oléandiolique, kanerodione, acides nériucoumarique, Isonériucoumarique, la ciskarénine (acide 3 β -hydroxy-28-Z-pcoumaroyloxy-urs-12-en-27-oïque) et la transkarénine
	Glycosides cardiaques	L'oléandrine, l'adynerine, la digitoxigénine, la nériine, les cardénolides, le gentiobiosyl, l'odoroside, le kaneroside et le neriumoside
Fleurs	Huiles	La nériine, la digitoxigénine, l'amorphane, le 1,8-cinéole, l' α -pinène, calarène, limonène, β -phellandrène, terpinène-4-ol, sabinène, isolédène, 3-carène, humulène, β -pinène et cymen-8-ol.
Ecorce et les rameaux	prégnanes	La néridiène A et B

<p>Tous les parties</p>	<p>Cardénolides</p>	<p>16-acetyl neogistonin, adynerin, 5alpha-adynerin, Gentiobiosyladynerin, delta 16-dehydroadynerin, digitoxigenin, oleandroside, gentibiosyl-odoroside A, gentiobiosyl-oléandrine, glucosyl, leandrine, oléandrigénine glucoside, kaneroside, neriaside, nerigoside, jieriumoside, neridiginoside, nerizoside, neritaloside, odoroside-H, 12β-hydroxy-5β-carda-8,14,16,20(22)- tétraénolide , 3 bêta-O-(D-2-O-méthyligitalosyl)-14 bêta-hydroxy-5 bêta-carda-16,20(22)-diénolide , 3 bêta-hydroxy-8,14-époxy-5 bêta-carda-16,20(22)-diénolide , 3 bêta-O-(D-digitalosyl)-14 bêta-hydroxy-16 bêta-acétoxy-5 bêta- carda-20(22)-diénolide , 3 bêta-O-(D-digitalosyl)-14 bêta-hydroxy-5 bêta-carda-20(22)-diénolide, cardénolides N-1, N-2, N-3 et N-4</p>
<p>Différentes Parties</p>	<p>Acides gras</p>	<p>L'acide laurique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidique</p>

8. Propriétés pharmacologiques de *Nerium oleander*

N. oleander est connue par son potentiel toxique et son danger pour les être vivant depuis l'antiquité (**Ceci et al., 2020**). Cependant, *N. oleander* est une plante thérapeutique mentionnée dans plusieurs pharmacopées et est utilisées contre diverses affections dans les anciens systèmes de médecine traditionnelle et folklorique du monde.

N. oleander est dotée de plusieurs activités biologiques antibactériennes, antimicrobiennes, anti-inflammatoire, anti nociceptive et anti tumorale (**Sinha et Biswa, 2016**).

Des recherches prouvent que les différentes parties de la plante sont douées de pouvoir bactéricides. L'extrait éthanolique des racines qui contient un nouveau cardénolide, le 12 β -hydroxy- 5 β - carda-8, 14, 16, 20 (22) -tétraénolide et l'extrait de tiges ont montré une grande efficacité bactéricide contre *pseudomonas aeruginosa* (**Sinha et Biswa, 2016**). Aussi selon les travaux de **Jude, (2013)**, l'extrait des feuilles a montré une zone d'inhibition maximale sur la souche *S. typhi*, et *Staphylococcus aureus*. De même, l'huile des fleurs possède une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* (**Derwich et al., 2010**).

Les extraits éthanoliques de *Nerium oleander* ont le pouvoir de réguler les maladies métaboliques tel que le diabète en diminuant le taux de la glycémie dans le corps (**Sinha et Biswa, 2016**). **Dey, (2020)** a démontré que la partie aérienne de la plante est dotée d'un pouvoir hépato-protecteur en réduisant les transaminases sériques et en normalisant des signes histopathologiques de lésions tissulaires.

En outre, les extraits de la plante sont composés de multiples substances bioactives possédants des propriétés anti-cancéreuses et cytotoxiques tel que l'oléandrine, l'olierigénine et l'aglyconeole qui exercent leurs effets par plusieurs mécanismes comme le blocage de facteur de croissance des fibroblastes -2 (**Seher et al., 2020**). La cytotoxicité de cet arbuste sera discutée en détails dans le chapitre suivant.

9. Toxicité

L'empoisonnement par *N. oleander* est connu depuis l'antiquité : en Inde, avant Jésus-Christ, l'arbuste était appelé *Kajamaraka*, ce qui signifie « l'herbe qui fait mourir les chevaux" (**Sharma et al., 2023**). En effet son pouvoir toxique est distribué dans toutes ses parties car elles contiennent plusieurs glycosides cardiaques digitaux, dont l'oléandrine, la nérine, la digitoxigénine et l'olinerine, dites cardenolites qui sont les plus puissantes. Les moins courant sont la thévétine A, la thévétine B et la nériifoline (**shridhar, 2022**).

L'intoxication par *N. oleander* peut affecter les humains, les animaux et même certains insectes. Elle peut causer la mort suivant la dose létale, porte des dommages au métabolisme et détruire le fonctionnement de plusieurs cellules et organes dans l'organisme.

Pour les animaux la dose létale de *N. oleander* (DL) varie selon les espèces animales. Compte tenu de leurs DL respective, les bovins 50mg/Kg, caprins 110mg/Kg, souris 150mg/Kg, petits ruminants 250mg/Kg (**Ceci et al., 2020**).

Pour les êtres humains, les enfants sont les plus sensibles parce que seulement une feuille pourrait entraîner la mort. Alors que chez les adultes, l'ingestion de 3 à 10 feuilles a été responsable de troubles très sérieux selon les cas ; la dose létale a été estimée à 4 g de feuilles. Une consommation de feuilles supérieure à 0,5 mg/kg causerait la mort d'un sujet insuffisant cardiaque (**Hammiche et al., 2013**). L'ingestion de *N. oleander* responsables sur l'apparition de plusieurs signes et le **tableau 5** représente les différents signes cliniques apparait après ingestion de *N. oleander*.

Tableau 5 : Signes cliniques après l'ingestion de *Nerium oleander*. (**Bruneton, 2021**)

Neurologiques	Inconscience, confusion et troubles visuels
Cardiaques	Hyperkaliémie, bradycardie sinusale, blocs auriculo-ventriculaire, fibrillation auriculaire et/ou ventriculaire
Cutanés	Brulures
Gastro-intestinales	Nausées, vomissement et diarrhée

9.1. Effets toxiques de *N. oleander*

Plusieurs recherches montrent que la plante a des effets néfastes sur les différents organes du corps. Les études de **Shridhar, (2022)** sur les poumons ont révélé des inflammations dans la section du tissu pulmonaire, autour des vaisseaux sanguins et une perturbation de la muqueuse bronchique. En outre, sur le foie, des degrés variables d'hémorragie, de dégénérescence et de nécrose focale des hépatocytes, et d'infiltration de cellules inflammatoires mononucléaires ont été constaté suite à l'ingestion *N. oleander* ainsi qu'une augmentation de l'ALAT et l'ASAT. De même cette plante a des effets sur le cœur, elle induit la dégénérescence des myocytes, des arythmies sinusales et de tachycardie (**Farkhondeh et al., 2020**). Des études expérimentales montrent que la circulation sanguine est aussi affectée par *N. oleander*, en modifiant de manière significative les paramètres hématologiques (les globules rouges, blanc, l'hémoglobine (Hb), les lymphocytes...) et les paramètres sériques (les interleukines, les facteurs de nécrose, les enzymes...). Une diminution des lymphocytes et de volume plaquettaire a été également constaté. Par contre, l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale a (TNF-a), la CK (créatine kinase) et la CK-MB (bande myocardique de la créatine kinase) ont été augmenté (**Dey, 2020**).

Le mécanisme le plus connue responsable sur ses effets toxiques, particulièrement dans le muscle cardiaque est caractérisé par l'inhibition de la "pompe Na⁺/K⁺ ATPase" au niveau de la membrane des cardiomyocytes. Cette inhibition provoque une accumulation intracellulaire de Na⁺, la modification de transport du K⁺ accompagné par une élévation du taux intracellulaire de K⁺ (hyperkaliémie) (**Shridhar, 2022**). L'augmentation intracellulaire de Na⁺ altère les canaux Na⁺/Ca²⁺ ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca²⁺ et donc une libération intense de Ca²⁺ dans le réticulum sarcoplasmique. Le Ca²⁺ cytosolique lié à la troponine-C (protéine de liaison à l'actine) entraîne une contraction de muscle cardiaque et une vasoconstriction. (**Dey, 2020**). La **figure 3** explique l'effet de l'Oleandrin ; un composé majoritaire de *N. oleander* sur la pompe Na⁺/K⁺ ATPase du cœur.

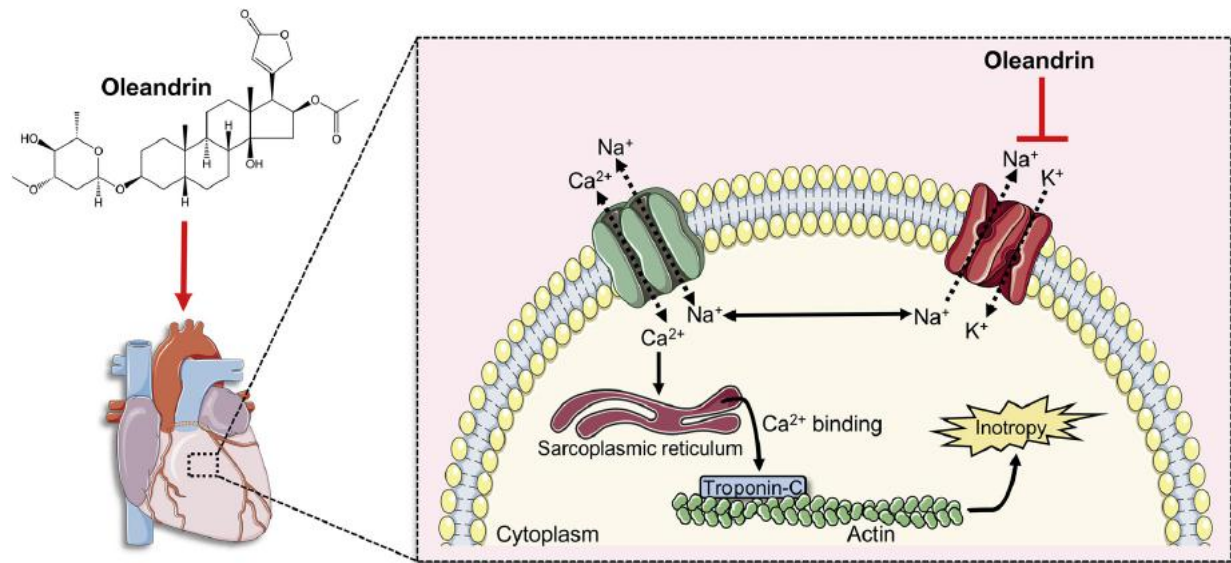


Figure3 : Schéma présentatif du mécanisme d'action d'un glycoside cardiaque (oleandrin) sur les cardiomyocytes (Dey, 2020).

9.2. Cas cliniques de toxicités

L'intoxication de l'être humain par *N. oleander* peut être liée à l'ingestion accidentelle de la plante ou d'une tentative de suicide, tandis que certains cas d'intoxication soient par ingestion ou utilisation externe des différentes parties de la plante ont été liés à l'utilisation pour les vertus thérapeutiques présumées. Et le **tableau 6** représente les différents cas d'intoxication chez les êtres humains et les animaux (Bruneton, 2021).

Le premier rapport de toxicité dû par *N. oleander* remonte à 1866 en Inde, chez un homme de 20 ans, suite à la consommation d'écorce de racine de laurier-rose pour le traitement d'un chancre syphilitique (Dey, 2020).

Bien que *N. oleander* ne soit pas appétissant en raison de son goût amer et piquant, les animaux en pâture peuvent ingérer des parties de l'arbuste dans les zones arides ou pendant la saison sèche lorsque le fourrage se fait rare. Ils peuvent également être intoxiqués après avoir ingéré de l'eau contenant des feuilles tombées ou macérées. Heureusement, le risque d'empoisonnement est réduit par la présence de saponines qui, chez les monogastriques, peuvent provoquer des vomissements et faciliter l'élimination des végétaux toxiques ingérés. (Ceci et al., 2020)

Tableau 6 : Cas d'intoxication par *N. oleander* chez les hommes et les animaux dans différents pays.

Espèce	Type	Pays	N°=	Symptômes	Mort
Animaux	Bovins	Italie (Ceci et al., 2020)		Intoxications et des changements de comportements	1
	Chevaux	Californie (Renier et al., 2013)	30chevaux	Gastro-intestinaux et une arythmie cardiaque.	15
	Caprins	Chili (Flores Olivares et al., 2020)	Troupeaux	Apathie, d'anorexie, de déshydratation	15%
	Chiens	États-Unis (Pao-Franco et al., 2017)	623(entre année2000 et 2004)		6
	Chats	États-Unis (Galton et al., 2020)	Un chat	Vomissement, hypothermique, diarrhée...	0
	Camélidés	Californie (Bruneton,2021)	11 lamas	Insuffisance rénal, troubles gastro-intestinal, une arythmie cardiaque et fibrillation auriculaire	2
Humaine	Enfant	Australie (Oudtshoorn et al., 2020)	Une fillette de 5 ans	Brûlure faciale	0
	Adulte	Maroc (Bruneton, 2021)	2 femmes	Brulures de différents degrés, des érythèmes douloureux et de phlyctènes	0
		France (Bruneton, 2021)	Une femme	Vomissement et perte de connaissance	1
		Turquie (Bavunoğlu et al., 2016)	2 patients	Troubles digestifs et du rythme cardiaque, une hyperkaliémie et une bradycardie	0
		Italie(Plamisano et al., 2015)	Une vieille femme	Une intoxication digitalique, fibrillation auriculaire	0

Chapitre II

Cytotoxicité

de

Nerium oleander

1. Cytotoxicité

La cytotoxicité est la capacité d'un agent chimique ou biologique à provoquer des dommages et des détériorations fonctionnelles des cellules afin de causer leur destruction. Ce mal fonctionnement peut provoquer ce qu'on appelle la lésion cellulaire qui est une altération fonctionnelle et structurelle des cellules résultant d'un mal compensation des mécanismes physiologiques normaux. Les lésions cellulaires peuvent être réversibles ; c'est le cas de la dégénérescence cellulaire, ou irréversible c'est le cas de la mort cellulaire. La mort cellulaire peut arriver suite à deux processus différents : la nécrose (la mort accidentelle) et l'apoptose (la mort programmée). Les cibles biologiques des agents cytotoxiques diffèrent à plusieurs niveaux **(Bensakhria ,2018)**

- Au niveau des membranes cellulaires résultant des diverses altérations dont la peroxydation lipidique et la perte de la perméabilité sélective de la membrane plasmique.
- Au niveau des mitochondries, en inhibant la phosphorylation oxydative, la bêta-Oxydation des acides gras, la respiration cellulaire, et par conséquent, entraînant une chute de la concentration en ATP. Au niveau des lysosomes, par inhibition des capacités de dégradation de la cellule.
- Au niveau de l'information génétique par la provocation des mutations.

La cytotoxicité peut être évaluée selon plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo*. Les méthodes *in vitro* s'effectuent sur des tissus, des organes ou des cellules isolées, reposent sur la détection de la viabilité cellulaire en utilisant des colorants comme le test de rouge neutre et bleu de trypan, ou sur la mesure de la capacité métabolique des cellules comme le test MTT et Prestoblue **(Kamiloglu et al., 2020)**. Il existe aussi d'autres tests qui reposent sur la mesure de l'activité de l'enzyme de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire et d'autre sur la mesure de l'ATP. D'autre part, les méthodes *in vivo* de cytotoxicité sont pratiquées sur les modèles animaux, particulièrement les rats et les souris, comme le test Brdu-ELISA et le test CAM de l'embryon de poulet **(Ribatti, 2017 ; Oh et al., 2022)**

2. Cytotoxicité de *Nerium oleander*

Des études *in vitro* et *in vivo* réalisées sur les extraits de *N. oleander* ont révélé que les métabolites secondaires contenus dans la plante sont dotés d'un pouvoir cytotoxique important, particulièrement les glycosides cardiaques comme l'oléandrine. Ce dernier est le major composé bioactif de la plante, connu par son effet antiprolifératif **(Ayouaz et al., 2023)**. En

effet, divers mécanismes ont été proposés pour comprendre le mode de fonctionnement des extraits. Ces mécanismes comprennent l'inhibition de la glycoprotéine P (protéine de résistance aux médicaments), l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR (**PI3K** : enzyme PI3kinase, **Akt** : protéine kinase B ou PKB, **mTOR** : enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases) (**Brotelle et Olivier Bay., 2015**), et aussi l'induction des dommages à l'ADN (**Bao et al., 2016**), ainsi que d'autres mécanismes pro-apoptotiques. Pour confirmer ces mécanismes les chercheurs réalisent des études *in vitro*, *in vivo* et même des cliniques (**Sharma et al., 2023**).

a) *Nerium oleander* et l'induction d'apoptose

D'après les résultats des études précédentes réalisées par certains chercheurs, *N. oleander* a un effet sur l'induction de l'apoptose dans plusieurs carcinomes (**Ma et al., 2016**). L'apoptose se produit dans des conditions physiologiques et pathologiques (**Brown et al., 2014**). Dans le cancer, il y a une perte d'équilibre entre la division et la mort des cellules, ce qui donne des cellules malignes plus résistantes (**Wong et Research, 2011**). Des études *in vitro* et *in vivo* ont été effectuées pour démontrer l'enchaînement du mécanisme exact de l'induction de l'apoptose par *N. oleander*. **Pan et al. (2017)** ont rapporté que l'oléandrine réduit l'expression protéique de la pro-caspase-9 et de la pro-caspase-3 dans la lignée SW480 du cancer colorectal. En parallèle, les activités de la caspase-3 et de la caspase-9 ont été augmentées ce qui prouve que la pro caspase 9 a été transformée en caspase 9 active et cette dernière a induit l'activation de la procaspase 3 en caspase 3. Dans le même contexte, il a été démontré aussi que les glycosides cardiaques inhibent les pompes Na⁺/K⁺-ATPases de la membrane plasmique, ce qui entraîne une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, accompagné d'une augmentation de l'expression protéique de BAX et de cyt C dans le cytosol, ce qui conduit à la formation d'apoptosome induisant l'apoptose par la voie mitochondriale.

Dans un autre contexte, il a été rapporté que l'oléandrine est capable d'induire des dommages directs à l'ADN comme le montre l'étude réalisée par **Bao et al. (2016)** sur les cellules A549 du cancer de poumon. Les auteurs de cette étude ont confirmé que l'oléandrine peut induire de manière significative la formation de plusieurs foyers de la protéine γ H2AX (un marqueur de détection des cassures double-brin de l'ADN (DSB) dans les cellules cancéreuses ainsi que la diminution des niveaux de RAD51 impliquée dans la voie de réparation des cassures par recombinaison homologue ce qui empêche la réparation des lésions et conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses.

D'autre part, **Hu et al. (2021)** ont montré l'effet cytotoxique de l'oléandrigénine-3-O- β -D-diginoside dérivé d'odoroside A sur la prolifération et l'invasion cellulaire, elle provoque l'augmentation des ROS dans les cellules cancéreuses, particulièrement dans les mitochondries. Cette augmentation modifie la perméabilité mitochondriale et induit la réduction de la MMP (métalloprotéase matricielle de la famille des protéases) et l'inhibition de l'expression des Bcl2 (Protéine anti-apoptotique inhibe la libération de cytochrome C) induisant ainsi la libération de cytochrome C et le facteur induisant l'apoptose (AIF) dans le cytoplasme. Le cytochrome C libéré participe à la formation d'apoptosome (complexe protéique) qui provoque l'activation de la caspase 3. En même temps l'augmentation des ROS provoque aussi l'activation des membres de la famille des protéines kinases (MAPK), précisément, la voie JNK, en raison de sa capacité à traduire les signaux de stress oxydatif. Cette activation induit aussi l'activation de la caspase 9, puis la caspase 3 qui clive la PARP (Poly ADP – ribose polymérase) et déclenche l'apoptose. En outre, l'activation de la voie JNK provoque la formation de LC3B (Chaîne légère 3 nécessaire pour l'élongation et la maturation de l'autophagosome) qui déclenche ainsi l'autophagie (mort cellulaire type II). La **figure 4** présente les mécanismes moléculaires cytotoxiques liés à la production des ROS induites par l'oléandrigénine-3-O- β -D-diginoside sur la cellule cancéreuse.

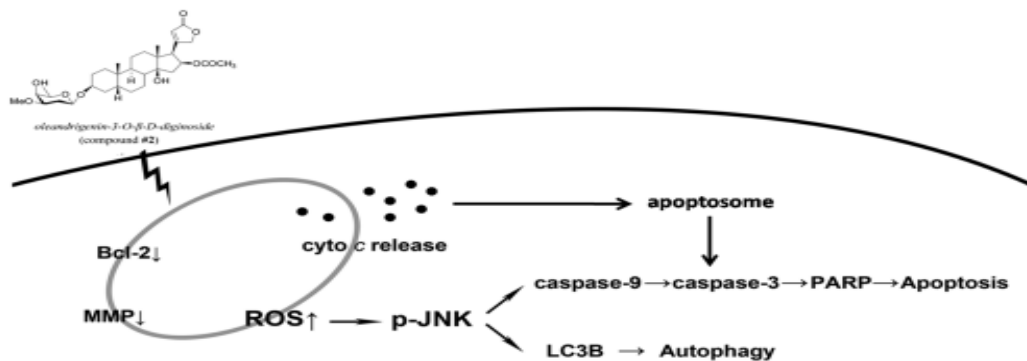


Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de l'oléandrigénine-3-O- β -D-diginoside (**Hu et al., 2021**).

b) *Nerium oleander* et l'arrêt de l'invasion

Des expériences ont été réalisées par **Ko et al. (2018)** sur la lignée cellulaire humaine du cancer du sein MDA-MB-231 et par **Ramu et al. (2021)** sur un modèle de cancer de la poche buccale chez hamster, pour déterminer l'effet d'un glycoside cardiaque (oleandrine) ou d'un alcaloïde (résérpine) respectivement sur l'invasion cellulaire.

L'oleandrine a provoqué l'inhibition du phospho-STAT-3 (un facteur de transduction et d'activation des signaux de transcription), ce qui a conduit à la réduction de manière significative de l'expression des marqueurs de cellules souches cancéreuses (d'OCT3/4) qui favorisent la migration des cellules atteintes. L'oleandrine a provoqué aussi la réduction de l'activité de MM-9 (metalloprotéinase matricielle 9) qui joue un rôle important dans la vascularisation de la tumeur, ce qui engendre l'arrêt de la propagation vers d'autres cellules ou organes.

Dans des conditions pathologiques, le DMBA est un cancérigène qui peut phosphoryler le TGF- β (facteur de croissance transformant β) et ses régulateurs en aval (Smad 2, 3, 4 et snail) qui permet la modulation des protéines de réparation d'ADN (ERCC1, XPF, Ku70 et DNA-Pkcs) et aussi la modulation de la cycline D, Il-6, Mcl-1, PCNA et HIF-1 α , qui sont responsables de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses, tout en empêchant l'apoptose et la résistance aux médicaments anticancéreux. Le traitement des animaux porteurs de la tumeur par la réserpine confirme qu'elle liée au domaine sérine/tyrosine kinase du récepteur TGF- β , inhibe la phosphorylation de Smad 2,3,4 et bloquant ainsi l'activation du complexe Smad3/Snail et la translocation nucléaire de Smad2/4. Cette inhibition provoque une diminution de l'expression des protéines de réparation de l'ADN et aussi la réduction de l'expression de la cycline D1, de la PCNA, HIF-1 α , IL6 et la MCL1 qui accompagné par une augmentation de la protéine pro-apoptotique Bax dans les cellules OSCC (carcinome épidermoïde de la bouche), l'augmentation de Bax conduit à la libération de cytochrome C (molécules pro-apoptogène) des mitochondries vers le cytosol qui est responsable à l'activation des caspases 9 et 3 qui favorise la mort des cellules cancéreuses suivie par le clivage de la PARP. Donc elle atténue la résistance des cellules cancéreuses aux médicaments et inhibe la prolifération et l'invasion cellulaire afin d'induire l'apoptose. Ces résultats illustrent que la réserpine est un candidat efficace pour la chimiothérapie anticancéreuse. La figure 5 résume l'effet de la réserpine sur la cellule cancéreuse.

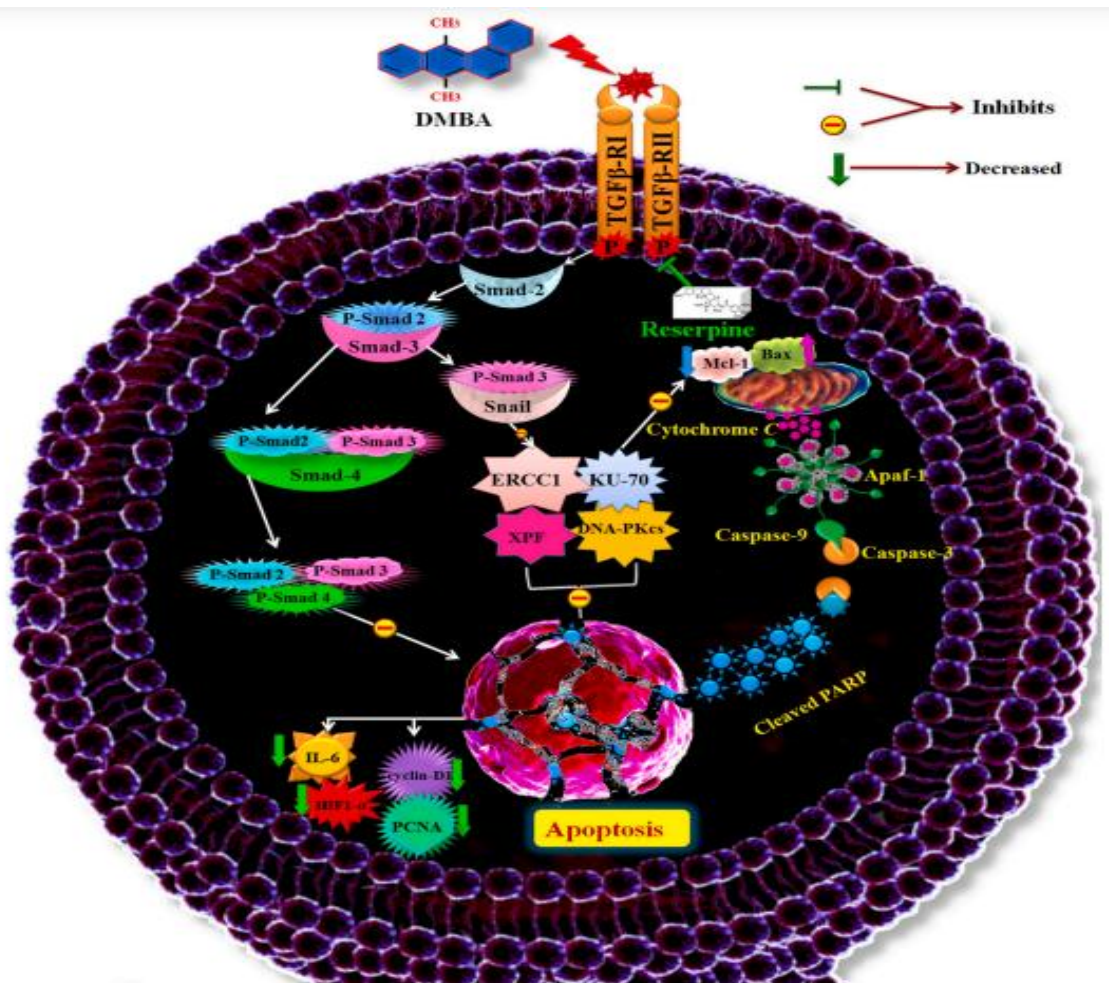


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la réserpine dans le cancer de la poche buccale du hamster induite par le DMBA (Ramu et al., 2021). L'administration orale de réserpine inhibe la phosphorylation de Smad2/3/4 médiée par le TGFβ et donc bloquer l'activation de Smad3/Snail et la translocation nucléaire de Smad2/4. L'atténuation de ces processus entraîne l'épuisement des capacités des protéines de réparation de l'ADN (ERCC1, XPF, Ku70 et DNA-PKcs), la réduction de l'expression de la cycline D1, de la PCNA, de l'HIF-1α, de l'IL-6 et de la Mcl-1. Ainsi, la résistance aux médicaments, la prolifération cellulaire, l'invasion et l'induction de l'apoptose dans l'OSCC

c) *Nerium oleander* et l'inhibition de la croissance et la prolifération

Parmi les nombreuses voies de signalisation de la cellule cancéreuse, la voie PI3K-AKT-mTOR qui joue un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.

Une étude a été réalisée par Pan et al. (2015) pour étudier l'efficacité antitumorale du PBI-05204, un extrait au CO₂ de l'oléandrine, sur un modèle orthotopique de cancer du pancréas humain Panc-1. Les résultats montrent que le PBI-05204 a inhibé significativement la dissémination péritonéale et la prolifération des cellules Panc-1 implantées orthotopiquement chez la souris *nude* et a induit l'apoptose. En outre, le PBI05204 a significativement réduit

l'expression des biomarqueurs de PI3k relatifs aux voies PI3k/Akt et mTOR *in vivo* et *in vitro*, ce qui indique que le PBI-05204 cible les composants de la voie PI3k/Akt/mTOR pour inhiber la croissance des tumeurs primaires (**Pan et al., 2015**).

d) Etudes cliniques sur *Nerium oleander*

Plusieurs études cliniques ont été réalisées sur *N. oleander* chez des patients atteints de certains types de cancer, parmi lesquelles l'étude réalisée par **Mekhail et al. (2006)** sur l'AnvirzelTM. Ce dernier, est un extrait aqueux de la plante *N. oleander*, il a été utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs malignes à un stade avancé. Cette étude a fait état d'un essai de phase 1 visant à déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la sécurité d'AnvirzelTM chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires. Les résultats de cette étude ont montré que la plupart des patients ont ressenti une légère douleur au point d'injection. Les autres indices toxicités comprenaient la fatigue, les nausées et la dyspnée. Aucune toxicité limitant la dose n'a été observée.

Une autre étude réalisait par **Hong et al. (2014)**. Cette étude a évalué le PBI-05204 administré par voie orale à des patients atteints d'un cancer avancé afin de déterminer l'innocuité, la dose recommandée pour la suite de l'étude et le profil pharmacocinétique et l'effet du PBI-05204 sur l'expression tumorale des régulateurs clés des cellules tumorales PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) et les biopsies tumorales. Les résultats montrent que l'inhibition de la voie mTOR soit un mécanisme par lequel le PBI-05204 est supposé agir. Aucune toxicité métabolique telle que l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie n'a été observée dans cette étude. Cela peut s'expliquer en partie par le fait que le PBI-05204 est un inhibiteur de mTOR, bien que d'autres mécanismes d'action soient également évidents. Une régulation à la baisse de pAkt et de l'effecteur mTOR pS6 a été observée chez certains patients, ce qui suggère que le PBI-05204 est capable d'inhiber les voies oncogènes de signalisation cellulaire PI3kinase/mTOR.

Une étude de phase II, a été menée pour déterminer l'efficacité du PBI-05204 chez les patients souffrant de l'adénocarcinome canalaire pancréatique métastatique (ADPm) réfractaire. Une réponse objective a été observée pendant 162 jours. Des effets indésirables de grade ≥ 3 liés au traitement sont survenus chez 63,2 % des patients les plus fréquents étant la fatigue, les vomissements, les nausées, la diminution de l'appétit et la diarrhée (**Roth et al., 2020**).

Partie

Expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

1. Matériel

Le matériel et les réactifs utilisés sont démontrés dans l'annexe 2.

2. Méthodes







2.1. Récolte de la plante

La récolte de *Nerium oleander* a été effectuée durant le mois d'avril 2023 au siège de l'université de Mohammed Seddik ben-Yahia de la wilaya de Jijel, seulement la partie supérieure « fleurs et feuilles » a été collectée et transportée immédiatement au laboratoire de l'université pour le séchage.

2.2. Séchage et broyage

Le matériel végétal récolté a été rincé avec l'eau distillé pour enlever toute impureté et poussière puis séché dans l'étuve à température 50°C pendant 2 jours. Lorsque les échantillons ont devenu coriaces ils ont été broyés séparément en utilisant un broyeur électrique afin d'obtenir une poudre fine (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Etapes de préparation du matériel végétal pour extraction

Nom de la plante	La partie récoltée	Etat frais	Etat sec	Etat poudre
<i>Nerium oleander</i>	Feuilles			
	Fleurs			

2. 3. Préparation des extraits

2.3.1. Préparation de l'extrait aqueux de *Nerium oleander*

La préparation de l'extrait aqueux de *N. oleander* a été effectuée selon le protocole décrit par **Chevan et al., (2013)** en portant quelques modifications. 10g du broyat (poudre de feuilles) ont été mélangé avec 100ml de l'eau distillée, le mélange a été chauffé sur plaque chauffante à 100 °C pendant 1h jusqu'à l'ébullition puis une filtration a été réalisée, le filtrat a été récupéré et évaporé sous vide à 95°C puis séché dans l'étuve à 50°C. L'extrait récupéré a été pesé et conservé dans des boite en verre jusqu'à l'utilisation ultérieure.

2.3.2. Extraction par alcool acétique

La préparation de l'extrait acétique a été réalisée suivant le protocole de (**Khan et al., 2010**) avec modification. Une macération de 3g de poudre de feuilles avec 100 ml de l'acide acétique à 20% dans l'éthanol a été réalisé pendant 4h puis la préparation a été filtré sur papier et le filtrat récupéré a été concentré sur une plaque chauffante jusqu'à l'obtention de 1\4 du volume initial. Ensuite, une titration par le HNO₃ a été effectué jusqu'à la couleur de l'extrait se fixe en noir. Le précipité a été récupéré par centrifugation à 9000g pendant 15 min puis pesé et conservé à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation ultérieure.

2.3.3. Préparation de l'extrait méthanolique

La préparation de l'extrait méthanolique a été réalisée suivant la méthode décrite par **Budić-Leto et al., (2005)**. 3 g de poudre des feuilles ont été macérées dans 100 ml du méthanol pur avec agitation pendant 24 heures. Après filtration, le macérât a été évaporé sous vide à 64°C jusqu'à l'obtention d'une matière sèche. L'extrait sec a été pesé et conservé à l'abri de la lumière jusqu' à utilisation ultérieure.

3. Détermination de rendement d'extraction

Le rendement des différents extraits a été défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après évaporation du solvant et la masse initiale de la poudre végétale utilisée. Ce rendement est calculé par l'équation suivante :

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

R% : Rendement des extraits exprimé en pourcentage (%).

M1 : la masse de l'extrait sec.

M0 : la masse de la poudre végétale.

4. Caractérisation phytochimique

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phospho-tungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur la réduction de Folin- Cobalteux par les composés phénoliques qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxydes métalliques de tungstène et de molybdène de couleur bleue.

Dans la présente étude, 50µl de chaque extrait(1mg/ml) ont été mélangé avec 250µl du réactif de Folin ciocalteu (10%), ce mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min, ensuite 200µl de la solution carbonate de sodium (Na₂CO₃) (7%) a été ajouté avec 750µl de l'eau distillé. Le mélange a subi une agitation et incubation pendant 30min à l'obscurité. La concentration des polyphénols totaux a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard à une gamme de concentration (1mg/ml ; 0.5mg/ml ; 0,2 mg/ml 0,12mg/ml et 0.06 mg/ml).

4.2. Dosage de flavonoïdes

Pour effectuer ce dosage, la méthode décrite par **Djeridane et al., (2006)** a été utilisée avec quelques modifications. Le principe de ce dosage repose sur la réaction de trichlorure d'aluminium AlCl₃ avec le groupe cetonique C-4 et avec le groupe d'hydroxyle de carbon C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols ou il forme un complexe acide stable. D'autre part le chlorure d'aluminium forme des complexes acides labiles avec les groupes orthodihydroxyl dans le cycle A ou B de flavonoïdes. Une coloration jaune indique la formation de ces complexes (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Le milieu réactionnel a été constitué de 500µl de chaque extrait ou de la quercétine a une gamme de concentration (5 µg/ml ; 10 µg/ml ; 25 µg/ml ; 50 µg /ml ;75 µg/ml ; 100 µg/ml ; 200 µg/ml) et 0,5 ml de la solution d'AlCl₃ 2 %. Après incubation d'une heure, l'absorbance

a été mesurée à la longueur d'onde de 420nm. La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux a été déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établis par la quercétine comme standard.

4.3. Dosage des alcaloïdes

Dans ce dosage la méthode décrite par **Durik et al., (1950)** a été suivie en portant des modifications. 300µl de chaque extrait ou de la nicotine à différentes concentrations ont été mélangés avec 500µl de tampon phosphate (Ph =5.2) et 250µl de pourpre de bromocresol. Ensuite, une extraction à volumes successif par chloroforme (500 ,1000 ,1500 µl) a été faite. 3 ml de NaOH (0,1 M) ont été ajouté à la phase organique récupérée et incubés pendant 1 heure. Ensuite, la phase aqueuse a été récupérée suivi par la lecture d'absorbance à 470 nm. La quantification des alcaloïdes totaux a été établie en fonction d'une courbe d'étalonnage en utilisant la nicotine comme standard.

4.4. Détection des glycosides cardiaques

Pour l'analyse qualitative des glycosides cardiaques on a utilisé la méthode décrit par **Morsy, (2017)**, un volume de 3000µl de chaque extrait a été mélangé avec 1500µl d'acide acétique ,200µl H₂SO₄ et 200µl de FeCl₃, le changement de couleur a été observé et la formation d'une couleur verte a été considérée comme un test positif pour les glycosides cardiaques.

4.5. Dosage des métaux lourds

Pour le dosage des métaux lourds accumulées dans les feuilles et les fleurs de notre plante *N. oléander* on a utilisé la méthode décrite par **Kebir et al. (2014)**

Un volume de 1000µl d'acide sulfurique, 3000µl d'acide nitrique et 3000µl de l'eau oxygéné H₂O₂(30%) ont été ajoutés à 0,5 g de poudre des feuilles ou des fleurs, les préparations ont été met sur un bain à sable à 120°C pendant 15 min après ébullition les extraits ont été filtrés et le volume a été ajusté à 20ml avec l'eau distillé. Le dosage de plomb et de cadmium a été mesuré par spectrométrie d'absorption atomique (SAA), en unité de : "ppm".

5. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

5.1. Teste de DPPH

Le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune en présence des piègeurs de radicaux libres. La réduction du radical libre DPPH° par un

antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- visible. Pour réaliser ce teste on a effectué le protocole décrit par **sirivibulkovite, (2018)** avec des modifications.

Un volume de 50µl de chaque extrait ou de l'acide ascorbique ont été ajouté à 450µl de la solution éthanolique de DPPH (2 mM), puis incubé 45min à l'abri de lumière. La lecture en spectromètre a été effectuée à la longueur d'onde de 515 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité en fonction de concentration, calculés selon l'équation suivante :

Le pourcentage de l'activité= (Densité optique de blanc- Densité optique de l'échantillon/ Densité optique de blanc) X 100.

5.2. Teste de capacité antioxydante

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait (un composé antioxydant) pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide. (**Ahmad et al., 2013**).

Un volume de 100µl de chaque extrait à différentes concentrations ou de l'acide ascorbique comme référence ont été mélangés avec 1000µl de solution composée de 0,6 M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium. Les tubes contenant la solution de réaction ont été incubés au bain-marie à 95°C 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 calculées.

5.3. Détermination de l'activité chélatrice du fer

La chélation du fer est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine. Pour évaluer la capacité de chélation d'un composé donné, le composé stabilisant le plus couramment utilisé est le ferrozine, qui forme un complexe ferrozine- Fe^{2+} de couleur violet foncé avec le fer libre présent dans le milieu réactionnel. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration en fer connue renseigne sur la quantité de fer non chélaté et la capacité du composé à chélater cet élément. Plus la solution contenant le composé à tester est claire, plus la chélation est importante. (**Zhao et Truhlar, 2006**)

Suivant le protocole décrit par **Dinis et al., (1994)**, un volume de 100µl de chaque extrait ou de standard EDTA de concentration (1000µg/ml) ont été ajoutés à 20 µl de FeSO₄ et 1360 µl de tampon phosphate (PH=7,4). Après une agitation, 20 µl de ferrozine ont été additionnées. Le mélange a été incubé pendant une heure à température ambiante et l'absorbance des solutions résultantes a été mesurée à 562 nm.

6. Evaluation de l'activité cytotoxique

6.1. Teste de dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est un phénomène conçu pour la dégradation des structures tertiaires et secondaires due à des agents dénaturants. La chaleur et le PH sont considérés comme des influenceurs sur cette dénaturation des protéines (**Adarsh et al., 2011**).

En raison d'apprécier le caractère cytotoxique *in vitro* des différents extraits de *N. oleander*, le prototype de dénaturation de l'ovalbumine a été choisi pour évaluer l'effet des extraits méthanolique, aqueux et acétique sur la dénaturation de la protéine (effet cytotoxique)

Deux méthodes ont été réalisées, dans l'une le HCl a été utilisé comme agent dénaturant de référence, et dans l'autre l'effet des extraits a été combiné à l'effet dénaturant de la température. Le premier protocole a été effectué suivant **Sava et al., (2021)** avec quelques modifications. 1000µl d'ovalbumine préparée dans le tampon phosphate (ph = 7.6) a été mélangées avec 100µl de chaque extrait avec ou sans HCl. Une incubation de 2h à température 37°C a été effectuée suivi par la lecture de l'absorbance à la longueur d'onde 439 nm. Un control a été préparé dans les mêmes conditions contenant l'éthanol ou l'eau au lieu des extraits.

Pour évaluer l'effet des extraits sur les protéines à température élevé, on a suivi la méthode de **Mondal et al., (2015)** avec modifications. 1000ul de l'ovalbumine avec 100µl de chaque extrait ont été mélangés puis incubés 2h à température 55°C, puis une mesure d'absorbance a la longueur d'onde de 439 nm a été réalisée.

Le pourcentage de dénaturation d'ovalbumine est exprimé par l'expression suivante :

% de dénaturation d'ovalbumine = (Densité optique d'échantillon-Densité optique de contrôle / Densité optique d'échantillon) X 100

6.2. Effet des extraits sur la trypsine

L'évaluation de l'effets des extraits sur l'activité de la trypsine a été effectué par la méthode de **Truong et al., (2019)** avec quelques modifications.

100µl d'échantillon ou standard (acide salicylique 1mg/ml) ont été ajoutés à un mélange réactionnel contenant 100µl de tampon phosphate (PH=9) avec 0,25ml de trypsine. Ce mélange a été incubé dans le bain marie à 37°C pendant 15min. Après incubation 400µl de la caséine (1% diluée dans l'eau distillé et incubée à 100°C pendant 90min) a été ajouté suivi par une autre incubation pendant 1heure à 37°C, puis 200µl de TCA ont été ajouté pour bloquer la réaction, et le mélange réactionnel a subi une centrifugation de 16000 g pendant 20min. Le surnageant a été récupéré et l'absorbance de surnageant a été mesurée à 280 nm. Un control a été préparé dans les mêmes conditions contenant l'eau ou l'éthanol au lieu des extraits. Le pourcentage d'inhibition de la protéinase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

% d'inhibition de la trypsine = (Densité optique de control- Densité optique de l'échantillon/ Densité optique de control) X 100

6.3. Test de peroxydation lipidique

L'évaluer de l'effet inducteur ou inhibiteur des différents extraits sur la peroxydation lipidique a été testé sur l'homogénat du foie de rat 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. Pour la préparation de l'homogénat du foie, 2g de foie ont été rincé et homogénéisé dans 20ml de tapon phosphate froid (PH=7,4, KCl 1,5 %). Une centrifugation de l'homogénat pendant 15 min à 4000g a été effectuée. Le surnageant a été récupéré dans un flacon pour l'utiliser comme matrice biologique pour l'induction de la peroxydation lipidique *in vitro*.

Pour tester la puissance d'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de *N. oléander*, 100µl de chaque extrait ou de la quercitrine(1mg/ml) ont été ajouté à 300µl de l'homogénat de foie et 250µl de tampon phosphate et incubés pendant 90 min à 37 °C avec agitation. Un control positif de peroxydation contenant FeSO₄ et de l'acide ascorbique a été préparé et incubé dans les mêmes conditions.

À la fin de l'incubation, 1000µl de TBA 67% préparé dans le TCA 10% ont été ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange a été incubé à 95°C pendant 1 heure et centrifugé à 4000g pendant 15min. L'absorbance du surnageant récupéré a été mesurée à 532 nm.

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

% d'inhibition de la peroxydation lipidique = (Densité optique de control- Densité optique de l'échantillon/ Densité optique de control) X 100

Pour évaluer le taux d'induction de la peroxydation lipidique par les extraits de *N. oleander*, le même protocole précédent a été suivie avec la préparation d'un contrôle négatif de référence qui ne contient ni FeSO₄ ni acide ascorbique ni extrait a été préparé également dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'induction de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante : **% d'induction de la peroxydation lipidique = (Densité optique de l'échantillon - Densité optique de control négatif / Densité optique de l'échantillon) X 100.**

6.4. Test de catalase

L'effet de l'extrait de *N. oleander* sur la catalase a été évalué selon la méthode de **J-Ruch et al., (1989)** avec quelques modifications.

La fraction cytosolique a été préparée par le broyage de 138mg de cœur de souris avec le tampon phosphate (100 mM, pH 7,4), l'homogénat a été ensuite centrifugé à 700g pendant 10min, puis le surnageant a été récupéré et centrifugé une deuxième fois à 10000g pendant 10min et récupéré dans un tube et conservé à -32C° jusqu'à utilisation ultérieure.

L'eau oxygéné à la concentration 40mM a été préparé dans le tampon phosphate (PH=7,4 et 0,1 M). Dans une cuve en quartz 50µl de la fraction cytosolique, 100µl de chaque extrait ou de NaCN (2mg/ml) et 1300 µl de H₂O₂ (40Mm) ont été incubé pendant 5min. Un contrôle a été préparé par l'éthanol ou l'eau dans les mêmes conditions. La DO a été enregistré chaque 30 seconde pendant 5 min à la longueur d'onde 240 nm. L'activité de la catalase a été calculé selon l'équation :

Activité de la catalase=[2,303/T*LOG(A₁/A₂)] /g de protéines

t : intervalle de temps en minute

A₁ : Absorbance à la première minute

A₂ : Absorbance à la deuxième minute

6.5. Test de la prolifération cellulaire

On vise par ce test à évaluer la capacité des différents extraits à inhiber la prolifération cellulaire *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 été utilisées dans cet essai. Les cellules ont été cultivées dans un tube à essai rempli de milieu nutritionnel (glucose à 2 %, 1 % de peptone et 1 % d'extrait de levure) à 30 °C pendant 16 h. Le tube à essai a été dégazé et scellé pendant la culture et agité de temps en temps. En suite les cellules ont été lavées deux fois à l'eau distillée par centrifugation, et l'absorbance de la suspension des cellules de levure a été ajusté à 1 à 600 nm avec du milieu nutritionnel.

1000µl de la suspension de levure a été mélangé avec 100µl de chaque extrait ou de NaCN (2mg/ml) comme agent cytotoxique de référence. Un control a été préparé dans les mêmes conditions contenant l'éthanol ou l'eau au lieu des extraits. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 1 h à 37°C au bain marie. La lecture de DO a été effectuée à différents points de temps (1h, 2h, 24h) à 600nm.

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

6.6. Test de cytotoxicité

La suspension cellulaire de levure a été préparée comme décrit au protocole précédent, l'absorbance de la suspension des cellules de levure a été ajusté à 1 à 600 nm avec l'eau distillée. Le protocole de **Yamashoji et al., (2020)** a été suivi pour l'évaluation de la cytotoxicité des extraits sur les cellules de levure.

Un volume de 100µl de chaque extrait ou NaCN a été mélangé avec 1000µl de suspension de levure et incubé au bain marie à 37°C pendant une heure. Le mélange a été centrifugé à 6000 g pendant 5 min et le sédiment a été suspendu avec 1000µl d'eau distillée. Les cellules de levure ont été lavées deux fois avec 1000µl d'eau distillée et les cellules précipitées ont été remises en suspension avec 1000µl d'eau distillée. Ensuite 8µl de rouge de méthyl, 20µl de kcl, 12µl NaOH ont été ajoutés à la suspension et mélangés, enfin 20µl de glucose a été ajouté au mélange et l'absorbance a été lue à 600nm. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon l'équation :

Pourcentage de cytotoxicité (%) = ((DO contrôle-DO échantillon) /DO contrôle) *100

6.7. Détermination de l'acidification induite par le glucose

Le principe de ce test repose sur la détection de l'acidification induite par le glucose. Cette activité est dépendante de la pompe membranaire des protons H⁺-ATPase, qui exporte les protons cellulaires et génère un gradient chimique transmembranaire de H⁺ (milieu acide à l'extérieur). On vise par ce test de déterminer l'effet inhibiteur des extraits de *N. oleander* sur la consommation de glucose par la détection de l'acidification induit par le glucose en utilisant le rouge de méthyl comme indicateur de pH (rouge à pH inférieur à 4,4, jaune au-delà de 6,2 et orange entre les deux)

La suspension cellulaire de levure a été préparé et ajusté comme décrit au protocole précédent. Pour l'évaluation de l'inhibition de la consommation de glucose par les extraits de *N. oleander* on a utilisé le protocole décrit par **Yamashoji et al., (2020)** avec modifications.

1000µl de la suspension de cellules de levure a été incubée pendant 1 minute après que d'elle ait été mélangé à 8µl de rouge de méthyl ,20µl de kcl, 12µl NaOH et 100ul de chaque extrait ou d'NACN (2mg/ml). Après agitation de ce mélange, 20µl de glucose 1 M ont été ajoutés à la suspension de cellules de levure, et le changement d'absorbance à 527 nm a été lue cinétiquement pendant 5 minutes.

6.8. Dégradation de l'ADN

On vise par ce test à déterminer la capacité des trois extrais à dégrader l'ADN. Pour cela, le protocole d'extraction d'ADN de **Harju et al., (2020)** a été utilisé avec quelque modification.

La suspension de levure a été incubée pendant 24h avec le milieu nutritionnel puis cultivé avec les extraits de *N. oleander* ou NaCN pendant 48h.

1500µl des mélanges de la suspension ont été centrifugés pendant 10min à 16000 g, 200 µl de tampon de lyse (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl,10 mM Tris-HCl, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a été ajouté à la suspension. Les tubes ont été placés dans un bain de glace (-32°C) pendant 15 min (jusqu'à ce qu'ils soient complètement congelés), puis les transférer au bain marié à 95°C pendant 1 min et l'opération a été répétées deux fois successives, les tubes ont été agité au vortex pendant 30secondes. 200 µl de chloroforme ont été ajouté et mélangé au vortex pendant 2 min. Une centrifugation de 3 min à 16000 g a été réalisée et la phase aqueuse supérieure a été transférée dans des ependorf contenant 400µl

d'éthanol 100 % glacé et mélangé par inversion. Les échantillons ont été laissés à précipiter 5 minutes à température ambiante, puis centrifugés 10 min à 16 000g. Les surnageants ont été aspirés sous vide à l'aide d'une pipette pasteur et les culots d'ADN ont été lavés avec 500µl d'éthanol à 70 %, puis séché 5 min dans l'étuve à 60°C. L'ADN a été remis en suspension dans 25 µl de Tampon EDTA, Tris [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)], mélangé bien et conservé au froid.

Pour la détection d'ADN, le gel d'agarose a été préparé avec 50ml de tampon TBE et mélangé avec 0.5g d'agarose, le mélange a été fondé avec agitation jusqu'à l'homogénéisation. Après refroidissement il a été mélangé avec 50µl bromure de méthyl. Le gel a été coulées dans la cuve et laissé refroidis 20min. la cuve a été remplis avec tampon TBE .10µl d'ADN a été mélangé avec 1µl de colorant de charge et a été met dans les puis de gel d'agarose, les électrodes ont été met sous tension et la migration d'ADN commence (à un voltage 100V pendant 1h et30min). Pour la révélation des bandes d'ADN le gel a été met sous une appareil d'UV (marque : VILBER LOURMAT, longueur d'onde :312nm)

7. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont exprimés en moyennes standard d'erreur (SD). Une analyse statistique a été effectuée par le test ANOVA suivi d'une multi comparaison t-student en relation avec le groupe de référence. Le degré de signification a été déterminé à ($P < 0,05$). Les logiciels Excel 2016 et Graph Pad 2009 ont été utilisés pour réaliser les divers calculs et essais statistiques.

Chapitre II

Résultats

et

discussion

1. Rendement de l'extraction des différents extraits

L'extrait brut de la plante a été préparé par la méthode de décoction alors que l'extrait acétique a été préparé par la méthode de l'alcool acétique tandis que l'extrait méthanolique a été préparé par une macération pendant 48 heures. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau (8)**

Tableau 8 : Rendement de différentes méthodes d'extraction des feuilles de *Nerium Oleander*

Echantillon	Masse initial (g)	Masse final (g)	Rendement (%) \pm Ecart-type
Extrait acétique	3	2,33	77,66%
Extrait méthanolique	4,5	0,43	9,55% \pm 0,111505
Extrait aqueux	20	0,81	4,05% \pm 0,190919

On remarque que le rendement d'extraction est variable entre les trois extraits de la plante, dont la plus haute valeur appartient à l'extrait acétique avec un pourcentage de 77% suivi par l'extrait méthanolique qui a montré un pourcentage de 9.55% tandis que la plus faible valeur revient à l'extrait aqueux avec un pourcentage de 4.05%.

2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux

L'étude quantitative menée sur les différents extraits de la plante en raison de révéler la teneur en polyphénols et flavonoïdes a donné les résultats présentés dans le **tableau (9)**.

Tableau 9 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux dans les différents extraits de *Nerium oleander*

Extraits	Polyphénols totaux en μg EAG/mg d'extraits	Flavonoïdes totaux en μg EAG/mg d'extraits
E. acétique	34,44209 \pm 4,61488	0,680695 \pm 0,168497
E. méthanolique	50,56172 \pm 5,328804	14,44928 \pm 0,421243
E. aqueux	22,39467 \pm 5,546395	9,158592 \pm 2,021966

Les concentrations des polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits sont calculées à partir des équations de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide

gallique ($Y=0.993x+0.0016$) et la quercétine ($Y= 8.2486X +0.0129$) respectivement, où Y représente l'absorbance et X représente la concentration.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la quercétine et l'acide gallique par un milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$). On remarque que les trois extraits de la plante contiennent des apports variables de flavonoïdes et polyphénols totaux, dont l'extrait méthanolique a présenté les concentrations les plus élevées en occupant une place majoritaire dans les deux dosages avec une concentration de 50,56 $\mu\text{g EAG/mg}$ de polyphénols et de 14,44 $\mu\text{g EAG/mg}$ de flavonoïdes, suivi de l'extrait acétique qui contient une concentration moyenne de polyphénols (34,44 $\mu\text{g EAG/mg}$) mais il ne contient que des traces de flavonoïdes par (0,68 $\mu\text{g EAG/mg}$). L'extrait aqueux contient la plus faible concentration en polyphénols (22,39 $\mu\text{g EAG/mg}$), mais il présente une relativement concentration considérable en flavonoïdes (9,15 $\mu\text{g EAG/mg}$) par rapport à l'extrait acétique.

3. 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 ($Y= 0.0503X - 0,02$) où Y représente l'absorbance et X représente la concentration.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de la nicotine par un milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$) et présentés dans le **tableau (10)**

Tableau 10 : Teneur en alcaloïde totaux dans les différents extraits de *Nerium Oleander*

Extraits	Alcaloïdes totaux en $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$
Extrait acétique	755,4672
Extrait méthanolique	337,9722
Extrait aqueux	695,825

On note que les trois extraits de la plante sont très riches en alcaloïdes dont l'extrait acétique présente une excellente teneur avec une concentration de 755,46 $\mu\text{g EAG/mg}$ contrairement des concentrations en polyphénols et flavonoïdes, suivie de l'extrait aqueux avec une teneur de 695,82 $\mu\text{g EAG/mg}$ et en dernier l'extrait methanolique avec 337,97 $\mu\text{g EAG/mg}$.

4. Dosage des glycosides cardiaques

L'étude phytochimique qualitative réalisée sur les extraits de *Nerium oleander* pour déterminer et révéler le taux des glycosides cardiaque suivant la variation de la couleur a révélé les résultats suivant **figure (6)**

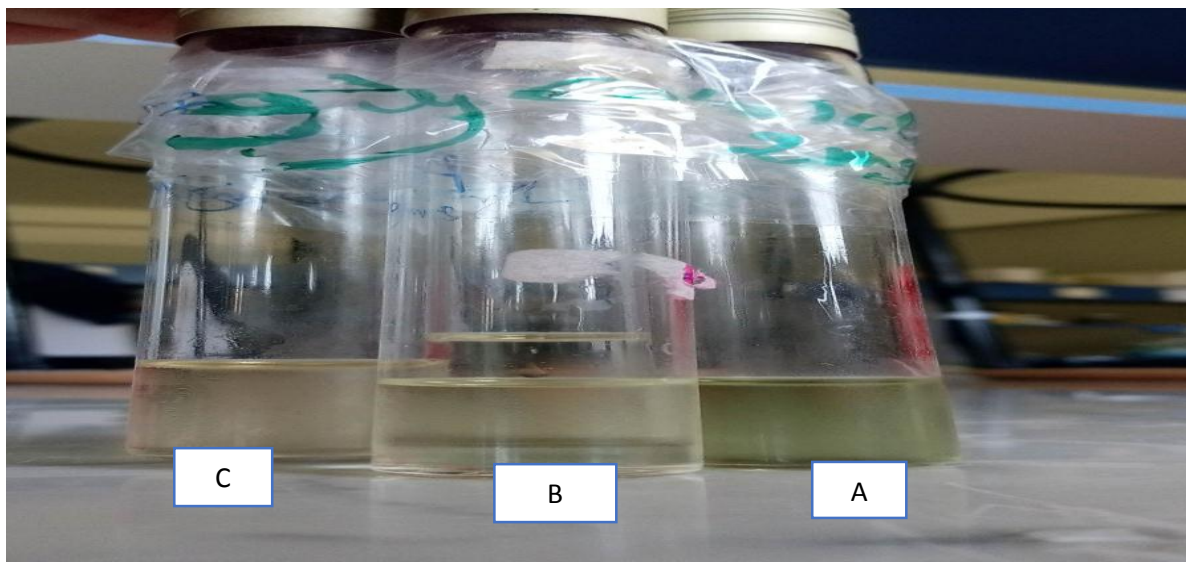


Figure 6 : Résultats de dosage des glycosides cardiaques.

On constate que l'extrait methanolique (A) est le plus riche en glycosides cardiaque, car il a présenté une variation de couleur très forte, suivi par l'extrait aqueux (B) qui a présenté un degré faible de couleur vert tandis que l'extrait acétique (C) n'a présenté qu'une très faible coloration par rapport aux autres extraits.

5. Détermination quantitative des métaux lourds dans *Nerium oleander*

N. oleander est connu par son pouvoir accumulateur des métaux lourds, qui possède des effets toxiques sur le corps humain. Pour déterminer la quantité des métaux lourds accumulés dans les feuilles et les fleurs de notre plante, un dosage de plomb et de cadmium a été effectué et mesuré à l'aide de (SAA).

Tableau 11 : Concentration des métaux lourds accumulés dans les feuilles et les fleurs de *N. oleander*

Extraits	[C]± écart type de plomb (ppm/g)	[C]± écart type de cadmium (ppm/g)
Feuilles	7,632	0,896 ± 0,008627
Fleurs	7,634± 0,036416	0,936 ± 0,003394

D'après le **tableau 11** on note que les feuilles et les fleurs de *N. oleander* ont accumulés les deux métaux (plomb et cadmium). On constate que les feuilles et les fleurs ont la même capacité de bioaccumulation des métaux. On constate également que le plomb est le plus présent dans les feuilles et les fleurs que le cadmium.

6. Test de piégeage du radical DPPH

Le pourcentage de pouvoir anti radicalaire du radical DPPH par l'extrait aqueux, méthanolique, acide acétique, et acide ascorbique comme référence à différentes concentrations sont présentées dans la **figure7**. Les concentrations nécessaires pour réduire 50% du radical libre DPPH (EC50) de chaque extrait sont présentées dans le **tableau (12)**

Tableau 12 : Concentration nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH

Echantillon	EC50±Ecart type (En µg/ml)
Acide ascorbique	9,54318344 ± 3,924**
Extrait acétique	3904,545 ± 1,263**
Extrait méthanolique	754,62963 ± 3,096**
Extrait aqueux	785,341453 ± 4,175**

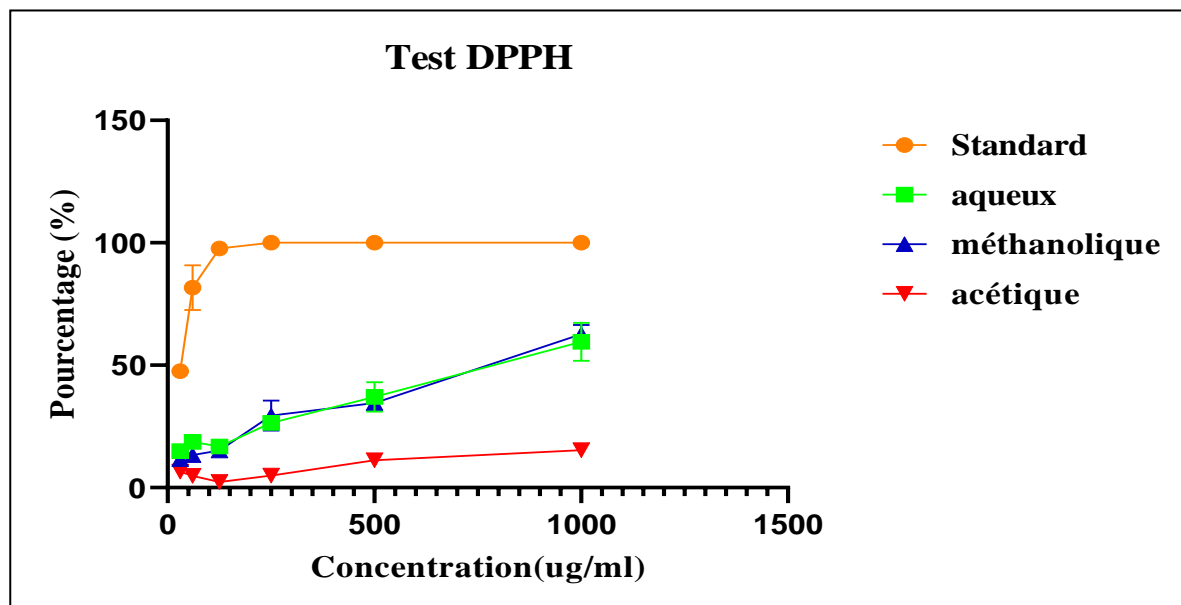


Figure7 : Pourcentage de réduction du radical libre DPPH par l'extrait aqueux, méthanolique et l'extrait d'acide acétique, et l'acide ascorbique à différentes concentrations.

L'activité anti radicalaire des extraits des feuilles a été évaluée par la méthode du piégeage du radical DPPH, cela nous a permis de déterminer les valeurs de EC50 (la Concentration qui réduit 50% du radical libre).

On constate que l'acide ascorbique possède un excellent pouvoir anti radicalaire de DPPH 82% à la concentration 150µg/ml avec une EC50 (9,54318344 ± 3,924) par rapport à tous nos extraits quel que soit l'extrait acétique, méthanolique ou aqueux qui ont présentés une faible capacité antiradicalaire avec une différence hautement significative $p < 0.001$ par rapport à l'acide ascorbique. L'extrait acétique a présenté la plus faible capacité de piégeage de DPPH par rapport aux autres extraits et au standard avec une activité maximale (15.30% ± 2.17) à la concentration 1000ug/ml et une EC 50 très élevé (3904,545 ± 1,263). L'extrait methanolique a présenté la meilleure capacité antioxydante (59.17% ± 11.01) à la concentration 1 mg/ml et une EC50 de (785,341453 ± 4,175) suivi par l'extrait aqueux qui a présenté sa haute activité (62.57% ± 5.43) à la concentration 1mg/ml et une EC 50 de (754,62963 ± 3,096). De cela, on conclut que nos extraits présentent une activité du piégeage des radicaux libres considérable mais inférieure à celle de l'acide ascorbique.

7. Test des capacité antioxydant

Le pourcentage de la capacité antioxydante des différents extraits est présenté dans la **figure 8** et les concentrations nécessaires pour obtenir la DO 0.5nm par les différents extraits sont présentées dans le **tableau (13)**.

Tableau 13 : La concentration nécessaire pour atteindre la DO 0.5nm

Extraits testés	[C]±Ecart type (µg/ml) qui correspondent à DO=0,5nm
Acide ascorbique	118,5468± 0,6553 Ns
Extrait acétique	2770+03± 0,007405 Ns
Extrait méthanolique	543,4783±0,01728 Ns
Extrait aqueux	813,1535±0,01576 Ns

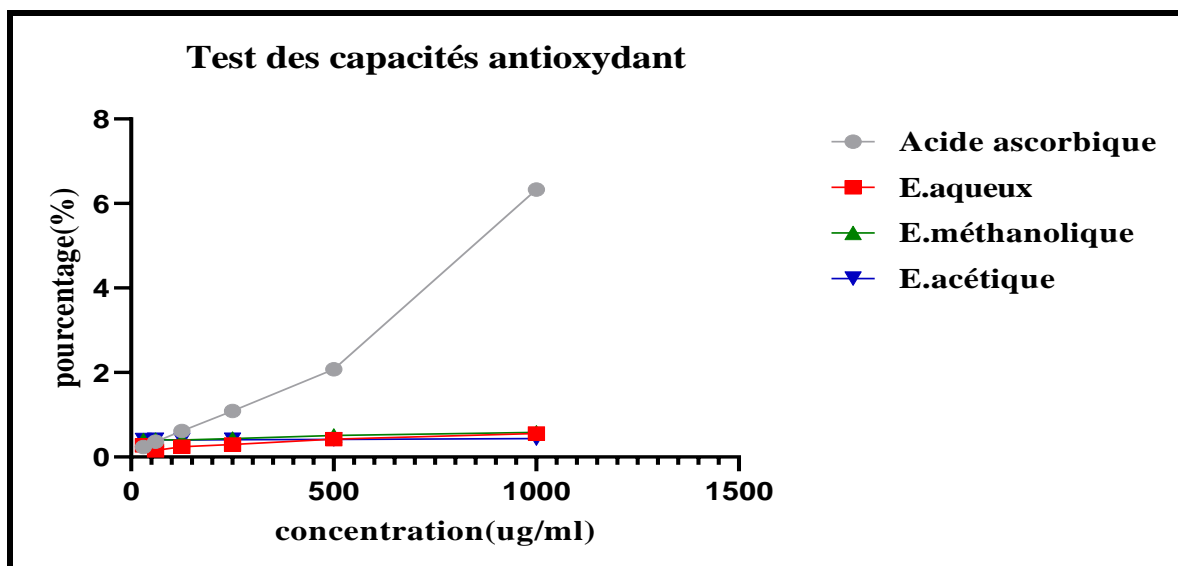


Figure 8 : Capacités antioxydante des extraits de *N. oleander* et de l'acide ascorbique.

On remarque que l'acide ascorbique a atténué la DO 0.5 nm à la concentration ($118,5468 \pm 0,6553$) µg/ml. Par contre, les extraits de la plante ont présenté des concentrations très élevées pour atteindre cette DO dont la concentration la plus élevée appartient à l'acide acétique ($2770,03 \pm 0,007405$) µg/ml, suivi de l'extrait aqueux ($813,1535 \pm 0,01576$) µg/ml puis l'extrait méthanolique ($543,4783 \pm 0,01728$) µg/ml.

8.Effets des extraits de *Nerium oleander* sur la trypsine

Les effets des extraits de *Nerium oleander* sur l'inhibition de la trypsine sont présentés dans la figure 9.

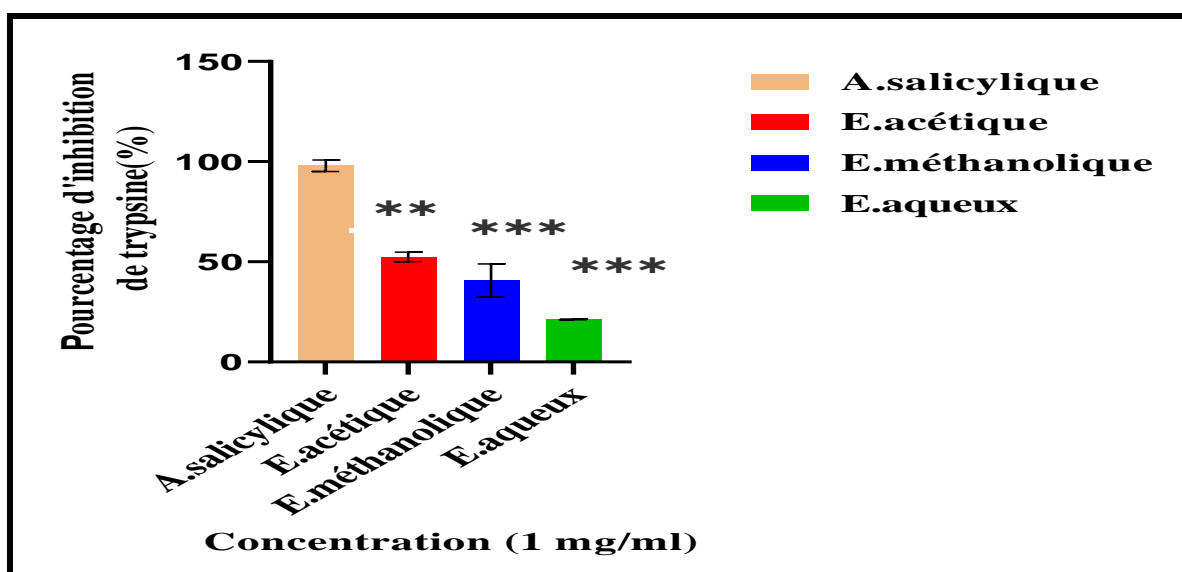


Figure 9 : Pourcentage d'inhibition de la trypsine par les extraits de *N. oleander* et l'acide salicylique

L'acide salicylique a inhibé la trypsine à 100% à la concentration 1mg/ml tandis que les trois extraits de la plante ont présenté des pourcentages d'inhibition significativement inférieures à celui du standard ($P < 0,05$). On note que l'extrait acétique a présenté une activité inhibitrice de 50,75% à la concentration 1mg/ml, tandis que l'extrait méthanolique a inhibé la trypsine avec 40,25%. L'extrait aqueux a présenté le plus faible pourcentage d'inhibition 21,25%.

9. Effets des extraits de *Nerium oleander* sur la chélation du fer

Pour évaluer l'effet des trois extraits de la plante et d'EDTA comme référence sur la chélation de fer, on a fait un dosage colorimétrique. D'après les résultats, on constate que les différents extraits de *N. oleander* (acétique, méthanolique et aqueux), n'ont présenté aucun effet sur la chélation du fer par rapport à l'EDTA qui a présenté une activité de 100% à la concentration de 1mg/ml.

10. Effets des extraits de *Nerium oleander* sur la dénaturation de l'ovalbumine

Pour évaluer l'effet dénaturant des extraits de la plante, on a utilisé l'effet de HCl et de la température comme référence. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 10** et **Figure 11** respectivement.

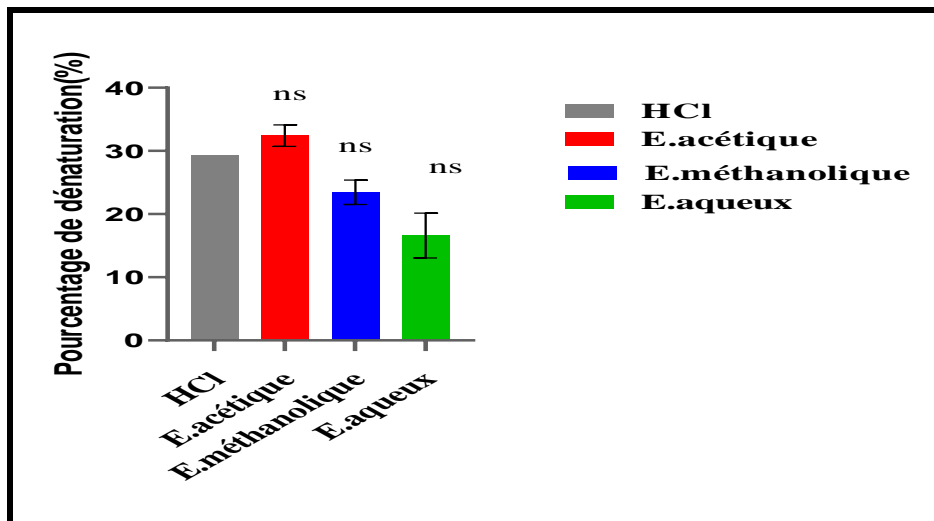


Figure 10 : Pourcentage de dénaturation de OV par les extraits de *N. oleander*

On remarque que le pourcentage de dénaturation de l'extrait acétique 33.88% a dépassé celui de HCl 29.37%. De même l'extrait méthanolique a effectué la dénaturation de l'ovalbumine avec un pourcentage de 24.28% et l'extrait aqueux avec un pourcentage de

19.09%. On note qu'il n'y a pas de différence significative $p > 0.05$ entre l'effet du standard et l'effet des extraits, ce qui reflète que les extraits ont un effet dénaturant très proche à celui de HCl.

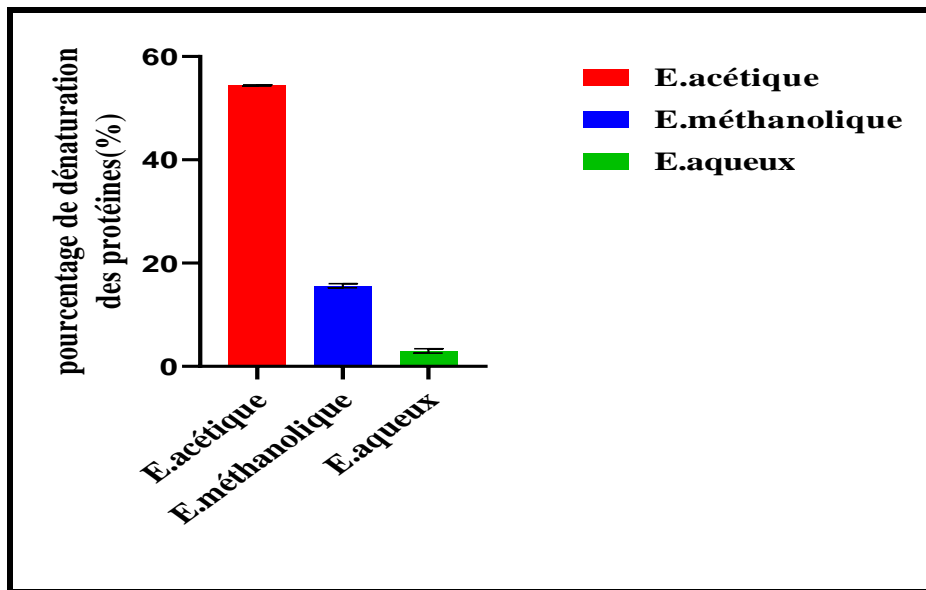


Figure 11 : Effets dénaturants des extraits de *N. oleander* à température de 55°C.

On remarque que l'extrait acétique a effectué la maximal valeur de dénaturation de l'ovalbumine avec un pourcentage de 54.58 % (E. Acétique – E –methanolique $p < 0.0001$) par rapport à l'extrait methanolique qui a effectué la dénaturation avec un pourcentage de 16.18% (E methanolique –E aqueux $p < 0.0001$) puis l'extrait aqueux qui a présenté la plus faible capacité dénaturante avec un pourcentage de 2.9% (E extrait acétique – E aqueux $p < 0.0001$).

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

La quercétine a été utilisée comme référence pour son effet inhibiteur sur la peroxydation lipidique tandis que l'acide ascorbique et le FeSO_4 ont été utilisés comme référence de l'induction de la peroxydation.

Les effets d'extraits de *N. oleander* sur l'inhibition et l'induction de la peroxydation lipidique sont présentés dans la **figure 12**.

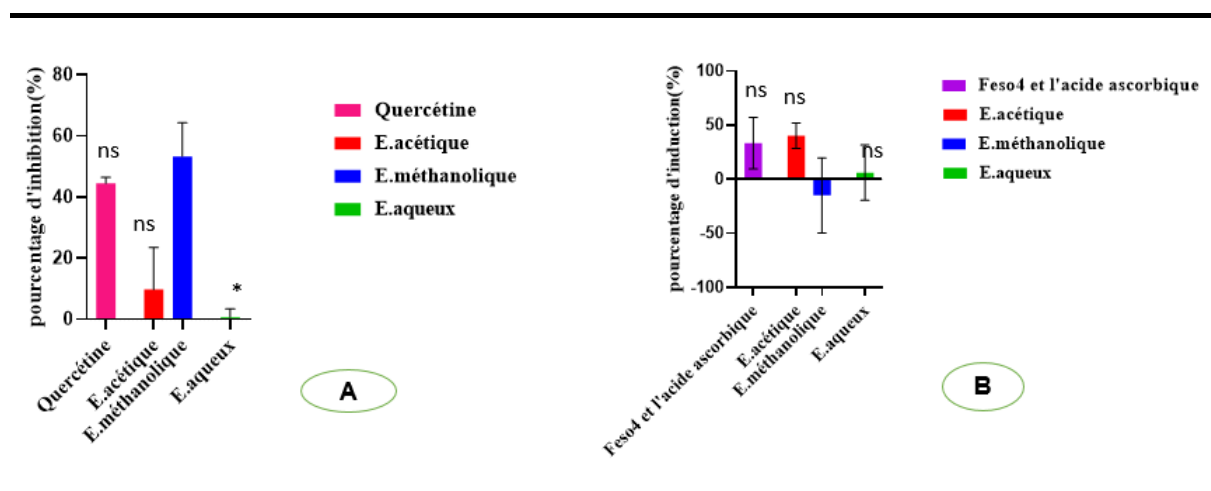


Figure 12 : Effets des extraits de *Nerium oleander* sur la peroxydation lipidique

A) On remarque que la quercétine a provoqué l'inhibition de la peroxydation lipidique avec un pourcentage de 43%, tandis que l'extrait méthanolique le dépasse, et provoque une inhibition meilleure avec 58%, ainsi qu'il n'y a pas de différence significative $p > 0.05$ entre le standard et l'extrait méthanolique. Par contre l'extrait acétique et l'extrait aqueux n'ont pas présentés une activité inhibitrice de la peroxydation par rapport au standard.

B) On remarque que l'effet inducteur de la peroxydation de l'extrait acétique (48%) a dépassé l'effet provoqué par le standard Feso4 et l'acide ascorbique (46%), tandis que l'extrait aqueux a effectué un effet inducteur très faible (8%) par rapport au standard, par contre l'extrait méthanolique a effectué un effet inhibiteur.

12. Effet des extraits de *Nerium oleander* sur la catalase

On a évalué l'effet inhibiteur des différents extraits de la plante et de NaCN sur l'enzyme de la catalase. L'activité de la catalase en présence des extraits et le pourcentage d'inhibition des différents extraits ont été déterminés et les résultats sont représentés dans le **tableau 14** et la **figure 13**

Tableau 14 : L'activité de la catalase en présence des différents extraits de *N. oleander*

Extraits	Activité (UI/g)
NaCN	3.77
Extrait aqueux	3,44
Contrôle	63,655019
Extrait acétique	0
Extrait méthanolique	0
Contrôle	23,0187128

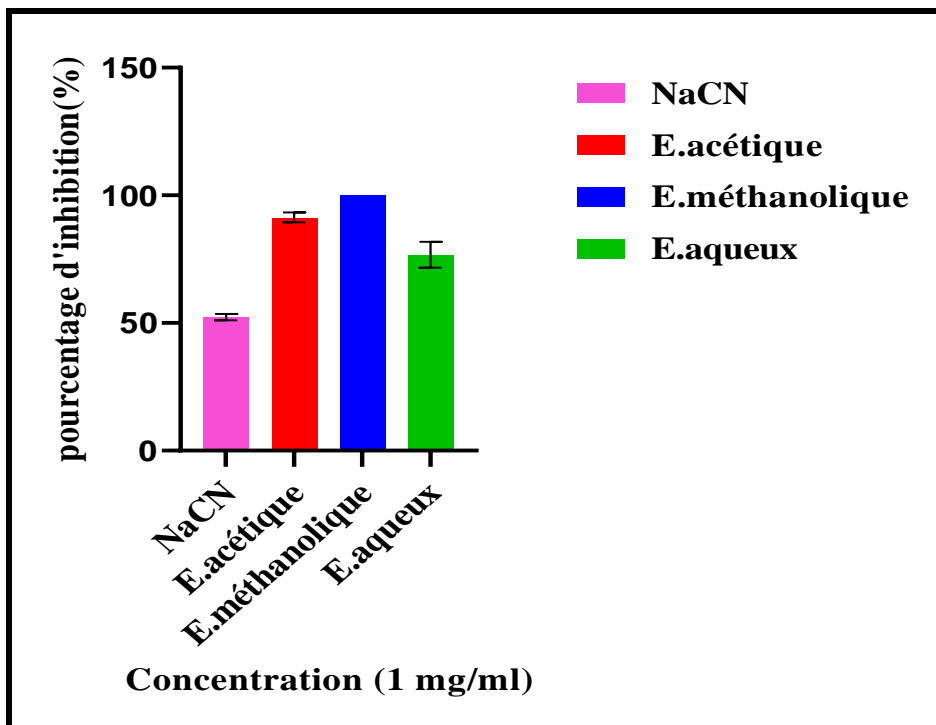


Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de la catalase par les extraits de *N. oleander* et NaCN

D'après les résultats obtenus dans le **tableau 14**, on remarque que l'activité de la catalase a été inhibée en présence des trois extraits de *N. oleander* et de NaCN par rapport au contrôle. La **figure 13** présente les pourcentages d'inhibition de la catalase par les extraits de *N. oleander* et le NaCN. On constate que l'effet inhibiteur de NaCN est significativement inférieur à l'effet de tous les extraits (52,31%, $P < 0,05$). D'autre part l'extrait acétique a présenté le meilleur pourcentage d'inhibition 92,72 %, significativement supérieur à l'effet de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique (76,7 % et 63,2%) respectivement, $P < 0,05$.

13. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la prolifération cellulaire

L'effet antiprolifératif des extraits de la plante est présenté dans la **figure 14**

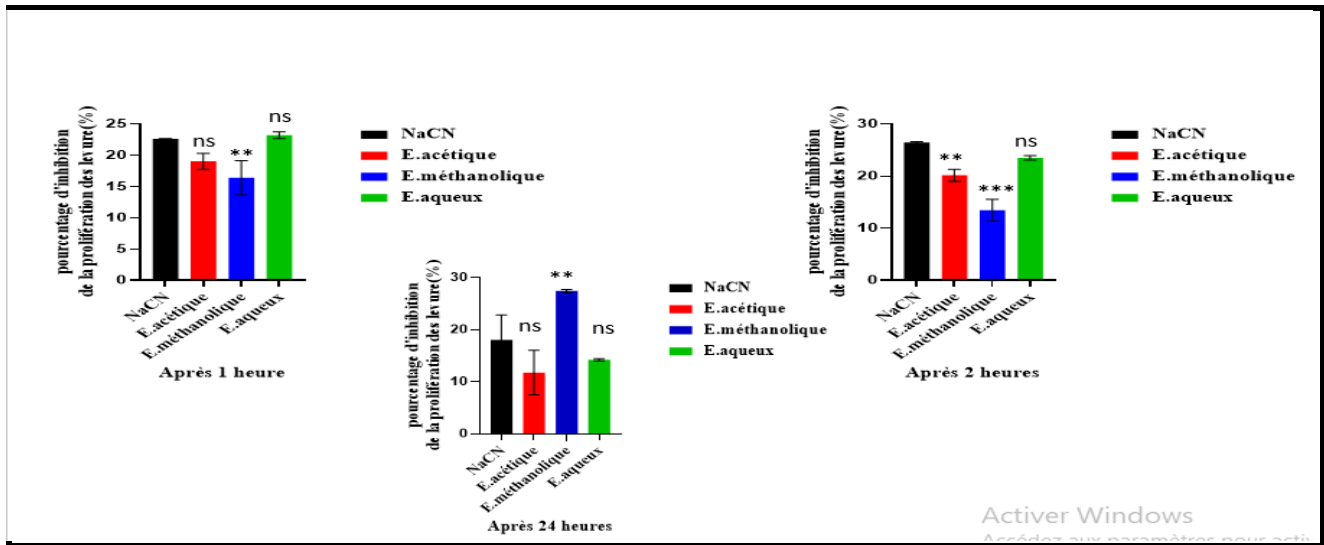


Figure 14 : Le pourcentage d'inhibition de la prolifération des levures par les différents extraits, à la concentration de 2mg/ml, en fonction de temps (1h, 2h,24h)

Le NaCN est un agent cytotoxique puissant dont il a présenté des pourcentages d'inhibition de la prolifération de *Sarccomytilan* très élevé. On remarque qu'après 1 heure, les extraits de la plante ont présenté des pourcentages d'inhibition très élevés et très proches à celui de NaCN 22% (extrait méthanolique 16%, extrait acétique 18% alors qu'on remarque que l'extrait aqueux 24% a dépassé même l'effet effectué par le NaCN. On note qu'il n'y a pas de différence statistique entre le standard et l'extrait acétique ou l'extrait aqueux ($p > 0.05$), tandis qu'une différence hautement significative entre le standard et l'extrait méthanolique ($p < 0.001$) est constatée. Pour la 2ème heure, on remarque le même enchainement d'inhibition de la prolifération par les trois extraits sauf qu'ils ont présenté des valeurs diminuées par rapport à celle de la première heure. Après 24h on constate que les pourcentages d'inhibitions des extraits et le standard ont diminué d'une façon accélérée, par contre l'extrait méthanolique a présenté un pourcentage très élevé 28% par rapport à celui remarqué en 1 heure et 2 heures et a même dépassé l'effet de NaCN à cette heure ($p < 0.05$)

14. Effet des extraits de *Nerium Oleander* sur la consommation de glucose

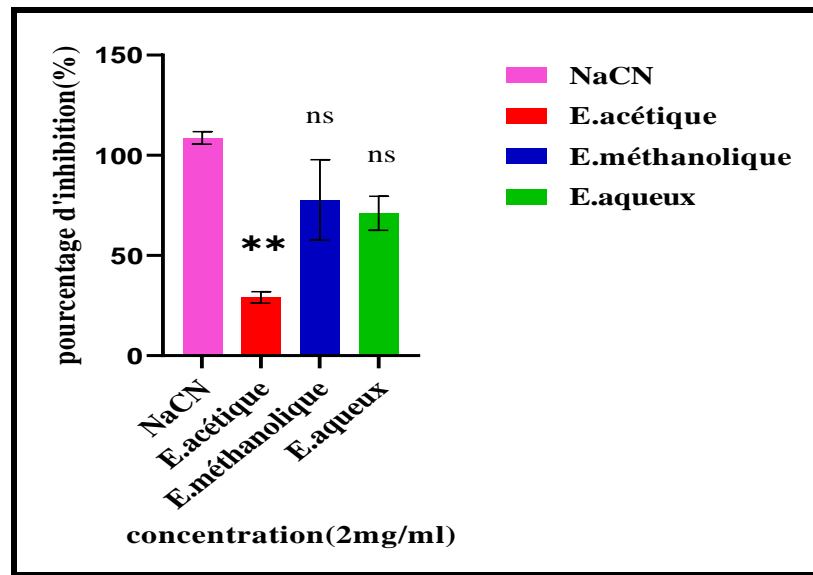


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition de la consommation de glucose par les extraits de *N. oleander* et NaCN.

Le pourcentage d'inhibition de la consommation de glucose par les trois extraits a été déterminé suivant l'évaluation d'acidification du milieu induite par consommation de glucose. D'après les résultats présentés dans la **figure15** on constate que l'extrait méthanolique a inhibé la consommation de glucose par un pourcentage (76%), suivi par l'extrait aqueux (70%) et l'extrait acétique (28, 98%) tandis que le NaCN, utilisé comme un standard a montré un effet de 100% dans les mêmes conditions. De cela en résumé que nos trois extraits ont la capacité d'inhiber la consommation de glucose, et surtout l'extrait méthanolique qui a présenté l'activité la plus proche de celle de NaCN ($p > 0.05$).

15. Effet cytotoxique des extraits de *Nerium Oleander* sur la levure

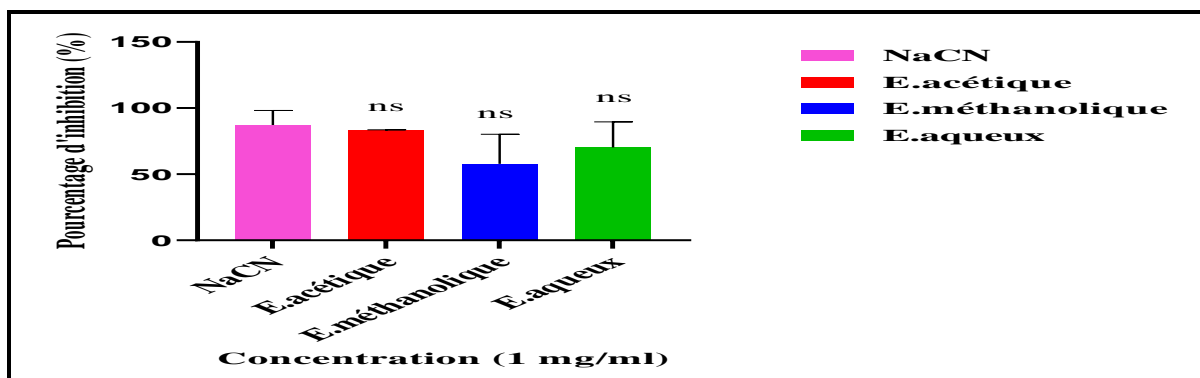


Figure 16 : Pourcentage de cytotoxicité des extraits de *N. oleander* et NaCN à la concentration 1mg/ml sur la suspension de levure *sarcomisylene*.

On observe que les trois extraits de *Nerium oleander* ont effectué des effets cytotoxiques sur les cellules de la levure, dont l'extrait acétique a présenté le pourcentage de cytotoxicité le plus élevé (92%) et le plus proche à celui de NaCN (97%), suivie par l'extrait Aqueux 76% et l'extrait méthanolique 62%.

16. Effets des extraits de *N. oleander* sur l'ADN

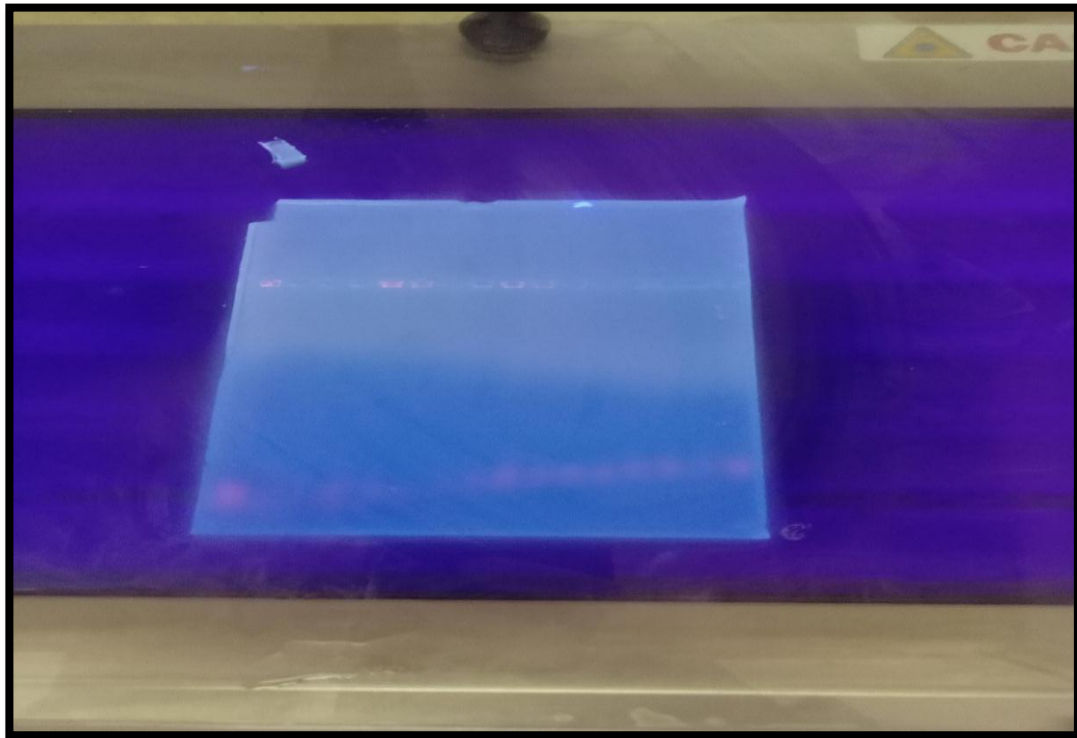


Figure 17 : Migration sur gel d'agarose de l'ADN des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* incubé pendant 48h avec les extraits de *N. oleander* ou NaCN à la concentration 2mg/ml.

D'après l'observation des résultats de l'électrophorèse on note que l'ADN des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* traitées par les extraits de *N. oleander* ou NaCN migraient la même distance que l'ADN des contrôles (non traité). On note également l'absence de smere dans l'ADN de tous les échantillons par rapport au control.

Discussion

Notre étude se focalise sur la caractérisation des capacités cytotoxiques de *Nerium oleander in vitro*, historiquement connue par sa toxicité pour les êtres vivants. Afin d'évaluer cette capacité, trois méthodes d'extraction ont été appliquées. Pour l'obtention de l'extrait aqueux on a opté pour la méthode de décoction, concernant l'extrait méthanolique, on a effectué une macération et pour l'extrait acétique une extraction par l'alcool acétique a été réalisée.

Les rendements d'extraction des trois extraits de la plante ; aqueux – méthanolique et acétique ont donné des valeurs différentes dont le plus élevé est celui de l'extrait acétique avec un pourcentage de 74% suivi par l'extrait méthanolique puis l'extrait aqueux. On suggère que le rendement d'extraction est affecté par la méthode utilisée. La macération consiste à immerger le matériel végétal dans l'eau froide, tandis que la décoction consiste à plonger la poudre végétale dans l'eau chaude jusqu'à ébullition

L'étude phytochimique est la base de la valorisation des effets bénéfiques ou vénéneux des plantes, elle repose sur la caractérisation des substances naturelles présentes dans les différentes parties de la plante (**Kalishe, 2014**). La quantification des composés phytochimiques présents dans les extraits de la feuille, a révélé des concentrations variables de ces derniers. D'après les résultats obtenus, la teneur en polyphénol et en flavonoïdes était élevée dans l'extrait méthanolique par rapport aux autres extraits, ce qui est en accord avec les constatations de (**Mohadjerani, 2012 ; Redha, 2020**) qui ont rapporté que les extraits méthanoliques des fleurs et des feuilles sont les plus riches en composés phénoliques. En effet, les propriétés polaires du solvant ont une grande influence sur le rendement des molécules extraites. Selon **Nacz et Shahidi, (2004)**, le méthanol est le meilleur solvant recommandé pour l'extraction des polyphénols.

D'autre part, on constate que la quantité des composés phénoliques dans les différents extraits y compris l'extrait méthanolique est relativement faible par rapport à celle rapportée dans la littérature (**Sinha et Biswas, 2016**). On suggère que les faibles teneurs en composés phénoliques rapportées dans cette étude peuvent être expliquées par le facteur climatique. La sécheresse induite par les températures élevées, provoque un stress hydrique qui aura un grand impact sur la synthèse des composés phénoliques (**Tanguy, 1970**). **Paynot et al., (1969) ; Zapromietov, (1959)** ont mentionné que la sécheresse provoque une sénescence précoce des feuilles, où la synthèse des composés phénoliques devient lente. D'après les données météorologiques, cette année était caractérisée par une grande sécheresse, provoquant ainsi le

dessèchement des feuilles de la plante, ce qui peut être une cause de la faible teneur obtenue en composés phénoliques.

Les alcaloïdes sont des molécules dotées de propriétés analgésiques et surtout cytotoxiques, ce qui explique l'origine de l'activité cytotoxique de *Nerium Oleander*, car cette dernière est connue par sa richesse en alcaloïdes **Bakir Çilesizoğlu et al., (2022)**. Les trois extraits testés de *Nerium oleander*, ont montré une richesse en alcaloïdes, principalement l'extrait acétique. On suggère que cela est lié au solvant utilisé qui est l'éthanol. **Hajjaoui et al., (2004)** ont noté que les molécules d'alcaloïdes sont solides et elles sont dissoutes totalement dans l'éthanol. L'acidité de l'acide acétique a augmenté la solubilité des alcaloïdes tandis que l'alcanisation du milieu par le HNO₃ a permis la précipitation et la récupération d'une quantité maximale de ces molécules. **Bakir Çilesizoğlu et al.,(2022)** ont trouvé dans leur étude, que l'extrait méthanolique des feuilles est le plus riche en alcaloïdes par rapport aux deux autres extraits testés, (l'extrait aqueux et extrait hydro méthanolique), contrairement à l'extrait méthanolique des fleurs qui a présenté une très faible teneur en alcaloïdes.

Nerium oleander est considérée comme une source de glycosides cardiaques, ce qui lui confère son pouvoir toxique (**Singh et al., 2022**), spécifiquement l'oleandrin (**Afaq et al., 2004**). Malgré l'aspect toxique des glycosides cardiaques, ils jouent un rôle important dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et l'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses (**Singh et al., 2022**) en induisant l'apoptose. L'analyse des extraits étudiés a révélé qu'ils contiennent tous des glucosides cardiaques, où l'extrait méthanolique semble le plus riche en ces molécules. **Bakir Çilesizoğlu et al., (2022)**, a montré également que l'extrait méthanolique des fleurs et des feuilles est le plus concentré en glycosides cardiaques.

N. oleander est connue par son potentiel d'accumuler certains métaux lourds et minéraux, ce potentiel est considéré comme un indicateur de pollution. (**Franco et al., 2013 ; Khalid et al.,2023**). Cela nous pousse à penser que la toxicité de *N. oleander* peut être liée à la présence de certains métaux lourds. Le plomb est un composant naturel largement répandu dans la croûte terrestre à des teneurs de l'ordre de 13 à 16 mg/Kg du sol (**Baize,1988**). Il est devenu un polluant omniprésent à cause des activités anthropiques (**Cunningham et Berti, 2020**). L'accumulation de plomb dans le corps humain induit des dommages sur le système immunitaire (**Cohen et al., 1994**), reproductif et système nerveux (**Bouton, 2001**). Le cadmium (Cd) est parmi les polluants trace métalliques, il est considéré comme l'un des métaux les plus préoccupants pour la santé humaine par sa toxicité, persistance et sa bioaccumulation en

particulier dans le rein et le foie (**Bliefert et Perraud, 2004**), ce qui conduit à des dommages rénaux. (**Ennouri et al., 2010**).

Nos résultats font apparaître des teneurs élevées en plomb et cadmium dans les feuilles et les fleurs de *N. oleander*. On suggère que cette augmentation fait appartenir à une contamination ou la pollution de sol par les déchets (surtouts les déchets en plastique et la pollution atmosphérique). Ces résultats sont proches à ceux rapportés par **Khalid et al., (2023)** qui ont dosé le plomb et le cadmium dans les feuilles de *N. oleander* dans la région Adda-46 (Pakistan) située au bord de la route ($7,411 \pm 0,366$), ($0,577 \pm 0,018$) respectivement, et dans la région Pull-111 (Pakistan) située à proximité d'une industrie de pierre ($7,699 \pm 0,358$) plomb, ($0,576 \pm 0,032$) cadmium. Ils ont rapporté que la concentration des métaux Pb et Cd était plus élevée dans la plante *N. oleander* que dans le sol. Ces deux métaux lourds sont ceux que l'on trouve le plus souvent le long des routes parce qu'ils sont principalement libérés par les automobiles, surtout dans les pays en développement. On suggère alors que la toxicité aigüe enregistré suite à l'ingestion volontaire ou accidentelle de *N. oleander* peut être liée à la haute teneur de plomb et cadmium accumulée dans la plante, qui est l'origine de l'apparition de quelques symptômes comme l'insuffisante rénale et les troubles neurologiques.

Les plantes médicinales sont dotées d'un pouvoir antioxydant qui se traduit par la capacité du piégeage des radicaux libre (**Pastre et al., 2007**). Les radicaux libres sont des molécules chimiques (atome, ou ion) qui contient un électron célibataire sur la couche externe (**Azouaou, 2018**), ce sont des dérivés réactifs de l'oxygène (**Valko et al., 2007**). Il existe plusieurs méthodes pour évaluer cette capacité dont on a choisi celle de DPPH et de la capacité antioxydante totale.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique, et l'extrait aqueux sont les plus douées par une activité antioxydante, cela est dû à la teneur relativement élevée des extraits en composés phénoliques par apport à l'extrait acétique. Par contre, cette capacité effectuée par les extraits testés reste faible en comparaison avec celle trouvée dans la littérature. Cette faible capacité antioxydante peut être expliquée par la composition faible des extraits en composés phénoliques. Scientifiquement les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir antioxydant et leur forte capacité à piéger les radicaux libres en les transformant à leur situation stable (**Sökmen et al., 2012**). La nature antioxydante des polyphénols (PhOH) est basée sur la contribution d'un atome H, qui perturbe et met fin aux réactions successives initiées par les radicaux libres dans l'organisme vivant. Les radicaux phénoxyles générés (PhO)

peuvent être stabilisés par l'auto combinaison de (PhO) pour donner des produits dimères, et finalement mettre fin à la réaction en chaîne (**Syed Khalid et al., 2020**).

La cytotoxicité des différents extraits de *N. oleander* a été déterminée par l'évaluation de l'activité des extraits à dénaturer les protéines et induire la peroxydation lipidique. L'effet des extraits sur l'activité de la trypsine et de la catalase a été également évalué.

La dénaturation des protéines est un processus caractérisé par le dysfonctionnement des protéines, résultant de l'influence de plusieurs agents comme le pH et la température qui provoque des altérations et des ruptures dans les différentes liaisons des protéines (ionique, hydrogènes, hydrophobe...etc). Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Nerium oleander* (acétique, méthanolique et aqueux) provoquent la dénaturation des protéines et favorisent l'effet dénaturant de la température. Contrairement à nos résultats, **Truong et al., (2019)** qui ont mené des essais *in vitro* sur une plante de la même classe de *N. oleander*, ont rapporté que l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique inhibent efficacement la dénaturation des protéines. On suggère alors la capacité des extraits à dénaturer les protéines est liée à la présence des composés bioactifs caractéristique de l'espèce de *Nerium oleander*.

L'inhibition de la trypsine, une protéase utilisée comme référence dans notre étude pour évaluer l'activité protéase/antiprotéase. Les protéases sont des enzymes qui agissent sur la liaison peptidique pour dégrader les protéines, elles sont impliquées dans les réactions inflammatoires.

Nos résultats montrent que *N. oleander* possède une activité antiprotéase car les trois extraits ont inhibé la trypsine avec des pourcentages variables. Ces résultats sont similaires aux résultats de **Padul et al., (2012) et Truong et al., (2019)** qui ont mené des essais *in vitro* sur les feuilles, les graines et les fleurs des plantes de la même classe de *N. oleander* et ils ont rapporté que ces plantes inhibent potentiellement la trypsine. On suggère alors que l'inhibition de la trypsine est liée à la présence des composés bioactifs caractéristique de la famille de *N. oleander*,

Pour vérifier l'effet pro-oxydant des extraits de *N. oleander*, on a évalué leurs activités sur la catalase et sur l'induction de la peroxydation lipidique.

La catalase est une enzyme antioxydante endogène catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (non chargé et donc il diffuse facilement à travers les membranes en eau) (H_2O) et oxygène (O_2) pour prévenir la formation des radicaux hydroxyle (OH^{\bullet}). L'inhibition de la catalase provoque une accumulation de H_2O_2 dans les cellules, où le peroxyde

d'hydrogène réagit avec les cations métalliques tels que le Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou Cu^+ et génère des radicaux hydroxyle, qui participent à l'induction du stress oxydatif et provoquent des dommages à l'ADN, l'oxydation des protéines et la peroxydation des lipides (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**). Nos résultats montrent que, les trois extraits (acétique, méthanolique et aqueux) de *N. oleander* possèdent une activité inhibitrice élevée sur la catalase. Par contre **Çilesizoğlu et al., (2022)**, montre que l'extrait des feuilles et des fleurs de *N. oleander in vitro* provoque une augmentation importante de l'activité de la catalase et de la SOD. Cette augmentation indique que l'application des extraits des feuilles et des fleurs de *N. oleander*, provoque un stress oxydatif dans les cellules.

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne médiée par les radicaux libres, elle est liée aux lésions et à l'inflammation et souvent associé à des dommages oxydatifs des lipides membranaires (**Albert et al., 2003**). Elle est généralement initiée par le radical hydroxyle qui est produit par la réaction de Fenton en présence d'un ion métallique (Fe^{2+}), et qui réagit avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines. Ces radicaux réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron, soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (**Albert et al., 2003**).

D'après nos résultats, on remarque que l'extrait acétique a provoqué une haute induction de la peroxydation lipidique. Ce résultat est similaire à celui d'**Alhazmi et al., (2021)** qui ont rapporté que l'extrait éthanolique de *N. oleander* a induit une peroxydation lipidique dans l'homogénat de foie de rat *Wistar*, grâce à la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). D'autre part, l'extrait méthanolique dans notre étude a inhibé la peroxydation d'une manière significative et cela peut être lié à sa richesse en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Singhal et Gupta, (2012)**, ou ils ont confirmé que l'extrait méthanolique des fleurs de *N. oleander* a exercé *in vitro* un effet hépato protecteur contre la peroxydation lipidique induite par le Ccl_4 . On suggère alors que l'activité prooxydante de l'extrait aqueux et acétique est favorisée par leurs teneurs faibles en polyphénols.

L'effet inhibiteur des trois extraits de *N. oleander* sur la consommation de glucose a été confirmé. Cela s'explique par l'effet inhibiteur des extraits et de NaCN sur la pompe à proton H^+ -ATPase (maintient un gradient de protons chez les plantes et les champignons) et donc l'inhibition de la sortie des protons H^+ au milieu extracellulaire, ce qui affecte le changement de pH de milieu (d'un milieu basique à un milieu acide). Ce changement a été détecté par le

rouge de méthyl qui change sa couleur du jaune au rouge après quelque minutes d'addition de glucose (Yamashoji et al., 2020).

L'extrait méthanolique a présenté la plus haute efficacité contre la consommation de glucose, qui peut être liée à la présence de quelque composé phénolique ainsi que sa richesse en glycosides cardiaques. Ce résultat est proche à celui de **Calderón-Montaña et al., (2013)** qui ont confirmé que l'extrait éthanolique des feuilles de *N. oleander* a exercé un effet réducteur sur la consommation de glucose en inhibant la pompe Na⁺/K⁺-ATPase (maintient un gradient de Na (+) et de K (+) dans les cellules animales) des cellules cancéreuses de poumon de hamster A549. L'inhibition de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase par les glycosides cardiaques diminuerait l'activité de la glycolyse en réduisant l'entrée du glucose par l'inhibition de l'enzyme glycolytique clé PFK-1 (phosphofructokinase).

La cytotoxicité est l'incapacité des cellules de multiplier et de proliférer, ce qui conduit à la mort de ces cellules. Nos résultats confirment l'effet cytotoxique des trois extraits de *N. oleander*. Les résultats obtenus sont en accord avec celle de **Messaoudi et al., (2023)** qu'ils ont montré que l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *N. oleander* ont diminué la viabilité des cellules cancéreuse de sein MDA-MB231 et de colon HT29 incubées avec les deux extraits.

L'extrait acétique a présenté le meulière effet cytotoxique, on suggère qu'il agisse sur les cellules par son pouvoir pro-oxydants (comme il déterminé dans les tests précédents) et dénaturant des protéines, à cause de sa richesse en alcaloïdes. L'extrait méthanolique et aqueux ont présenté un effet cytotoxique élevé. On suggère que la richesse de l'extrait méthanolique en glycosides cardiaque est responsable sur cette activité cytotoxique, qu'il agisse sur la pompe H⁺ ATPase et inhibe la consommation de glucose. L'activité cytotoxique élevée de l'extrait aqueux peut être liée à sa composition phytochimique riche en alcaloïdes et en glycosides cardiaques. On suppose aussi que l'extrait a effectué cette activité par le mécanisme pro-oxydant. **Pan et al. (2015)** ont étudié le PBI-05204, un extrait au C02 de l'oléandrine, testé sur un modèle orthotopique de cancer du pancréas humain Panc-1. Ils ont montré que 25% des souris traités par PBI-05204 pendant une semaine ont présenté une diminution des cellules cancéreuses.

Les extraits de *N. oleandre* n'ont pas dégradé l'ADN des cellules de levure. L'ADN des cellules incubées avec les extraits et non incubés (des contrôle) ont migré de même distance ce qui désigne qu'ils ont la même taille. Alors que dans la littérature plusieurs études indiquent que les extraits de *N. oleander* induisent des dommages de le l'ADN telle que l'étude réalisée

par **Calderón-Montaña et al., (2013)** qui ont montré que les glycosides cardiaques de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *N. oleander* ont induit des dommages d'ADN des cellules cancéreuses du poumon par la formation de foyers gamma-H2AX, ce qui signifie que l'extrait *N. oleander* peut provoquer la cytotoxicité en induisant des lésions d'ADN.

On suppose que la dégradation d'ADN n'est pas constatée dans la présente étude, car la durée d'incubation des extraits avec les cellules de levure ou la concentration des extraits n'ont pas été suffisantes pour effectuer la fragmentation. On suspecte aussi que le mécanisme de résistance ou de réparation de l'ADN de l'organisme modèle (*Saccharomyces cerevisiae*) a empêché l'activité des extraits sur l'ADN.

Conclusion

Nerium oleander est connue depuis l'antiquité par son pouvoir toxique. Une composition phytochimique riche et diversifiée en métabolites secondaires ce qui lui confère des propriétés pharmacologiques. La présente étude est portée sur trois extraits de *N. oleander* pour confirmer son pouvoir cytotoxique, ainsi que les mécanismes par lesquels agissent.

L'évaluation de l'activité antioxydante par révélation de la capacité du piégeage des radicaux libres montre que l'extrait méthanolique et aqueux ont une activité antioxydante faible. On suppose que la teneur faible des polyphénols et flavonoïdes est la responsable de cette activité.

L'activité cytotoxique des extraits de *N. oleander* a été confirmée par plusieurs tests, qui visent la détermination de plusieurs mécanismes de cytotoxicité.

Les extraits de *N. oleander* ont présenté un effet dénaturant sur les protéines, plus que celui de HCl et ils ont favorisé l'effet dénaturant de la température, ainsi qu'ils ont présenté une activité antiprotéase en inhibant la trypsine.

L'extrait acétique et aqueux ont présenté le mécanisme d'induction des espèces réactives d'oxygène, en inhibent l'activité de catalase et induisent la peroxydation lipidique. Les tests sur *Saccharomyces cerevisiae* (test antiprolifération, inhibition de consommation de glucose et test de cytotoxicité) ont confirmé l'effet cytotoxique de la plante. Les trois extraits ont inhibé la prolifération cellulaire et la consommation de glucose d'une manière significative ce qui induit à une cytotoxicité.

On suppose que *N. oleander* agisse par plusieurs mécanismes de cytotoxicité à cause de la présence de quelques composés cytotoxiques comme les alcaloïdes et les glycosides cardiaques. Ce qui encourage son développement en tant qu'agent anticancéreux.

Références bibliographiques

- Afaq, F., Saleem, M., Aziz, M. H., & Mukhtar, H. (2004). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleandrin. *Toxicology and applied pharmacology*, 195(3), 361-369.
- 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.
- Albert, M. G., Rousselot, D. B., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'Actualité Chimique*, 11, 91-96.
- Alhazmi, A., Salih, M., Aldairi, A., Alghamdi, A., Almalki, A., Almeahmadi, 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-Delille, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Berti éditions.
- Al-Snafi, A. E. (2020). Bioactive ingredients and pharmacological effects of Nerium oleander. *IOSR Journal of Pharmacy*, 10(9), 19-32
- Arshad Qamar, Kehkashan, et al. "Antiproliferative effects of Nerium oleander leaves and their cardiac glycosides odoroside A and oleandrin on MCF-7 cancer cells." *Current Traditional Medicine* 3.2 (2017): 136-145.
- Assia, B., Abdelkader, A., Fatiha, C., Taibi, A., Guenaia, A., Kerzabi, R., & Reda, B. A. (2022). Phytochemical Screening and Antioxidant Properties of Nerium oleander Growing in Algeria. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 14(2), 523-528.
- Ayouaz, S., Koss-Mikołajczyk, I., Adjeroud-Abdellatif, N., Bartoszek, A., Arab, R., Mouhoubi, K., ... & Madani, K. (2023). Anticarcinogenic and antioxidant activities of leaves and flowers hydroalcoholic extracts of Nerium oleander L.: PCA analysis and phytochemical content by FTIR spectroscopy. *The North African Journal of Food and Nutrition Research*, 7(15), 1-8.
- Azouaou, A. L., & Rayane, T. (2019). *Stress Oxydant Au Cours De L'insuffisance Rénale Chronique Marqueurs Oxydants Et Evaluation Des Complications Cardio-vasculaires* (Doctoral dissertation).
- Baize, D. (1988). Guide des analyses courantes en pédologie. *Inra, Paris*, 172.

- Bakir Çilesizoğlu, N., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Sipahi Kuloğlu, S. (2022). Qualitative and quantitative phytochemical screening of Nerium oleander L. extracts associated with toxicity profile. *Scientific Reports*, 12(1), 21421.
- Bao, Z., Tian, B., Wang, X., Feng, H., Liang, Y., Chen, Z., ... & Ying, S. (2016). Oleandrin induces DNA damage responses in cancer cells by suppressing the expression of Rad51. *Oncotarget*, 7(37), 59572.
- Bavunoğlu, I., Balta, M., & Türkmen, Z. (2016). Oleander poisoning as an example of self-medication attempt. *Balkan medical journal*, 33(5), 559-562.
- Bensakhria, A. (2018). Toxicologie Générale. Cytotoxicité, Nécrose, Apoptose.
- Bliefert, C., & Perraud, R. (2007). *Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets*. De Boeck Supérieur.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. 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.
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie Pathologique. Aspects Moléculaires et Cellulaires*, 59-81.
- Bouton, C. M., Frelin, L. P., Forde, C. E., Godwin, H. A., & Pevsner, J. (2001). Synaptotagmin I is a molecular target for lead. *Journal of neurochemistry*, 76(6), 1724-1735.
- Brotelle, T., & Bay, J. O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin du Cancer*, 103(1), 18-29.
- Bruneton, J. (20220). Apocynaceae à hétérosides cardiotoxiques. Plantes toxiques 2008-2021. 3^{ème} édition.
- 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.
- Cahier technique conseille de culture gamma variétale. Pépinière Rey-Buton.(2015). La Londe-les-Maures, France.

- Calderón-Montaña, 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.
- Ceci, L., Girolami, F., Capucchio, M. T., Colombino, E., Nebbia, C., Gosetti, F., ... & Carelli, G. (2020). Outbreak of oleander (*Nerium oleander*) poisoning in dairy cattle: clinical and food safety implications. *Toxins*, 12(8), 471.
- Chaabi, M. (2008). *Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada Baill.(Euphorbiaceae), Anogeissus leiocarpus Guill. & Perr.(Combretaceae), Limoniastrum feei (Girard) Batt.(Plumbaginaceae)* (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg)(1971-2008)).
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P et Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 178-180.
- Chavan, U. D., Shahidi, F., & Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food chemistry*, 75(4), 509-512.
- Chopra, R. N., & Nayar, S. L. (1956). *Glossary of Indian medicinal plants*. Council of Scientific and Industrial Research.
- Cohen, M. D., Yang, Z., & Zelikoff, J. T. (1994). Immunotoxicity of particulate lead: in vitro exposure alters pulmonary macrophage tumor necrosis factor production and activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 42(4), 377-392.
- Cunningham, S. D., & Berti, W. R. (2020). Phytoextraction and phytostabilization: technical, economic, and regulatory considerations of the soil-lead issue. In *Phytoremediation of contaminated soil and water* (pp. 359-376). CRC Press.
- Derwich, E., Benziene, Z., & Boukir, A. (2010). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil from flowers of *Nerium oleander*. *Electronic journal of environmental, agricultural & food chemistry*, 9(6).
- Dey, P. (2020). The pharmaco-toxicological conundrum of oleander: Potential role of gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110422.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid

peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(1), 161-169.

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.

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). 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).

Ennouri, R., Chouba, L., Magni, P., & Kraiem, M. M. (2010). Spatial distribution of trace metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe and Mn) and oligo-elements (Mg, Ca, Na and K) in surface sediments of the Gulf of Tunis (Northern Tunisia). *Environmental monitoring and assessment*, 163, 229-239.

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.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-117.

Flores Olivares, C. A., Moraga Muñoz, C. A., López Eldredge, F., Pinto Morales, J. I., Navarrete Figueroa, L. A., Rodríguez Latorre, C. A., ... & Sam Rodríguez, S. (2019). Accidental poisoning with Nerium oleander in dairy goat in the Santiago metropolitan region in Chile. *Revista de Medicina Veterinaria*, (39), 43-48.

Franco, A., Rufo, L., Zuluaga, J., & de la Fuente, V. (2013). Metal uptake and distribution in cultured seedlings of Nerium oleander L. (Apocynaceae) from the Río Tinto (Huelva, Spain). *Biological trace element research*, 155, 82-92.

Galton, A. F., Granfone, M. C., & Caldwell, D. J. (2020). Digoxin-specific antibody fragments for the treatment of suspected Nerium oleander toxicosis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 6(2), 2055116920969599.

Geneux, N., Piyenko, N., Le Masne, I. (2020). Le laurier-rose : plante toxique. Equipidia.ifce.

Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., & GOETZ, P. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* (p. 228). Springer Paris.

Hardin, J. W., & Arena, J. M. (1974). Human poisoning from native and cultivated plants. 2nd edition.

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC biotechnology*, 4(1), 1-6.

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC biotechnology*, 4(1), 1-6.

Hijjawi G, Hussein Al-Masimi HH; Muhammad Jamil Qasim R. (2004) Pharmacognosie et plantes médicinales⁵. Bibliothèque Dar Al Thaqafa pour l'édition et la distribution, Amman, pp. 285-183-85.

Hong, D. S., Henary, H., Falchook, G. S., Naing, A., Fu, S., Moulder, S., ... & Kurzrock, R. (2014). First-in-human study of pbi-05204, an oleander-derived inhibitor of akt, fgf-2, nf-κB and p70s6k, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*, 32, 1204-1212.

Hu, X., Chen, T., Zhang, S., Zhang, Q., Li, C., & Wang, X. (2022). Antitumour effect of odoroside A and its derivative on human leukaemia cells through the ROS/JNK pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 130(1), 56-69.

Jude CA (2013) Extraction, Characterization and industrial applications of Tobacco Seed Oil (Nicotiana tabacum). *Chemistry and Materials Research* 3(2) : 19–21.

Kadri, M., & Yahia, A. (2015). Contribution à l'étude de l'effet des facteurs environnementaux sur l'accumulation des glycosides chez Nerium oleander L. *Journal of Bioresources Valorization*, 23.

Kaliche, F. Z., & Djemoui, F. *Expression phytochimique des plantes (cas Fabaceae) face aux stress écologiques* (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah, Ouargla).

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.

Kang, W., Bao, J., Zheng, J., Xu, F., & Wang, L. (2018). Phytoremediation of heavy metal contaminated soil potential by woody plants on Tonglushan ancient copper spoil heap in China. *International journal of phytoremediation*, 20(1), 1-7.

Kebir, T., & Bouhadjera, K. (2011). Effects of Heavy Metals Pollution in Soil and Plant in the Industrial Area, 55 (6), 1018-1023.

Khalid, N., Noman, A., Nazir, A., Tufail, A., Hadayat, N., Alzuaibr, F. M., ... & Aqeel, M. (2023). Nerium oleander could be used for sustainable management of traffic-borne elemental-enriched roadside soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(14), 40551-40562.

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.

Kiang, J. G., Warke, V. G., & Tsokos, G. C. (2003). NaCN-induced chemical hypoxia is associated with altered gene expression. *Molecular and cellular biochemistry*, 254, 211-216.

Kiran, C., & Prasad, D. N. (2014). A review on: Nerium oleander Linn. (Kaner). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(3), 593-597.

Ko, Y. S., Rugira, T., Jin, H., Park, S. W., & Kim, H. J. (2018). Oleandrin and its derivative odoroside A, both cardiac glycosides, exhibit anticancer effects by inhibiting invasion via suppressing the STAT-3 signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3350.

Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M., & Hseini, S. (2009). Catalogue of medicinal plants used in the region Zaer (Western Morocco). *Lejeunia*, (186).

Ma, Y., Zhu, B., Yong, L., Song, C., Liu, X., Yu, H., Wang, P., Liu, Z., Liu, X., 2016. Regulation of Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways in Osteosarcoma Cells Following Oleandrin Treatment.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.

- Majinda, R. R., Abegaz, B. M., Bezabih, M., Ngadjui, B. T., Wanjala, C. C., Mdee, L. K., ... & Yeboah, S. O. (2001). Recent results from natural product research at the University of Botswana. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1197-1208.
- Malik R, Bokhari TZ, Siddiqui MF, Younis U, Hussain MI & Khan IA (2015) Antimicrobial activity of Nerium oleander L. and Nicotiana tabacum L.: A comparative study. *Pakistan Journal of Botany* 47(4): 1587–1592
- Mariquit, M., Oyong, G. G., Ng, V. A. S., Shen, C. C., & Ragasa, C. Y. (2018). Cytotoxic compounds from *Wrightia pubescens* (R. Br.). *Pharmacognosy research*, 10(1), 9.
- Mekhail, T., Kaur, H., Ganapathi, R., Budd, G. T., Elson, P., & Bukowski, R. M. (2006). Phase I trial of Anvirzel™ in patients with refractory solid tumors. *Investigational new drugs*, 24, 423-427.
- 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.
- Morsy, N. (2017). Cardiac glycosides in medicinal plants. *Aromatic and medicinal plants—back to nature. London: Intechopen*, 29-45.
- Mostaqul H.M., Jabbar A, Rashid M.A & Hasan C.M. (1999) A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of Nerium oleander. *Fitoterapia*, 70(1), 5-9.
- Moulsma, M., Lacassie, É., Boudre, I., Gaulier, J. M., Delafosse, B., & Lardet, G. (2000). A propos d'un cas d'intoxication volontaire au Laurier rose (*Nerium oleander* L., Apocynaceae). In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 12, No. 2, pp. 122-130). EDP Sciences.
- Mustafa, S. K., Oyouni, A. A. W. A., Aljohani, M. M., & Ahmad, M. A. (2020). Polyphenols more than an Antioxidant: Role and Scope. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 14(1).
- Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Nga, E. N., Ngolsou, F., Nyangono Ndongo, M., Soppo Lobe, V., Betoté, D. P. H., Benga Mekoulou, C., ... & Minkande, Z. (2020). Étude Toxicologique In Vivo de l'Extrait Aqueux des Feuilles de *Psychotria Calceata*. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 21(10).
- Oh, J. J., Park, E. S., Kim, S. S., Lee, M. S., Lee, W. J., Pak, B. S., ... & Kim, S. D. (2022). Local lymph node assay: 5-bromo-d-deoxyuridine-ELISA method for comparative study in

assessing chemical potencies and skin sensitization in BALB/c and CBA/J strains. *Toxicology Reports*, 9, 499-504.

Oudtshoorn, S., Gera, S., & Gera, P. (2020). Paediatric facial burns from oleander leaves. *The Medical Journal of Australia*, 213(6), 265-265.

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* 2012; 1 (1): 07, 14.

Palmisano, P., Hadad, Y., & De Nuccio, F. A. (2015). An unusual case of oleandrin poisoning suggesting its possible antiarrhythmic activity. *Europace*, 17(9), 1401.

Pan, L., Zhang, Y., Zhao, W., Zhou, X., Wang, C., & Deng, F. (2017). The cardiac glycoside oleandrin induces apoptosis in human colon cancer cells via the mitochondrial pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 80, 91-100.

Pan, Y., Rhea, P., Tan, L., Cartwright, C., Lee, H. J., Ravoori, M. K., ... & Yang, P. (2015). PBI-05204, a supercritical CO₂ extract of Nerium oleander, inhibits growth of human pancreatic cancer via targeting the PI3K/mTOR pathway. *Investigational New Drugs*, 33, 271-279.

Pao-Franco, A., Hammond, T. N., Weatherton, L. K., DeClementi, C., & Forney, S. D. (2017). Successful use of digoxin-specific immune Fab in the treatment of severe Nerium oleander toxicosis in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 27(5), 596-604.

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

Pastre, J. (2005). *Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques* (Doctoral dissertation).

Paynot M., Martin C. (1969). *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, 15, 47.

Rahman H., Eswaraiah M. C., Dutta A. M. (2015). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of Oryza sativa Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 15(1) : 115-121.

- Ramu, A. K., Ali, D., Alarifi, S., Abuthakir, M. H. S., & Abdul, B. A. A. (2021). Reserpine inhibits DNA repair, cell proliferation, invasion and induces apoptosis in oral carcinogenesis via modulation of TGF- β signaling. *Life sciences*, 264, 118730.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2007). Biologia vegetal. In *Biologia vegetal* (pp. 30-830).
- Redha, A. A. (2020). Phytochemical investigations of Nerium oleander L. leaves and flowers. *Int. J. Sci. Res. in Chemical Sciences Vol*, 7(4).
- Renier, A. C., Kass, P. H., Magdesian, K. G., Madigan, J. E., Aleman, M., & Pusterla, N. (2013). Oleander toxicosis in equids: 30 cases (1995–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(4), 540-549.
- Ribatti D. (2017). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology*, 70 : 97-101.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux.
- Romani, A., Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A., & Heimler, D. (2006). Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 95(2), 221-225.
- Roth, M. T., Cardin, D. B., Borazanci, E. H., Steinbach, M., Picozzi, V. J., Rosemury, A., ... & Berlin, J. (2020). A phase II, single- arm, open- label, bayesian adaptive efficacy and safety study of PBI- 05204 in patients with stage IV metastatic pancreatic adenocarcinoma. *The Oncologist*, 25(10), e1446-e1450.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- Saghafinia, S., Homicsko, K., Di Domenico, A., Wullschleger, S., Perren, A., Marinoni, I., ... & Hanahan, D. (2021). Cancer cells retrace a stepwise differentiation program during malignant progression. *Cancer discovery*, 11(10), 2638-2657.
- Sanogo, R. (2006). Le rôle des plantes en médecine traditionnelle. *Développement, Environnement et Santé*. 10e école d'été de l'IEPF et du SIFEE du, 6.

- 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.
- Seher, A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Jilani, M. I., & Mahomoodally, M. F. (2020). Oleander. In *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 525-539). Elsevier.
- Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian journal of plant physiology*, 48, 523-544.
- Sharma, R., Singh, S., Tewari, N., & Dey, P. (2023). A toxic shrub turned therapeutic: The dichotomy of Nerium oleander bioactivities. *Toxicon*, 107047.
- 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.
- Shridhar, N. B. (2022). Nerium oleander toxicity: A review. *Int. J. Adv. Acad. Stud.*, 4, 10.
- Singh, Y., Nimoriya, R., Rawat, P., Mishra, D. K., & Kanojiya, S. (2022). Quantitative evaluation of cardiac glycosides and their seasonal variation analysis in Nerium oleander using UHPLC- ESI- MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 33(5), 746-753.
- 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., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). 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.
- Sökmen, B. B., Aydın, S. and Kınalıoğlu, K. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *Journal of Biology*, 71 : 43-51.

Stursa J. (2001). Arbres et Arbustes à feuilles persistantes. Grand Paris. P118-203. 23/Maaoui, M., & Eloutaya, S. D. B. R. (2014). Atlas Plantes Ornementales des Ziban'. *Station de Bio Ressources El Otaba. Edition CRSTRA*.

Tanguy J. (1970). Thèse Doct. Sc. Nat., Paris.

Tatlısu, M. A., Çekirdekçi, E. İ., Akyüz, Ş., & Nurkalem, Z. (2015). A case of Mobitz type II atrioventricular block due to Nerium oleander poisoning successfully managed with digoxin-specific Fab antibody fragments. *Archives of the Turkish Society of Cardiology*.

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*, 2019.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T.D.c., Mazur M., Telser J d. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39(1): 44–84.

Wichtl M., Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2ème édition.

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.









Zaid, R., Canela-Garayoa, R., Ortega-Chacón, N. M., & Mouhouche, F. (2022). Phytochemical analyses and toxicity of *Nerium oleander* (Apocynaceae) leaf extracts against *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854 (Homoptera: Aphididae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(5), 310-317.









Zapromietov M.-N. (1959). Dokl. Akad. Nauk SSSR, 125, 1359.

Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2006). A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *The Journal of chemical physics*, 125(19).

ANNEXES

Annexe (1) : Types de *Nerium oleander* (Tableau 1)

Couleur/pétale	Exemples	Fleurs	Images
Rouge doubles	Blue-blanc Ré D	Double Bicolore : rouge et blanc	
	Tamouré	Double, rouge foncé Très parfumée	
Rouge simple	Italia	Rouge vif Parfumée	
	Sabra	Petite fleur rouge sombre	
Rose doubles	Madame allen	Rose Très parfumé	
	Louis pouget	Grande fleur Rose foncé, très parfumée	
Rose Simple	Magaly	Rose lilas, légèrement parfumée	
	Margaritha	Rose vif, légèrement parfumée	

Abricot	Rosario	Double ou semi-double, abricot Légèrement parfumée	
	Soleil levant	Double, abricot foncé	
Blanc	Alsace	Simple Blanc rosé, légèrement parfumé	
	Mont blanc	Double, blanche, très parfumée	
Saumons	Petite salmon	Fleur simple en cornet rose saumoné clair	
	Provence	Double Saumon clair infusé de crème Très parfumée	
Jaune	Angiolo pucci	Simple Ivoire blond à gorge orange	
	Marie gambetta	Très grande fleur simple Jaune pur à gorge plus foncée	

Annexe (2) : Une série des réactifs chimiques, des matériels et des appareillages du laboratoire, ont été utilisés pour la réalisation de ce travail de recherche.

1. Réactifs chimiques

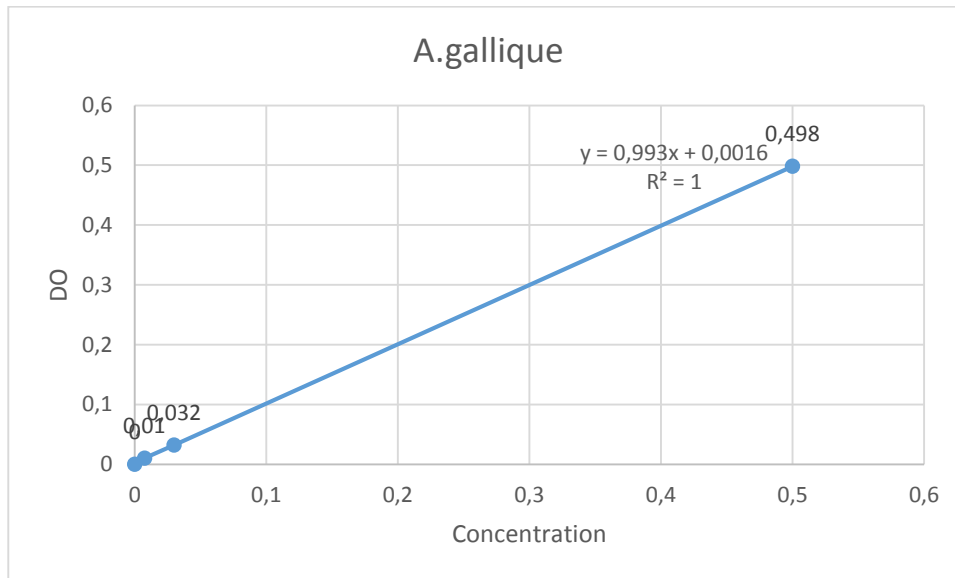
Les réactifs chimiques		
Éthanol	Quercétine	NaCN
Méthanol	Nicotine	NaCL
Acide acétique	Glucose	Kcl
Acide sulfurique	Ovalbumine	Na EDTA
Acide salicylique	Trypsine	NaOH
Acide ascorbique	Caséine	KH ₂ Po ₄ et K ₂ Hpo ₄
Acide chlorhydrique (Hcl)	Acide gallique	SDS
L'eau oxygéné (H ₂ O ₂)	Agarose	TBA
Soufre de bromocresol	Peptone	TCA
Triton x	Chlorure de fer (FeCl ₃)	BSA
Rouge de méthyl	Réactif de Folin-ciocalteu	TBE
Eau distillée	La levure	Bicarbonate de sodium
Tampon de charge	Chloroforme (CHCl ₃)	Solution de DPPH
Solution Alcl ₃	FeSo ₄	Ferrozine
Tris Hcl		Sucrose

2. Matériels du laboratoire

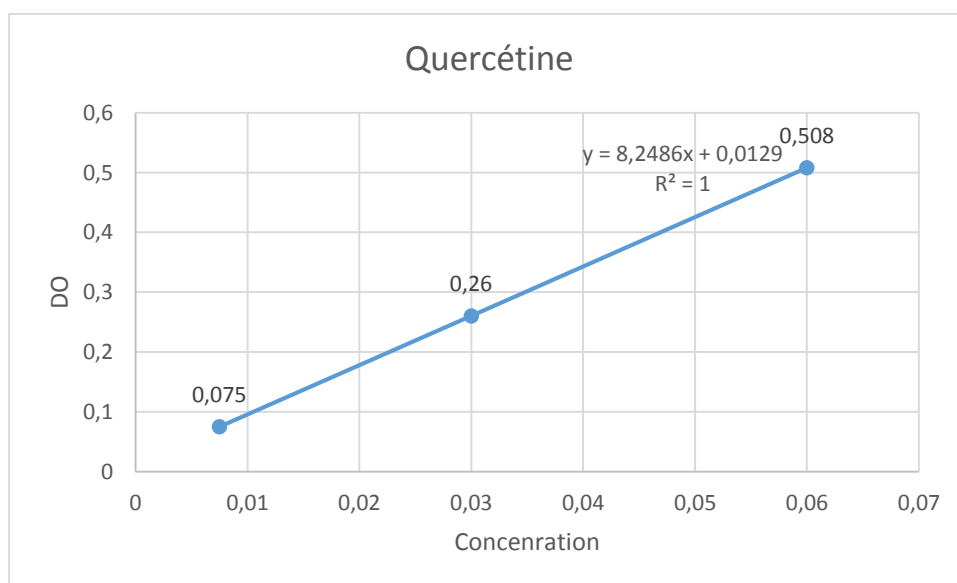
Matériels et appareillages de laboratoire	
Éprouvette graduée	L'étuve
Les épindorfes	Réfrigérateur
Boîtes de pétri	Centrifugeuse
Fiole jaugée	Balance analytique
Mortier	Bain marie
Cuve en plastique, en verre et en quartz	Bain de sable
Pissette	Spectrophotomètre UV visible
Portoire des tubes	Vortex
Les Ombos	Agitateur et pH mètre
Tubes à essai	Rota vapeur
Tubes à hémolyse	Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)
Barre d'agitation magnétique	Appareil à UV et d'électrophorèse
Pipete	Plaque chauffante
Micropipettes	Papier absorbant et d'aluminium
Spatule	Gants chirurgicaux
Béchers	Seringue
Pipete pasteur	Ballon de rota vapeur

Annexe (3) : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Concentration (mg /ml)	0	0,0075	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1
Absorbance(nm)	0	0,01	0,019	0,032	0,101	0,194	0,27	0,498	0,53

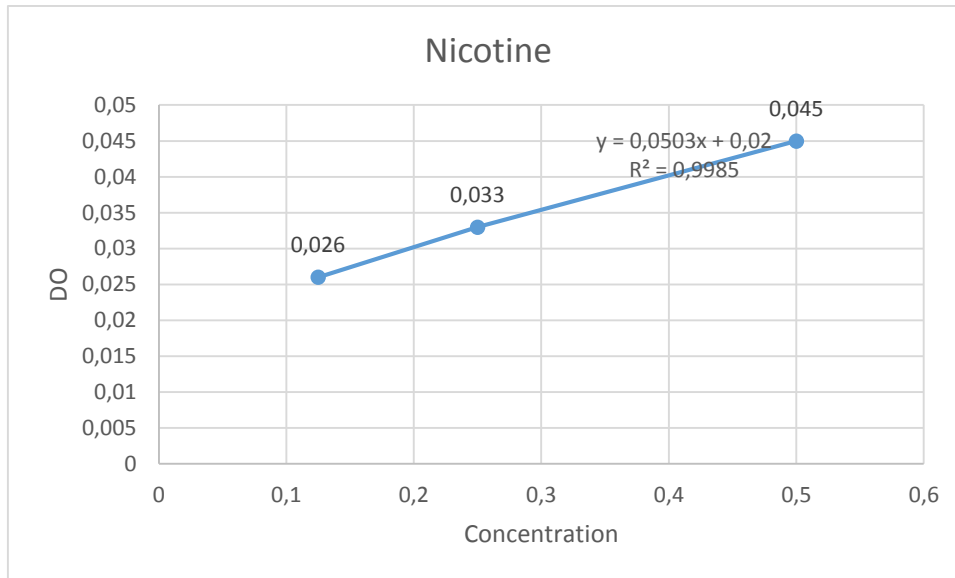
**Annexe (4) : Courbe d'étalonnage de quercétine**

Concentration (mg /ml)	0	0,0075	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25
Absorbance(nm)	0	0,075	0,301	0,26	0,508	1,346	1,728



Annexe (5) : Courbe d'étalonnage de la nicotine

Concentration (mg /ml)	0	0,0075	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1
Absorbance(nm)	0	0,005	0,021	0,03	0,018	0,026	0,033	0,045	0,043



Réalisée par :

ABBOUD AFEF

HARMA AIDA

RIDA CHAFIA

Encadré par :

Dr LAHOUEL Asma

Evaluation de la cytotoxicité des extraits de *Nerium oleander* in vitro

Résumé

N. oleander est une plante très propagée dernièrement, elle est utilisée comme plante d'ornement en raison de ses fleurs colorées, elle est aussi connue par sa toxicité et ces effets nocifs. Dans cette étude, la caractérisation phytochimique, le pouvoir antioxydant et le profil de cytotoxicité des trois extraits (acétique, méthanolique et aqueux) des feuilles de *N. oleander* ont été étudiées.

Dans la caractérisation phytochimique, on vise la détermination de la teneur des polyphénols, des flavonoïdes et des alcaloïdes quantitativement et la teneur des glycosides cardiaques qualitativement, ensuite le pouvoir antioxydant a été évalué par le test de réduction de DPPH, la capacités antioxydants et de chélation du fer. Le pouvoir pro oxydant a été investigué par l'évaluation des effets des extraits sur l'induction de la peroxydation lipidique, de la dénaturation des protéines et l'inhibition de la catalase. Les effets cytotoxiques de cette plante ont été également étudiés sur le modèle de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus indiquent que la teneur la plus élevé des alcaloïdes est enregistré dans l'extrait acétique, alors que la teneur la plus élevés des polyphénols, des flavonoïdes et des glycosides cardiaques est enregistré dans l'extrait méthanolique. Les trois extraits présentent une activité antioxydante négligeable et une activité pro-oxydante, anti-proliférative et cytotoxique. Enfin, les résultats montrent que *N. oleander* possède des effets cytotoxiques *in vitro*, avec le potentiel d'être utilisé comme traitement contre le cancer.

Mots clés : *Nerium oleander*, cytotoxicité, extrait aqueux, extrait méthanolique, extrait acétique.

Absattract

N. oleander is a widely propagated plant used as an ornamental because of its colorful flowers ; however, it is also known for its toxicity and harmful effects. In this study, the phytochemical characterization, antioxidant power and cytotoxicity profile of three extracts (acetic, methanolic and aqueous) of *N. oleander* leaves were investigated.

In the phytochemical characterization, we aimed to determine the content of polyphenols, flavonoids and alkaloids quantitatively and the content of cardiac glycosides qualitatively. In addition, the antioxidant power was assessed by the DPPH test, antioxidant capacities, iron chelation, lipid peroxidation and the catalase test, which are indicators of oxidative stress. The cytotoxic effects of this plant are investigated by trypsin inhibition, protein denaturation, inhibition of glucose consumption by yeast, inhibition of yeast proliferation and cytotoxicity. The results obtained indicate that the highest alkaloid content is recorded by the acetic extract, while the highest content of polyphenols, flavonoids and cardiac glycosides is recorded by the methanolic extract. All three extracts show negligible antioxidant activity, with a pro-oxidant, anti-proliferative and cytotoxic activity. Finally, the results show that *N. oleander* possesses cytotoxic effects *in vitro*, with the potential to be used as a cancer treatment.

Keywords: *Nerium oleander*, cytotoxicity, aqueous extract, methanolic extract, acetic extract,

المخلص

يعتبر نبات الدفلة نباتًا شائعًا جدًا مؤخرًا، ويستخدم كنبات للزينة بسبب أزهاره الملونة، كما أنه معروف بسميته وآثاره الضارة. في هذه الدراسة، تم فحص الخصائص الكيميائية النباتية وقوة مضادات الأكسدة وملف السمية الخلوية للمستخلصات الثلاثة (الخليك والميثانولي والمائي) لأوراق نبتة الدفلة. في التوصيف الكيميائي النباتي، نهدف إلى تحديد محتوى البوليفينول والفلافونويد والقلويدات كمياً ومحتوى الجليكوسيدات القلبية نوعياً، ثم تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باختبار DPPH، والقدرات المضادة للأكسدة، واستخلاص الحديد، وبيروكسيد الدهون واختبار الكاتالاز، وهي مؤشرات على الإجهاد التأكسدي. تمت دراسة التأثيرات السامة للخلايا لهذا النبات عن طريق اختبارات تثبيط التربسين، وتمسخ البروتين، وتثبيط استهلاك الجلوكوز بالخميرة، وتثبيط التكاثر والسمية الخلوية للخمائر. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن أعلى محتوى من القلويدات تم تسجيله بواسطة مستخلص الأستينيك، بينما تم تسجيل أعلى محتوى من البوليفينول والفلافونويد والجليكوسيدات القلبية بواسطة المستخلص الميثانولي. تظهر المستخلصات الثلاثة نشاطاً ضئيلاً في مضادات الأكسدة ونشاطاً مؤيداً للأكسدة ومضاداً للتكاثر وساماً للخلايا. أخيراً، أظهرت النتائج أن نبات الدفلة تأثيرات سامة للخلايا في المختبر، مع إمكانية استخدامها كعلاج للسرطان

الكلمات المفتاحية: النيريوم الدفلي، السمية الخلوية، المستخلص المائي، المستخلص الميثانولي، خلاصة الأستينيك.