

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche
Scientifique
Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
TIZI OUZOU

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

Département de Pharmacie
N° D'ordre :

٢٠٢٣/٢٠٢٢

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement
En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie :

Le : 24/07/2023

Sous le Thème :

**Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de
Pergularia tomentosa L., Asclépiadacée et étude de leur activité
antioxydante in vitro et leur toxicité aiguë par voie orale sur des
souris BALB/c.**

Réalisé par : MAACHE Hanane
MEBARKA Hayat
MEBARKI Aldjia

Encadré par : Dr BERIALA Hadjer
Nour El Imane

Membre de jury :

Dr. LOUEDJ.L.

Chargé des cours

UMMTO département
de pharmacie

PRESIDENT

Dr. NAAMANI .A.

MAHU

UMMTO département
de pharmacie

EXAMINATRICE

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2022/2023

Résumé :

Introduction : *Pergularia tomentosa* L., est une Asclépiadacée très répandue au Sahara algérien, et dont la variabilité de sa teneur en composés phénoliques a été documentée par de multiples études comme étant influencée par nombreux facteurs.

Objectifs : Notre étude vise principalement à optimiser l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. par plans d'expériences et secondairement à réaliser le criblage phytochimique ainsi que la mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro et de la toxicité aigüe in vivo de cette plante.

Matériel et méthodes : Un plan factoriel complet à deux niveaux a été adopté en vue de l'optimisation de l'extraction par le méthanol des polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés des feuilles de *Pergularia tomentosa* L.. Et ce en variant trois facteurs (concentration du méthanol, durée d'extraction, ratio (masse/solvant)). Un examen macroscopique et microscopique a été effectué, suivi d'un screening phytochimique par des réactions standards. L'activité antioxydante des extraits préparés dans des conditions optimales a été réalisée par la méthode de DPPH et le pouvoir réducteur du fer (FRAP). Enfin, une étude de toxicité aigüe par voie orale sur des souris BALB/c a été également menée.

Résultats : Le criblage phytochimique a révélé la présence de glucides, lipides, protéines, hétérosides cardiotoniques, polyphénols, flavonoïdes, tanins et alcaloïdes. L'étude par plan factoriel complet à deux niveaux a montré qu'une teneur maximale des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., en tanins condensés (81,100 µg ECT/ g MS) pourrait être obtenue dans les conditions optimales suivantes : concentration du méthanol 30%, ratio 0,08(p/v) et une durée de (120 min.). Tandis que celle des flavonoïdes (27,150 µg ER/g MS) est obtenue avec une concentration du méthanol 30%, un ratio 0,05(p/v), et une durée d'extraction de 210min. Les extraits préparés dans les conditions optimales ont présenté un bon pouvoir réducteur avec l'extrait de flavonoïdes (206,60 mg EAA/g de MS) et une forte activité anti-radicalaire avec l'extrait de tanins condensés (0,006 mg EAA/ml) face à une valeur (0,081 mg EAA/ml) de standard (vitamine C). L'étude de toxicité aigüe menée sur des souris BALB/c a montré l'absence de mortalité à une dose d'extrait de 5000mg/kg. Cependant, celle-ci a été associée à quelques signes de toxicité (diminution de mouvements, posture allongée, fermeture totale des yeux) et à une réduction significative sur la consommation d'eau (p= 0,045) et à une diminution de poids des organes (foie, p=0,048).

Conclusion: le recours aux plans d'expérience a permis de maîtriser l'effet des facteurs d'extractions pour l'obtention des teneurs maximales en flavonoïdes et en tanins condensés à partir des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. Celles-ci pourraient être une source d'obtention de substances antioxydantes exploitées à l'échelle industrielle.

Mots-clés : optimisation, composés phénolique, *Pergularia tomentosa* L., soxhlet, plan factoriel complet à deux niveaux, toxicité aigüe par voie orale in vivo, activité antioxydante.

Abstract:

Introduction: *Pergularia tomentosa* L., is a very common Asclepiadaceae in the Algerian Sahara, and the variability of its phenolic compound content has been documented by multiple studies as being influenced by many factors.

Objectives: Our study aims primarily to optimize the extraction of phenolic compounds from the leaves of *Pergularia tomentosa* L., using experimental designs, and secondarily to perform phytochemical screening as well as in vitro antioxidant activity and acute in vivo toxicity of this plant.

Materials and methods: A complete factorial design with two levels was adopted to optimize the extraction of polyphenols, flavonoids, and condensed tannins from the leaves of *Pergularia tomentosa* L., by varying three factors (methanol concentration, extraction time, and mass/solvent ratio). A macroscopic and microscopic examination was performed, followed by phytochemical screening using standard reactions. The antioxidant activity of the extracts prepared under optimal conditions was determined by the DPPH method and the ferric reducing antioxidant power (FRAP). Finally, an acute oral toxicity study was conducted on BALB/c mice.

Results: Phytochemical screening revealed the presence of carbohydrates, lipids, proteins, cardiotoxic heterosides, polyphenols, flavonoids, tannins, and alkaloids in the leaves of *Pergularia tomentosa* L. The complete factorial design study showed that a maximum content of condensed tannins (81,100 μg ECT/g MS) could be obtained under the following optimal conditions: 30% methanol concentration, 0.08 (w/v) ratio, and an extraction time of 120 min. Meanwhile, the maximum flavonoid content (27,150 μg ER/g MS) was obtained with a 30% methanol concentration, 0.05 (w/v) ratio, and an extraction time of 210 min. The extracts prepared under optimal conditions showed good reducing power with the flavonoid extract (206.60 mg EAA/g MS) and strong anti-radical activity with the condensed tannin extract (0.006 mg EAA/ml) compared to the standard value (0.081 mg EAA /ml) of vitamin C. The acute toxicity study conducted on BALB/c mice showed no mortality at an extract dose of 5000mg/kg. However, this one was associated with some signs of toxicity (reduced movements, lying posture, complete eye closure) and a significant reduction in water consumption ($p = 0.045$) and a decrease in organ weight (liver, $p = 0.048$).

Conclusion: The use of experimental designs made it possible to control the effect of extraction factors to obtain maximum levels of flavonoids and condensed tannins from the leaves of *Pergularia tomentosa* L. These could be a source of obtaining antioxidant substances that could be exploited on an industrial scale.

Keywords: optimization, phenolic compounds, *Pergularia tomentosa* L., soxhlet, full factorial design at two levels, acute oral toxicity in vivo, antioxidant activity.

Introduction :

Pergularia tomentosa L., est une Asclépiadacée poussant sur les sols généralement sablonneux et couvre de vastes régions allant du Sahara jusqu'aux déserts du sud et de l'est de l'Iran, à l'Afghanistan et au Pakistan, en passant par la Corne de l'Afrique, le Sinaï (Egypte), la Jordanie et la péninsule Arabique. Elle est très répandue en Afrique du Nord, plus commune dans le Sahara algérien où elle est connue sous le nom vernaculaire kalga. Les parties aériennes de cette plante sont utilisées par la population locale pour traiter les dermatoses, les teignes, les angines, les piqûres de scorpions, comme antihelminthiques et agent hypoglycémiant^[1-4].

Etymologiquement, "*Pergularia*" vient du latin "Pérgula" qui signifie "vigne" et "*tomentosa*" signifie poilu. C'est un sous-arbrisseau vivace pouvant dépasser 1m de hauteur, lactescent à rameaux jeunes souvent volubiles. Les feuilles sont opposées simples, pétiolées, ovales, orbiculaires, cordées à la base, tomenteuses sur les deux faces au stade jeune et glabres au stade adulte, elles mesurent environ 5 cm de diamètre mais souvent plus petites. Les fleurs sont souvent blanc pourpres et odoriférantes. Les fruits sont de type follicules groupés par paire, fusiformes, divergents, rugueuses et pubescents. Ils sont crochus à leur sommet et s'ouvrent par une fente longitudinale où s'échappent des graines aplaties et pubescentes menées d'une marge plus légère et crénelée^[1].

De point de vue phytochimique, cette plante est connue pour sa richesse en métabolites primaires et surtout secondaires dont les composés phénoliques. Les études antérieures ont montré que la teneur en ces composés varie selon l'organe utilisé, la méthode d'extraction, la nature du solvant ainsi que les conditions opératoires (température, durée d'extraction, ...) adoptées, elle est plus élevée au niveau des feuilles qu'aux fruits et tiges (50.56±1.81 mg, 41.82±15.65 mg EAG/ g et 16.76±1.57 mg EAG/g respectivement)^[5,6].

De plus, il a été rapporté que le recours à une extraction en mode continu par le dispositif Soxhlet, permet d'augmenter le rendement en composés phénoliques en répétant plusieurs fois le cycle d'extraction jusqu'à épuisement total de la drogue comparativement à d'autres méthodes classiques d'extraction tel que la macération et la décoction, en raison de l'inconvénient de temps long, de grand volume du solvant utilisé, de leur incompatibilité avec les composés thermolabiles et la nécessité de procéder à une filtration finale^[7,8].

En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'usage de l'alcool et des mélanges hydro alcooliques fournissent les meilleurs rendements en ces composés phénoliques. Une étude portée sur les feuilles de *Pergularia tomentosa* L. a montré que le méthanol permet d'obtenir

un rendement élevé comparativement à l'eau et au chloroforme avec des taux de 28,6% ; 22,71%et 3,71% respectivement. De plus, il a été également rapporté que la combinaison méthanol-eau à des proportions 70 : 30 en volume donne le meilleur rendement en polyphénols à partir des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* L. par rapport à d'autres solvants dont éthanol-eau, acétone-eau et eau distillée^[9,10].

D'autres facteurs peuvent également influencer l'extraction de ces composés, tels que le ratio (masse/solvant) la durée d'extraction et la température. Cette dernière facilite l'extraction en augmentant la solubilité des matières à extraire et les coefficients de diffusion et en diminuant la viscosité des solvants d'extraction, ce qui favorise le passage du solvant à travers la masse de drogue. Aussi la maîtrise de la durée d'extraction permet non seulement d'éviter la dégradation des composés phénoliques mais aussi l'optimisation du rendement d'extraction. Enfin, le ratio (masse/solvant) est un paramètre très important pour des meilleurs rendements. En effet, le volume du solvant doit être suffisant pour bien hydrater la phase solide, tout en permettant un transfert plus facile des composés phénoliques vers le solvant. Il doit être aussi suffisant afin d'éviter la saturation en ses composés et permettre leur diffusion dans le solvant d'extraction^[11,12].

En examinant la méthodologie d'étude du processus d'extraction des composés naturels et plus précisément l'effet des facteurs précités sur le rendement en composés phénoliques - considérée comme une réponse à ce processus, deux approches peuvent être distinguées l'approche classique et l'approche par plan d'expériences. La première consiste à fixer à chaque fois le niveau de toutes les facteurs sauf un et l'on mesure la réponse voulue ce qui peut générer un nombre gigantesque d'expériences qui dépasse les limites du faisable, des budgets disponibles et du temps consacré à l'étude. Cependant, l'approche par plan d'expériences permet de minimiser le nombre des essais sans toutefois influencer la qualité. Elle fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience mais d'une manière programmée et raisonnée d'où réside le succès de cette approche [13,14].

Malgré que plusieurs études ont été portées sur l'influence de certains facteurs sur le rendement en composés phénoliques de *Pergularia tomentosa* L., aucun travail n'a procédé à l'effet de la variation simultanée de ces facteurs par plan d'expérience, d'où l'objectif de notre travail qui vise principalement à optimiser l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., en utilisant la méthode des plans d'expérience, dont le plan factoriel complet à deux niveaux et secondairement à réaliser l'étude botanique, le criblage phytochimique, l'activité antioxydante in vitro et la toxicité par voie orale in vivo sur des souris BALB/c.

I. Matériel et méthodes :

1. Matériel végétal :

Les parties aériennes de *Pergularia tomentosa* L., ont été récoltées en mai 2022 au niveau de la région d'Elgrara, Ghardaïa, Algérie. Les feuilles ont été séparées des tiges, étalées en couches minces et séchées pendant quelques jours dans un endroit sec et aéré. L'identification de l'espèce a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA) de Touggourt, Algérie.

2. Etude botanique :

Les caractères morphologiques et organoleptiques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., ont été notés à l'œil nu et à la loupe monoculaire. Pour l'examen botanique microscopique, les feuilles conservées dans un mélange à volume égal d'alcool, de glycérine et d'eau distillée ont été coupées transversalement à l'aide d'une lame de rasoir puis colorées par la méthode de double coloration, qui consiste à tremper successivement les coupes transversales dans de l'eau de javel (20 min), l'acide acétique à 1% (5 min), le vert d'iode (30 sec à 1 min) puis le rouge Congo (5min), avec un rinçage à l'eau distillée après chaque étape. Les coupes transversales ont été montées entre lame et lamelle avec de la glycérine puis examinées au microscope photonique aux différents grossissements (Gx10 et Gx40)^[15].

Les feuilles séchées ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur puis montée entre lame et lamelle avec le réactif de Gazet du Chatelier pour être examinées au microscope optique (Gx10 et Gx40)^[15].

3. Screening phytochimique :

La recherche des métabolites primaires (glucides, lipides et protéines) et secondaires (hétérosides cardiotoniques, hétérosides cyanogènes, saponosides, polyphénols, flavonoïdes, tanins, anthocyanes, quinones, alcaloïdes) a été effectuée par des méthodes physicochimiques qualitatives standards^[16].

3.1. Recherche des glucides par la réaction de Fehling : Un extrait aqueux de la poudre des feuilles délipidées est mélangé avec des volumes égaux de réactif de Fehling A (solution de sulfate de cuivre) et de Fehling B (solution de tartrate du sodium et de potassium), agité et chauffé pendant 10 min.

3.2. Recherche des lipides par la réaction au Soudan III : une goutte d'un extrait hexanique a été déposé sur un papier chromatographique en présence d'un témoin négatif (hexane) puis trempée dans le réactif de soudan III pendant 15 minutes ensuite lavé abondamment à l'eau distillée et séchée.

3.3. Recherche des protéines :

- ✓ **Réaction de Biuret** : un extrait alcoolique de la poudre des feuilles délipidées a été mélangé avec le NAOH à 10% puis une solution de sulfate de cuivre à 0,1% a été rajoutée en goutte à goutte au mélange.
- ✓ **Réaction à la Ninhydrine** : un extrait alcoolique de la poudre des feuilles délipidée est porté à ébullition avec du ninhydrine à 0.25 %.

3.4. Recherche des hétérosides cardiotoniques : un extrait hydro alcoolique de la drogue traitée avec l'acétate basique du plomb a été filtré, puis la solution obtenue a été agité avec du chloroforme. Les réactions suivantes ont été réalisées sur le résidu d'évaporation de la phase organique.

- ✓ **Réaction de Libermann** : le résidu d'évaporation a été traité avec quelques gouttes de l'acide sulfurique et quelques gouttes d'anhydride acétique.
- ✓ **Réaction de Baljet** : le résidu d'évaporation a été traité avec quelques gouttes de la soude à 10% et d'acide picrique à 1%.
- ✓ **Réaction de Kedde** : le résidu d'évaporation a été traité avec quelques gouttes de la soude à 10% et d'acide dinitro-3,5-benzoïque à 1%.
- ✓ **Réaction de Raymond Marthoud** : le résidu d'évaporation a été traité avec quelques gouttes de la soude à 10% et 1-3 Dinitro-benzène à 1%.
- ✓ **Réaction de killer killiani** : le résidu d'évaporation a été traité avec le H₂SO₄(c), et l'acide acétique(c) en présence de traces de FeCl₃ à 2 %.

3.5. Recherche des hétérosides cyanogènes : un extrait alcoolique a été préparé en présence d'HCl à 1%, puis exposé à un papier de Guinard (mélange de carbonate de sodium 10% et d'acide picrique 1%).

3.6. Recherche des saponosides : un décocté aqueux à 1% a subi une dilution dans une série de 11 tubes à essais calibrés (de 16 cm de haut et 16 mm de diamètre), en introduisant successivement 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml, 9ml, 10 ml de décocté suivi d'un ajustement du volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube a été agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Après 15 min de repos, la hauteur de la mousse a été mesurée dans chaque tube.

3.7. Recherche des polyphénols : un extrait hydro alcoolique a été traité avec quelques gouttes de FeCl₃ à 2 %.

3.8 Recherche des flavonoïdes :

- ✓ **Réaction avec KOH alcoolique** : une goutte d'un extrait hydro alcoolique des feuilles a été déposée sur un papier chromatographique puis une quantité de KOH a été rajoutée.
- ✓ **Réaction à la cyanidine** : un extrait hydro alcoolique a été traité avec l'eau distillée, HCL et une quantité magnésium.
- ✓ **Réaction au trichlorure d'aluminium** : l'extrait hydro alcoolique a été mélangé avec une solution d' $AlCl_3$.

3.9. Recherche des tanins :

- ✓ **Réaction de gélatine salée** : un volume de solution de gélatine salée est additionné à un décocté aqueux de la drogue délipidée.
- ✓ **Réaction de Stiasny** : un décocté aqueux de la drogue délipidée a été traité avec le formol chlorhydrique et chauffé au bain-marie à $60^{\circ}C$ pendant 20-30 min.
- ✓ **Réaction de Bath Smith** : une quantité d'HCL a été ajoutée à un décocté aqueux de la drogue délipidée puis chauffé au bain-marie à $90^{\circ}C$ pendant 10 min.

3.10. Recherche des anthocyanes : un décocté aqueux de la poudre des feuilles délipidées à 1 % a été mélangé avec des solutions à différents PH (1, 2, 7, 13, 14).

3.11. Recherche des quinones par la réaction Borntraeger : Une quantité d'HCl est ajoutée à une teinture de drogue. Le mélange est porté à ébullition pendant 3 min. puis agité avec une solution chloroformique. Après décantation, cette dernière phase est récupérée et mélangée avec une solution d'ammoniaque officinale.

3.12. Recherche des alcaloïdes : la poudre des feuilles délipidée est extraite par le chloroforme en présence de quelques gouttes l'ammoniaque après filtration, la solution organique a été agitée avec une solution d'HCl dilué à 1%. Après décantation, La phase aqueuse acidifiée récupérée a été additionnée de quelques gouttes de réactifs généraux d'alcaloïdes (réactif de Mayer, le réactif de Drangendorf et le réactif de Bouchardât).

4. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par plan d'expérience :

4.1. Plan d'expérience choisi : Les plans d'expérience se révèlent comme un outil puissant pour comprendre l'effet de divers facteurs sur une réponse donnée. Il permet d'obtenir le maximum d'informations avec le minimum d'expériences. En effet, son principe consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs (qui sont des variables discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci va permettre d'une part de diminuer

fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés et d'autre part, à détecter les interactions entre les facteurs et la détermination du réglage dit optimal de ces facteurs par rapport à une réponse. Plusieurs méthodes peuvent être adoptées dont le plan factoriel complet à deux niveaux où chaque facteur expérimental (noté k) n'a que deux valeurs, ce qui permet d'avoir 2^k d'expériences. Considérée aussi comme une méthode de référence, le plan factoriel complet à deux niveaux peut servir à l'optimisation par modélisation linéaire voir même un passage vers des modèles non linéaires en ajoutant d'autres expériences sans perdre les résultats des essais réalisés précédemment.

4.2. Méthode d'extraction : L'extraction des composés phénoliques a été réalisée par le dispositif soxhlet. Le montage est constitué d'un ballon de 500 ml rempli de solvant d'extraction (méthanol) à différentes concentrations qui est surmonté de l'extracteur soxhlet dans lequel une cartouche cellulosique contient 20g de la poudre de feuilles de *Pergularia tomentosa* L., préalablement délipidées l'ensemble s'adapte à un condenseur qui permet le refroidissement du solvant chauffé à sa température d'évaporation ($65\pm 3^\circ\text{C}$). L'extrait obtenu est directement analysé pour sa teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés.

4.3. Facteurs étudiés : L'étude d'optimisation a été menée sur des facteurs influençant l'extraction et jugés comme contrôlables à savoir : la concentration du solvant utilisé (X1), Le ratio masse /solvant (X2) et la durée d'extraction (X3). Le choix des domaines expérimentaux c'est-à-dire des niveaux (ou bornes) supérieurs et inférieurs de chaque facteur a été basé sur les données de littérature (tableau I).

Tableau I : les domaines expérimentaux des facteurs étudiés.

Facteur réel	Symbole	Unité	Niveau bas (=borne inférieure)	Niveau haut (=borne supérieure)
Concentration du méthanol	X1	%	30%	70%
Ratio masse /solvant	X2	p/v (g/ml)	0.05	0.08
Durée d'extraction	X3	Minutes	120	210

4.4. Réponse étudiée : Trois réponses ont été étudiées : la teneur en polyphénols (Y1) ; la teneur en flavonoïdes (Y2) et ; la teneur en tanins condensés (Y3). Ces réponses ont été déterminées par les méthodes suivantes :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Un volume de 200 μl d'extrait a été mélangé avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) et 800 μl d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (7,5 %). Le mélange a été agité et incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance de la

solution bleue qui en résulte a été mesurée à 760 nm contre un blanc. ^[17] Les concentrations de l'extrait ont été déduites de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 01) établie avec des dilutions d'acide gallique (0 à 0,4 mg/ml) mesurées dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g de drogue sèche ^[18].

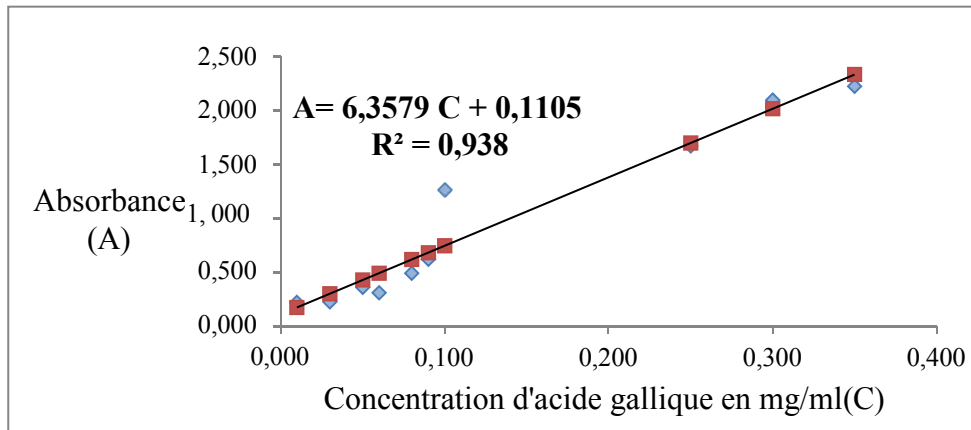


Figure 01 : courbe d'étalonnage d'acide gallique

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode décrite par AL-Farsi et Lee. Un volume de 500 µl de l'extrait a été mélangé avec 1500 µl d'eau distillée. A t=0, 150 µl de nitrite de sodium à 2 % (m/v) ont été ajoutées, 5 minutes après, 150 µl de solution de chlorure d'aluminium à 10% (m/v) est additionné. L'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 6 minutes. A la fin, 2 ml de soude (1 M) sont rajoutés et l'absorbance de la solution est immédiatement mesurée à 430 contre un blanc [12]. Les concentrations de l'extrait ont été déduites de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 02) établie avec des dilutions de la rutine (0 à 0,25 mg/ml) mesurées dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de rutine/g de drogue sèche.

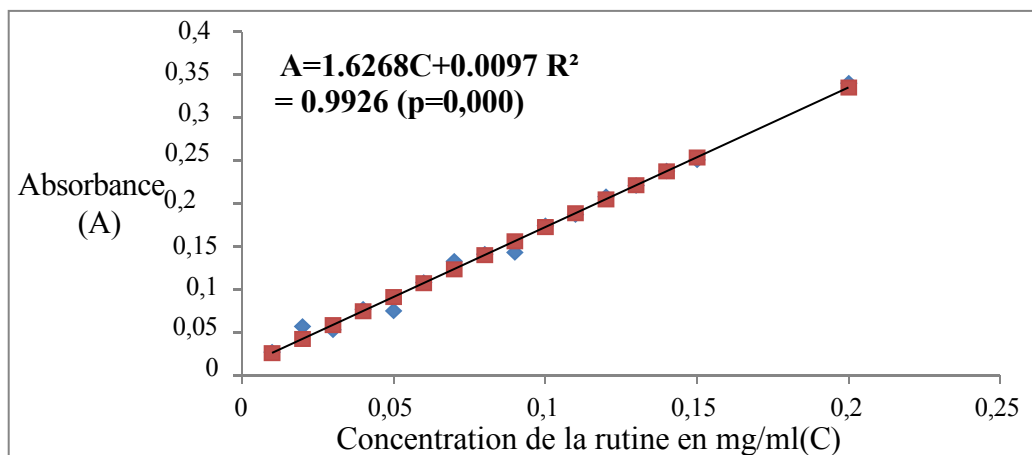


Figure02 : courbe d'étalonnage de la rutine.

Le dosage des tanins condensés a été effectué selon la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Ba et al. Un volume de 400 µl de l'extrait a été mélangé avec 3 ml d'une solution méthanolique de vanilline à 4 % suivi d'une agitation à l'aide d'un vortex. A ce mélange, 1,5 ml d HCl concentré ont été ajoutés puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 min. l'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc.^[20] Les concentrations de l'extrait ont été déduites de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 03) établie avec des dilutions de catéchine (0 à 0,8 mg/ml) mesurées dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de catéchine/g de drogue sèche.

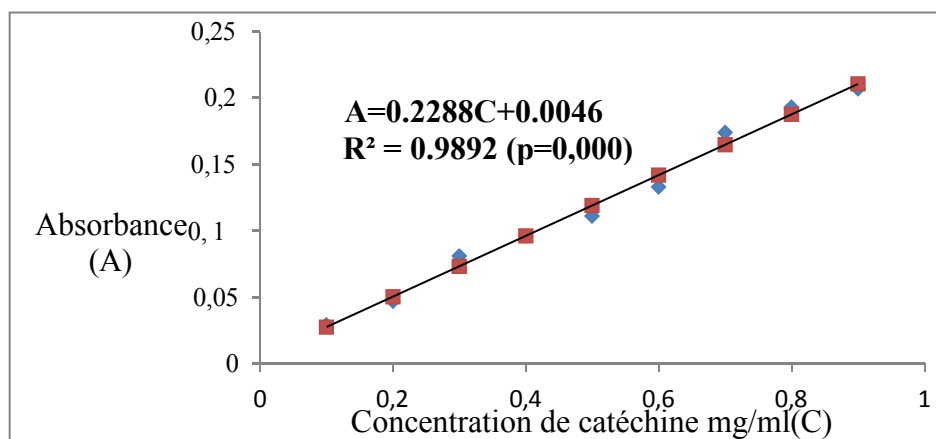


Figure 03 : courbe d'étalonnage de la catéchine.

4.5. Matrice d'expérience et modèles mathématiques : La formule générale du nombre (N) d'expériences pour un plan factoriel complet à deux niveaux est $N=2^k$ avec : k=nombre de facteur = 3 et donc $N= 2^3= 8$ expériences.

La construction de la matrice d'expériences (tableau II), exige l'utilisation de variables centrées réduites et sans dimension, désignées par « variables codées », à la place des « variables réelles ». Pour cela, on associe à chaque variable réelle X_i une variable codée x_i , qui prend le niveau (- 1) pour le niveau bas ou borne inférieure (X_{min}) et le niveau (+ 1) pour le niveau haut ou borne supérieure (X_{max}) et calculé par l'équation suivante ^[14] :

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$$

Sachant que X_i est le niveau haut ou niveau bas de facteur X, X_0 est valeur de X au centre de domaine ($= X_{min} + X_{max} / 2$) et ΔX est le pas de variation. Le domaine de l'étude est ainsi remplacé par le domaine (-1, +1) et les 8 expériences décrites par la matrice sont réalisées après randomisation (tableau II).

Le modèle mathématique associé à un plan factoriel complet à 2 niveaux qui régit la relation entre chaque réponse (Y1, Y2, Y3) et les trois facteurs (X1 X2 X3) est un polynôme du premier degré sous la forme : [14].

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$$

Sachant que : y : valeur estimée (ou prédite) de Y, a_0 : constante; a_1, a_2, a_3 : effets simple de chaque variable; a_{12}, a_{13}, a_{23} : effet d'interaction de deux variables ; a_{123} effet d'interaction des trois variables.

Tableau II : matrice des expériences du plan factoriel complet à 2^3 en unités codées avec rappel de leurs valeurs en unités réelles.

Ordre standard des essais	Ordre d'essai (randomisé)	Concentration du méthanol (x_1)	Ratio masse /solvant(x_2)	Durée d'extraction(x_3)
7	1	-1	+1	+1
6	2	+1	-1	+1
4	3	+1	+1	-1
1	4	-1	-1	-1
5	5	-1	-1	+1
3	6	-1	+1	-1
2	7	+1	-1	-1
8	8	+1	+1	+1
Niveau-1		30 %	0.05 (p/v)	120 min
Niveau+1		70 %	0.08 (p/v)	210 min

5. Evaluation de l'activité antioxydante :

5.1.Méthode de DPPH (2,2-DiPhényl 1-PicrylHydrazyle) :

Le test DPPH° permet de mesurer le pouvoir anti radicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle.

2,9 ml de la solution méthanolique de DPPH a été mélangé avec 100 µl de l'extrait, ce mélange a été agité et incubé en obscurité à 37 °C pendant 2 heures. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 517 nm contre un blanc, les résultats sont exprimés en mg/ml. Les résultats obtenus sont exprimés en concentration inhibitrice de 50 % (CI50) comparée à celle d'un standard (l'acide ascorbique) et calculée à partir de la courbe de pourcentage d'inhibition (%I) déterminé par la formule suivante [18,21] :

$$\%I = (DO_c - DO_e) / DO_c * 100$$

Sachant que : Doc : densité optique du contrôle et DOe : densité optique de l'extrait.

5.2. Méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) :

Le test FRAP permet de déterminer le pouvoir réducteur des composés. Il mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique en cations ferreux. C'est une méthode colorimétrique de transfert d'électrons permettant de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le complexe ferrique-tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ) incolore en cations ferreux tripyridyltriazine ([Fe(II) (TPTZ) ₂]²⁺ de couleur bleue, qui absorbe dans le spectre UV à 593 nm.

1ml de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M pH : 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆ à 1 %. Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont été centrifugés à 3 000 tours/minute pendant dix minutes. 2, 5 ml du surnageant a été mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 500 µl d'une solution de chlorure de fer à 0,1 % fraîchement préparée. La lecture des absorbances s'est faite contre un blanc à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique/g de drogue sèche [22].

6. Etude de la toxicité aigüe par voie orale :

6.1. Extrait végétal testé: 20g de drogue de la poudre des feuilles sèches pulvérisées et préalablement délipidées de *Pergularia tomentosa* L., sont soumises à une extraction par soxhlet dans des conditions optimales suivantes: une concentration du méthanol de 30 %, un ratio de 0,08(p/v) et une durée d'extraction de 120 min pour les tanins condensés et les polyphénols, et une concentration du méthanol de 30%, un ratio de 0,05(p/v) et une durée de 210 min pour les flavonoïdes. Le méthanol a été évaporé et la phase aqueuse a subi une lyophilisation (CHRITALPHA 2-4 LSC et MARTINCHRIST). Un extrait sec brunâtre a été obtenu et conservé au réfrigérateur à 4 ° c.

6.2. Animaux de laboratoire : Douze souris BALB \c, femelles, adultes, ayant un poids de 25-35 g ont été procurées à l'institut pasteur d'Alger. Elles ont été réparties dans deux cages pour une période d'acclimatation d'une semaine, pendant laquelle, elles ont eu un accès libre à la nourriture et à l'eau et maintenues à une température ambiante, à un éclairage naturel dont la période correspond au mois de mars.

6.3. Essais préliminaires :

Les souris tests se sont privées de la nourriture pour une durée de 4 heures au minimum avec un libre accès à l'eau. Après cette période de jeûne on a procédé à la mesure du poids de l'animal test afin de déterminer la quantité à lui administré selon son poids corporel.

Les doses seront augmentées progressivement en commençant d'une dose de 5 mg/kg, 50, 300 allant vers 2000 mg/kg voir plus.

L'animal est porté en observation les 30 premières minutes puis chaque heure pendant 4 heures.

6.4. Essais de toxicité réalisés, dose administrée et paramètres étudiés : Les extraits ont été solubilisés dans l'eau distillée et administrés par gavage par voie orale. Le test de toxicité orale aiguë a été effectué conformément aux directives de l'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE) pour les essais de produits chimiques numéro 423. Les souris ont été mises à jeun pendant 4 heures, avec un libre accès à l'eau pour que leur poids corporel soit déterminé et la quantité de l'extrait à lui administré soit calculée. Les données de la littérature ainsi que les résultats d'un test préliminaire effectué, ont montré la sécurité des doses de 5mg/kg-2000mg/kg de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L., de ce fait une dose de 5000 mg/kg a été prise pour l'étude de la toxicité aiguë^[23-25].

Les animaux ont été aléatoirement repartis en deux groupes, ont reçu soit l'extrait, soit l'eau distillée seule à raison de 5000mg/kg. Ils ont été surveillés pendant 30 min après l'administration, suivi d'une fois toutes les heures pendant 8 h et une fois par jour pendant les 14 jours suivants.

6.5. Mortalité, signes physiques, comportementaux et cliniques : la présence ou l'absence de décès, de signes d'une dégradation d'état de santé ou tout changement de comportement des souris a été réalisée chaque jour par le biais d'une grille permettant la notification des paramètres suivants: mouvements, Expression faciale, extrémités, peau/poils, sommeil, posture, toilettage, fréquence respiratoire, rythme cardiaque ,comportement, tremblements / convulsions, consommation nourriture /eau, claquement des dents /vocalisation, douleur, mortalité^[24-26].

6.6. Poids corporel, consommation d'aliments et d'eau : Le poids de chaque animal a été déterminé avant l'injection de l'extrait testé pour déterminer la dose de ce dernier. Ensuite les animaux ont été pesés une fois par semaine et à la fin du test pour déterminer et enregistrer variations du poids ^[27]. Les résultats ont été exprimés par pourcentage :

$$Pn/P0*100 (\%)$$

Po : représente le poids au jour 0 avant administration d'extrait.

Pn : le poids n jours après.

Les deux lots ont été alimentés par une masse de nourriture (26 g) et un volume d'eau (60ml) connu. Les quantités restantes ont été déterminées 24h après. La différence entre les quantités initiales et restantes a servi au calcul des quantités d'alimentation et d'eau consommées par jour/lot puis par semaine/lot.

6.7. Etude histologique : Une dissection a été réalisée pour extraire les organes suivants : poumon, cœur, foie, reins, intestin, rate, estomac. Ces derniers ont été pesés juste après la dissection car le poids humide doit être déterminé dès que possible afin d'éviter le dessèchement ^[24]. Une mesure du poids relatifs d'organes est effectuée selon la formule suivante :

$$PCR=PO/PC*100 (\%),$$

PCR : Poids Corporel Relatif, PO : Poids d'Organe, et PC : Poids Corporel.

7. Analyse statistique : L'analyse statistique de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques a été réalisée par le logiciel Minitab version 19. L'analyse de la variance (ANOVA) a servi à la validation des modèles obtenus ($y_1=f(x_1x_2x_3)$; $y_2=f(x_1x_2x_3)$; $y_3=f(x_1x_2x_3)$). Leur qualité a été vérifiée par le coefficient de détermination R^2 . Tandis que la signification des effets des facteurs a été déterminée par le test t-student. Les modèles et les coefficients sont considérés comme statistiquement significatifs pour des valeurs de $p<0,05$.

Les résultats quantitatives de l'étude de toxicité ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart type l'analyse statistique a été réalisée par le logiciel IBM-SPSS ver.22. Le test t-student a été utilisé pour comparer entre deux moyennes. Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs pour des valeurs de $p<0,05$.

II. Résultats :

1. Etude botanique :

Examinées à l'œil nu, les feuilles de *Pergularia tomentosa* L., ont été simples, entières, pétiolées, de forme orbiculaire ou ovale, à limbe cordées à la base, poilues, de couleur verte plus claire à la face inférieure. Cette dernière est parcourue par des nervures secondaires saillantes. Les feuilles sèches étaient friables et enroulées à saveur amère, piquante et d'odeur désagréable. L'examen microscopique de la coupe transversale des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., a permis d'observer: un limbe comportant -de la face supérieure à la face inférieure-un épiderme supérieur fortement cutinisé et peu stomatifère ,qui porte quelques poils tecteurs pluricellulaires, unisériés et plurisériés, à paroi épaisse à extrémité arrondie, une à deux assises de parenchyme palissadique bifacial, un parenchyme lacuneux, un épiderme inférieur peu cutinisé et très stomatifère portant de nombreux poils tecteurs ayant les mêmes caractéristiques que ceux portés par l'épiderme supérieur. La nervure centrale a été très saillante à la surface inférieure et comportant -de la surface supérieure à la surface inférieure-: un collenchyme angulaire sous épidermique, un parenchyme à méat, un faisceau libéro-ligneux en arc ouvert formé, d'un liber interne, du xylème primaire en mas, bois(xylème secondaire) en fils radiales, cambium, liber (phloème secondaire) en fil radial, et du phloème primaire en amas. Des cellules à latex ont été observées au niveau de parenchyme et du phloème. L'observation microscopique de la poudre des feuilles a permis de confirmer la présence des éléments observés dans la coupe transversale dont les poils tecteurs pluricellulaires, unisériés et plurisérié plus au moins fragmentés, débris d'épiderme avec stomate, débris de parenchyme et débris de vaisseaux de bois.

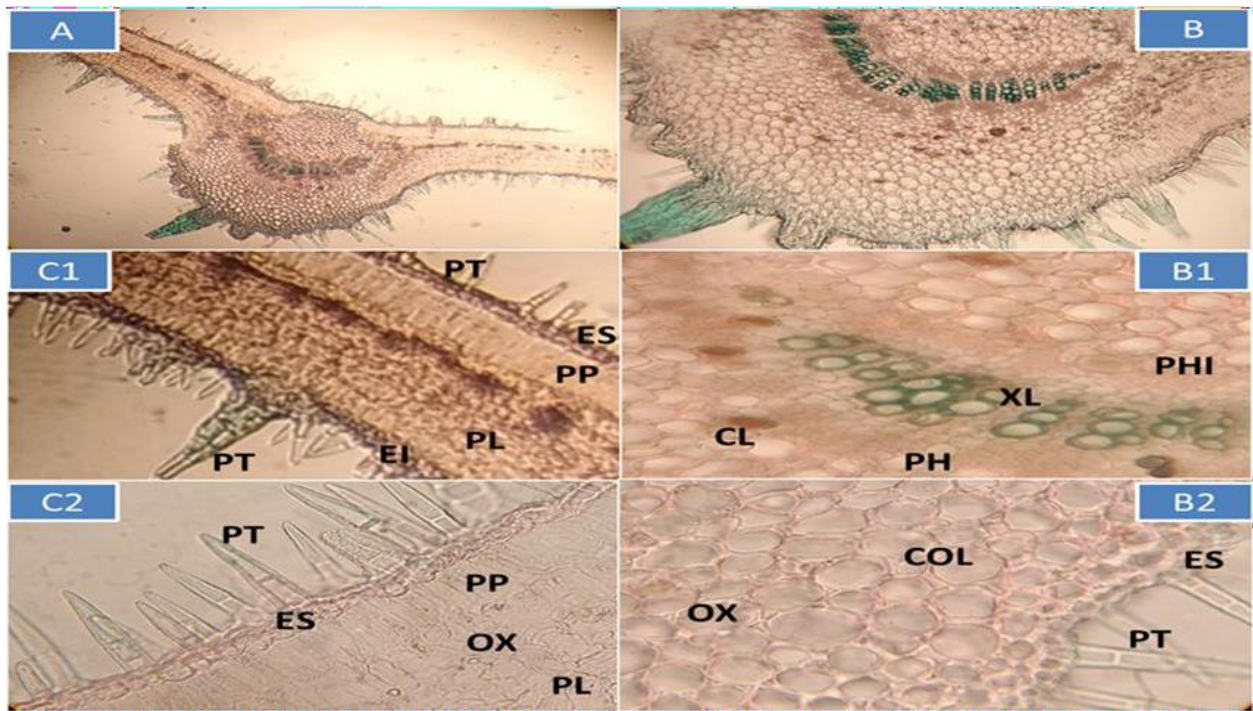


Figure 04 : la coupe transversale des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., observée sous microscope optique aux différents grossissements (Gx10 et Gx40), A : aspect général, B, B1, B2 : nervure centrale, C1, C2 : limbe, ES : épiderme supérieur, EI : épiderme inférieur, PP : parenchyme palissadique, PL : parenchyme lacuneux, PT : poil tecteur, COL: collenchyme, OX: oxalate de calcium, XL: xylème, CL: canaux à latex, PH: phloème, PHI : phloème interne.

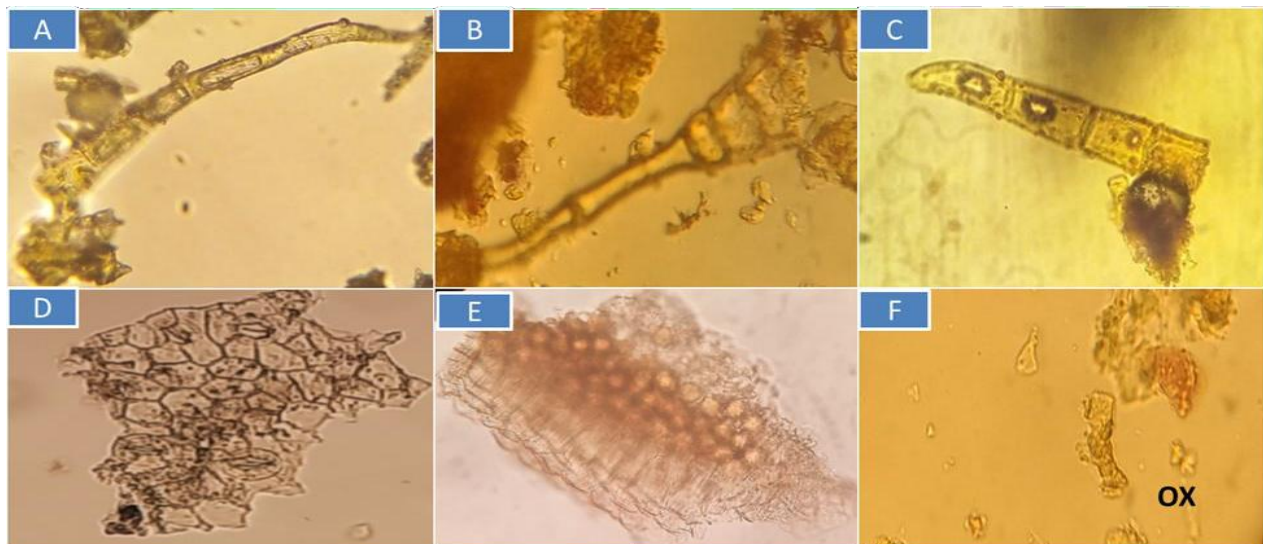


Figure 05 : éléments caractéristiques de la poudre des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., observés sous microscope optique aux différents grossissements (Gx10 et Gx40) : A, B et C : poil tecteur pluricellulaire, D : fragment d'épiderme avec stomates, E : débris de limbe avec du parenchyme palissadique et lacuneux, F : oxalate de calcium (OX).

2. Screening phytochimique : Les réactions chimiques et colorimétriques effectuées ont révélé la présence de : glucides, lipides, protéine, les hétérosides cardiotoniques, polyphénols, flavonoïdes, tanins et les alcaloïdes (Tableau III).

Tableau III : résultats du screening phytochimique des feuilles de *Pergularia tomentosa* L.

Réactions	Résultats observés
Recherche des glucides :	
Réaction de Fehling	+ (Précipité rouge brique)
Recherche des lipides :	
Réaction au soudanIII	+ (tache orange)
Recherche des protéines :	
Réaction de Biuret	-
Réaction de Ninhydrine	+ (Coloration bleue)
Recherche des hétérosides cardiotoniques :	
Réaction de Libermann	+ (Coloration rouge vert)
Réaction de Baljet	+ (Coloration jaune orangé)
Réaction de Kedde	+ (coloration rouge violacée)
Réaction de Raymond	+ (Coloration bleue violacée)
Réaction de Killer Killiani	+ (Formation d'un anneau rouge sur la surface des deux acides)
Recherche des hétérosides cyanogènes :	
Réaction de Guinard	-
Recherche des saponosides :	+ (Formation de mousse)
Recherche des polyphénols	
FeCl ₃	+
Recherche des flavonoïdes :	
Réaction avec KOH alcoolique	+ (Coloration jaune vif)
Réaction à la Cyanidine	+ (Coloration orange violacée)
TestALCL ₃	+ (Fluorescence jaune verdâtre)
Recherche des tanins :	
Gélatine salée	+ (Précipité vert)
Réaction de Stiasny	-
Réaction de Bath-Smith	+ (Précipité brun rougeâtre)
Recherche des anthocyanes :	-
Recherche des quinones :	
Réaction de Borntraeger	-
Recherche des alcaloïdes :	
Réactif de Mayer	+ (Coloration blanc jaunâtre)
Réactif de Drangendorf	+ (Coloration orange)
Réactif de Bouchardât	+ (Coloration rouge brunâtre)

+ : présence, - : absence

3. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par plan factoriel complet à deux niveaux :

Le tableau IV indique les réponses mesurées lors des 8 expériences effectuées en modifiant les valeurs des trois facteurs étudiés.

Tableau IV : les teneurs en polyphénols, en tanins condensés et en flavonoïdes de l'extrait de feuilles de *Pergularia tomentosa* L., obtenues par la variation des trois facteurs étudiés en utilisant 8 expérimentations randomisées suivant le plan factoriel complet a deux niveaux.

Ordre standard des essais	Ordre d'essai (randomisé)	Variables codées			Variables réelles			Réponses mesurées		
		Concentration du méthanol (x_1)	Ratio masse /solvant (x_2)	Durée d'extraction (x_3)	Concentration du méthanol (X_1)	Ratio masse /solvant (X_2)	Durée d'extraction (X_3)	Teneur en polyphénols (Y1) µg EAA/g DS	Teneur en flavonoïdes (Y2) µg ER/g DS	Teneur en tanins condensés (Y3) µg ECT/g DS
7	1	-1	+1	+1	30 %	0.08 (p/v)	210min	0,001	1,5365	60,900
6	2	+1	-1	+1	70 %	0.05 (p/v)	210min	2,480	5,3150	30,150
4	3	+1	+1	-1	70 %	0.08 (p/v)	120min	17,760	0,4915	58,950
1	4	-1	-1	-1	30 %	0.05 (p/v)	120min	10,069	21,9500	30,130
5	5	-1	-1	+1	30 %	0.05 (p/v)	210min	1,883	27,1500	36,705
3	6	-1	+1	-1	30 %	0.08 (p/v)	120min	18,150	1,2600	81,100
2	7	+1	-1	-1	70 %	0.05 (p/v)	120min	11,555	1,0900	13,900
8	8	+1	+1	+1	70 %	0.08 (p/v)	210min	1,150	0,0950	44,300

Les résultats de test d'analyse de la variance mentionnée dans le tableau V montrent que les modèles mathématiques décrivant la relation entre la teneur en flavonoïdes (Y2) et celle en tanins condensés (Y3) et les facteurs étudiés sont significatifs puisque la probabilité de p-value des modèles est inférieure à 0,05 avec 0.003 et 0.007 respectivement. Tandis que celle du modèle des polyphénols (Y1) est supérieure à 0,05 ce qui le rend non significatif.

La qualité de ces deux modèles était suffisante avec des coefficients de détermination $R^2 = 99,9\%$ et $99,5\%$ ce qui reflète une bonne compatibilité entre les valeurs de réponses mesurées et celles prédites par les modèles.

Le test de t-student a permis de déterminer la significativité des effets simples et des interactions entre deux facteurs et donc leur prise en compte dans les modèles mathématiques suivants :

Tableau V : Analyse statistique de la validité du modèle et des effets des coefficients qui relient les réponses aux facteurs.

	Valeur	p-value
Modèle Y1=f(X1, X2, X3) (R ² =98,6%)	/	0.081 ^{NS}
Constante	0.007881	0.025
Concentration du méthanol	0.000355	0.450
Ratio	0.001384	0.137
Durée	-0.006503	0.030
concentration du méthanol*ratio	-0.000165	0.682
concentration du méthanol*durée	0.000081	0.833
ratio*durée	-0.002187	0.088
Modèle Y2=f(X1, X2, X3) (R ² =99,9%)	/	0.007 ^S
Constant	0.007361	0.003 ^s
Concentration du méthanol	-0.005613	0.004 ^s
Ratio	-0.006515	0.004 ^s
Durée	0.001163	0.021 ^s
concentration du méthanol*ratio	0.005061	0.005 ^s
concentration du méthanol*durée	-0.000206	0.115 ^{NS}
ratio*durée	-0.001193	0.020 ^s
Modèle Y3=f(X1, X2, X3) (R ² =99,5%)	/	0.048 ^S
Constant	0.044517	0.007 ^s
Concentration du méthanol	-0.007692	0.043 ^s
Ratio	0.016796	0.020 ^s
Durée	-0.001503	0.210 ^{NS}
concentration du méthanol*ratio	-0.001996	0.161 ^{NS}
concentration du méthanol*durée	0.001903	0.168 ^{NS}
ratio*durée	-0.007209	0.045 ^s

Expression des teneurs en composés phénoliques sous forme de modèles mathématiques :

Teneur en flavonoïdes (Y2) = 0.007361 - 0.005613 concentration du méthanol - 0.006515 ratio (masse/solvant) + 0.001163 durée d'extraction + 0.005061 concentration du méthanol*ratio (masse/solvant) - 0.001193 ratio (masse/solvant)*durée d'extraction.

Teneur en tanins condensés (Y3) = 0.044517 - 0.007692 concentration du méthanol + 0.016796 ratio (masse/solvant) - 0.007209 ratio (masse/solvant)*durée d'extraction

Les courbes d'isoreponses (figure6) réalisées avec les facteurs significatifs ont permis d'illustrer de leurs interactions sur la teneur en flavonoïdes et en tanins condensés.

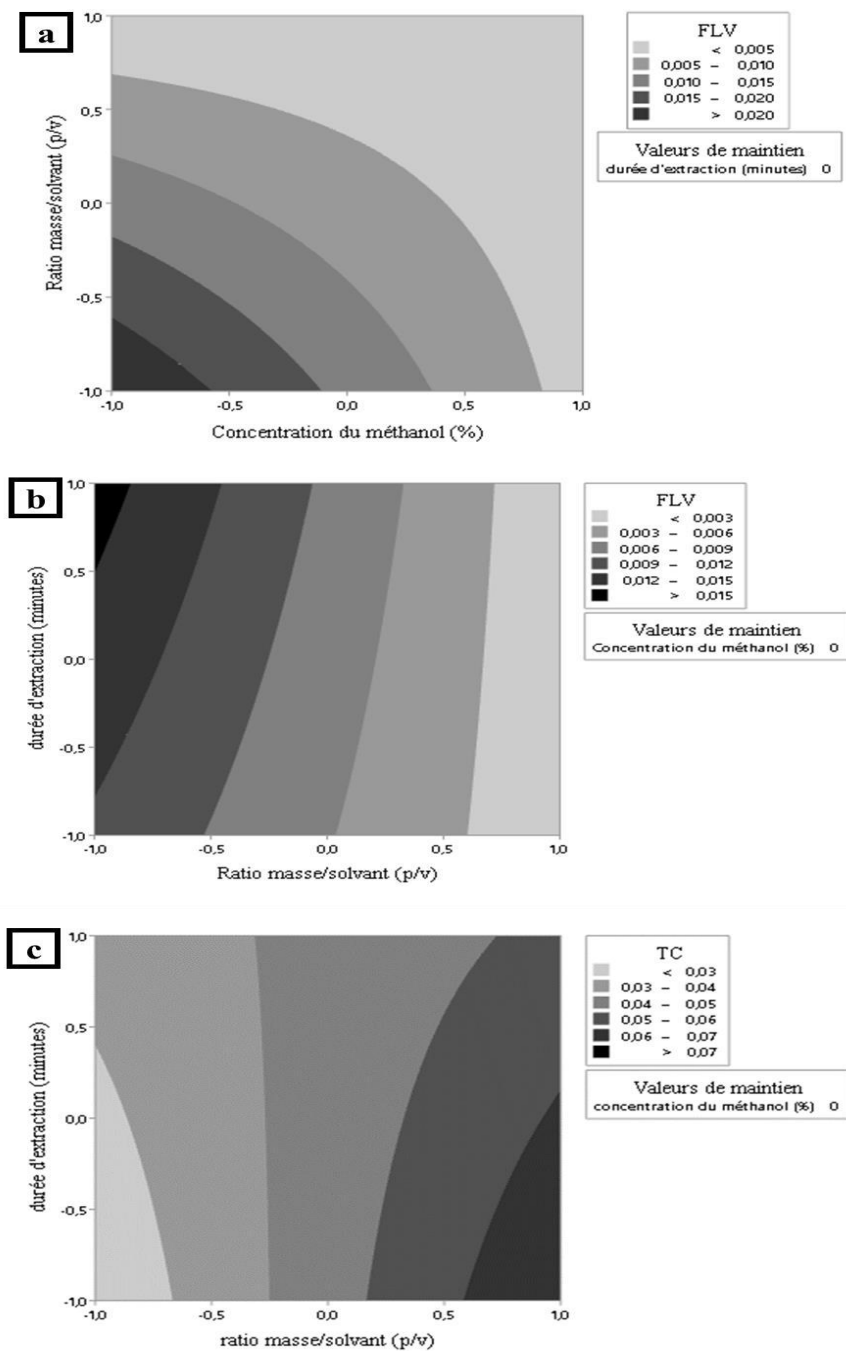


Figure 06 : les courbes d'iso-réponses démontrant l'effet des interactions significatives sur la teneur en flavonoïdes (a, b) et en tanins condensés (c).

La détermination des conditions optimales permettant d'obtenir une teneur maximale en flavonoïdes et en tanins condensés a été réalisée d'abord par une approche numérique validée par le test de désirabilité (Tableau VI) -plus ce dernier est proche de 1 plus les valeurs prises par les trois facteurs sont susceptibles pour donner la réponse désirée- suivi d'une approche graphique via les courbes d'iso réponses (figure6) qui ont permis de mieux illustrer l'effet des interactions entre les facteurs significatifs sur la teneur maximale en flavonoïdes et en tanins.

Tableau VI : les conditions et rendements optimaux obtenus pour une teneur maximale en flavonoïdes et en tanins condensés selon les facteurs variés par le plan factoriel complet a deux niveaux (2³).

Variables codées			Variables réelles			Teneur maximale possible en flavonoïde (µg/g)	Teneur maximal possible en tanins condensés (µg/g)	Désirabilité
Concentration du méthanol (x ₁)	Ratio masse /solvant (x ₂)	Durée d'extraction (x ₃)	Concentration du méthanol (X ₁)	Ratio masse /solvant (X ₂)	Durée d'extraction (X ₃)			
-1	-1	1	30 %	0.05 (p/v)	210 min	27,1122	/	0,998605
-1	1	-1	30 %	0.08 (p/v)	120 min	/	81,6156	1,00000

4. Activité antioxydante : L'extrait obtenu dans des conditions optimales pour sa teneur en tanins condensés a révélé une forte activité du piégeage des radicaux libres de DPPH à la fois supérieure à l'acide ascorbique et à l'extrait de flavonoïdes, et ce avec une valeur d'CI50 de l'ordre de 0.006 mg EAA/ml contre 0,0861 mg EAA/ml et 0,1608 mg EAA/ml respectivement. Contrairement à l'extrait flavonoïque qui a montré un pouvoir réducteur du fer supérieur à celui des tanins condensés avec 206,60 ±10,9971mgEAA/g drogue sèche et 4,84 ±0,8718mgEAA/g de drogue sèche respectivement.

Tableau VII : Evaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes FRAP et DPPH.

	ExtF	ExtTC	VitC
Activité antioxydante par méthode de DPPH ^a	0,1608 mgEAA/ml	0,0061 mgEAA/ml	0,0816 mgEAA/ml
Activité antioxydante par méthode de FRAP ^b	206,60 ± 10,9971 mgEAA/g Drogue sèche	4,84 ± 0,8718 mgEAA/g drogue sèche	/

^a: exprimée en Concentration inhibitrice 50 (CI50), ^b: exprimée en mg Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/ml, ExtF: extrait obtenu dans des conditions optimales pour une teneur maximale en flavonoïdes, ExtTC : extrait obtenu dans des conditions optimales pour une teneur maximale en tanins condensés, VitC : standard vitamine C.

5. Toxicité :

5.1. Mortalité, signes physiques, comportementaux et cliniques : aucune mortalité n'a été enregistré dans les deux groupes de souris femelles BALB/c testé avec la dose de 5000mg/kg de l'extrait de feuilles de *Pergularia tomentosa* L., comparativement au un groupe témoin. Cependant certains symptômes de la toxicité aiguë ont été observés dans le groupe testé, il s'agit d'une diminution de mouvements et d'une fermeture totale des yeux dans les 30 min suivant l'administration de l'extrait testé et des tremblements, isolement, posture allongées, et orientation des oreilles vers l'arrière dans les 4 heures suivantes. Cependant aucun symptôme décrit précédemment n'a été observé pour le groupe témoin.

5.2. Poids corporel, consommation d'aliments et d'eau :

Tableau VIII : la variation de poids corporels, consommation d'eau et d'aliment pour les deux groupes témoin et test.

	Semaine1		p-value	Semaine2		p-value
	Lot control	Extrait		Control	Extrait	
Poids corporel	27±1,414	27,25±0,957	0,168	28,5±1,915	29,25±0,5	0,144
Consommation d'eau	36,714±3,187	32,857±3,078	0,047	39,286±3,638	37,25±2,360	0,275
Consommation d'aliment	24,571±2,573	23,857±3,532	0,887	26±0	26±0	1

Tableau IX : La variation du poids des organes pour les deux groupes témoin et test.

Poids des organes	Control	Extrait	p-value
Estomac	0,019 ± 0,003	0,017± 0,002	0,248
Cœur	0,005± 0,0006	0,005± 0,023	0,237
Foie	0,0585± 0,006	0,048± 0,001	0,021
Rate	0,0044± 0,0003	0,004± 0,0005	0,083
Intestin	0,1437± 0,028	0,126± 0,015	0,564
Poumon	0,0082± 0,0004	0,009± 0,001	1
Rein	0,0124± 0,0006	0,012± 0,0007	0,08

Le suivi de poids corporel ainsi que de la consommation d'eau et d'aliment pendant les deux semaines d'essai de toxicité (tableau VIII) n'a montré aucune variation significative du poids corporel et de la consommation d'aliments entre les deux groupes test et témoin. Contrairement à la variation de la consommation d'eau qui a été plutôt significative entre les deux groupes pendant la première semaine ($p=0,047$).

Les résultats du tableau IX indiquent que le poids des organes suivants : estomac, cœur, rate, intestin, poumon et rein, n'était pas significatif chez les deux groupes sauf pour le foie ($p\text{-value}=0,021$).

Discussion :

Cette étude a porté sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., Asclépiadacée par réalisation de l'étude botanique, du criblage phytochimique ainsi que l'étude de l'activité antioxydante in vitro et la toxicité aigüe par voie oral sur des souris BALB \c. L'examen botanique macroscopique des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., a montré qu'elles sont pubescentes, pétiolées, ovales, cordiformes, présentant une odeur désagréable et une saveur amère piquante. Ce qui concorde aux données de la littérature [3,27]. Quant aux résultats d'observation microscopique de la coupe transversale et de la poudre ont révélé la présence des poils tecteurs ce qui reflète l'aspect pubescent des feuilles, d'un liber interne, des oxalate de calcium et des cellules à latex, ainsi l'ensemble constituent des caractéristiques anatomohistologiques connus de la famille des Asclépiadacée [28]. Cependant, il important de signaler l'absence d'études portant sur l'examen botanique microscopique des feuilles *Pergularia tomentosa* L. Concernant le criblage phytochimique, nos résultats ont montré la présence de glucides, lipides, protéines, des hétérosides cardiotoniques, polyphénols, flavonoïdes, tanins et des alcaloïdes, ce qui rejoint ceux obtenus avec la même espèce récoltée en Tunisie [9]. Cependant, la présence des quinones ca été rapportée dans une étude nigérienne [29]. ce qui pourrait s'expliquer par leur faible teneur et leur instabilité. La richesse

De *Pergularia tomentosa* L., en nombreux métabolites secondaires pourrait justifier ses usages en médecine traditionnelle.

L'étude de l'optimisation par plan factoriel complet à 2 niveaux a révélé que la teneur en flavonoïdes et en tanins condensés des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., dépendent des trois facteurs étudiés : la concentration du méthanol, le ratio masse /solvant et la durée d'extraction.

Une teneur maximale en tanins condensés de l'ordre de 81,100 µg ECT/g MS, a été obtenue dans les conditions optimales suivantes : une concentration du méthanol de 30 %, un ratio masse/solvant qui est de 0.08 (p/v), et une durée d'extraction de 120min.

Tandis qu'un rendement maximal en flavonoïdes d'ordre de 27,150 µg ER/g MS a été obtenu à une concentration du méthanol de 30 %, un ratio masse /solvant de 0.05 (p/v), et une durée d'extraction de 210min.

Dans les deux cas une concentration faible en méthanol était nécessaire pour obtenir un maximum en composés phénoliques ce qui pourrait être expliqués par la polarité élevée de ces substances qui facilite leur solubilité dans un mélange hydro-méthanolique à 30%. Plusieurs auteurs ont révélé que les mélanges alcool-eau sont très efficaces à extraire les composés phénoliques^[30]. Quant à la durée d'extraction pendant laquelle le solvant et la drogue sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela influence l'efficacité de l'extraction. Cependant, un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques. En fin pour le ratio (masse/solvant), la meilleure extraction est obtenue quand le solvant pénètre dans la matière sèche pour accéder aux solutés. Le volume de solvant doit être suffisant pour bien hydrater la phase solide, tout en permettant un transfert plus facile du soluté vers le solvant. Le volume du solvant doit être aussi suffisant afin d'éviter la saturation en soluté et permettre une bonne diffusion des solutés dans la phase liquide^[12,31].

La teneur maximale en tanins condensée obtenu dans notre étude a été inférieur à celle estimée par une étude phytochimique de l'extrait des tanins obtenus à partir des feuilles de la même plante récoltée à Méguibra (wilaya d'Eloued) qui a été de 86,180 µg ECT/ g MS versus 81,100 µg ECT/g de MS a été obtenu dans notre étude), Cependant, notre résultat des flavonoïdes était élevée par rapport à celui de l'étude citée précédemment, avec un taux de 27, 150 µg ER/ g MS et 21,377 µg EQ /g de MS respectivement ce qui pourrait être due aux différences de la méthode d'extraction et du solvant utilisé. En effet, cette étude a procédé à

Une macération des feuilles en utilisant l'éthanol comme solvant ^[32], aussi l'origine de la plante, l'organe utilisé, les conditions de récoltes et de conservations peuvent affecter le rendement d'extraction en composés phénoliques.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'extrait optimisé en tanins condensés présente un pouvoir de piégeage des radicaux libres plus fort avec une CI50 de 0,0061mg/ml par rapport à celui obtenu dans des conditions optimisées en flavonoïdes ainsi qu'aux résultats de deux études portées sur des extraits éthanoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., avec des CI50 de l'ordre de 0,1608 mg/ml, 51.555 mg/ml et 9,810 mg/ml^[32].

Cependant, l'activité réductrice du fer de l'extrait obtenu dans des conditions optimisées en flavonoïdes (206,60 mg EAA/g) était beaucoup plus forte qu'à ceux d'une autre étude portée sur le pouvoir réducteur des différents extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* L., qui a montré que l'extrait butanolique était le plus actif (96,990mg EAA/g), suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (92,910mgEAA/g) puis éthanolique (59,210mgEAA/g) ^[33]. Ces derniers avaient tous une valeur à la fois supérieure à celle obtenue dans notre l'extrait optimisé en tanins condensés (4,84 mg EAA/g).

L'étude de toxicité aiguë par voie orale de l'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., sur des souris BALB/c n'a pas révélé une mortalité à 5000mg/kg dans les deux groupes (témoin et test). Cependant, une étude Algérienne menée par KABOUCHE.F et SOUDANI.M, sur la même espèce poussant au Biskra, a enregistré une mortalité de souris mâles Swiss Albinos avec le groupe test pour une dose de 2000mg/kg. De plus, cette étude a notifié les symptômes suivants : le sommeil, la tachypnée, l'anoxie et la déshydratation légère, pour une dose de 2000mg/kg, avec tremblement pour une dose de 5000mg/kg. Pendant les premiers huit jours. Contrairement à nos résultats qui ont signalé des symptômes de toxicité pendant les premières 30 minutes et les 4 h suivant l'administration de l'extrait. Il s'agit d'une diminution de mouvements, tremblements, isolements, posture allongées.

Encore, une baisse significative de la consommation d'eau durant la première semaine de l'essai de toxicité a été mesurée chez notre groupe recevant l'extrait comparativement au groupe témoin. Cependant aucune différence n'a été observée en termes de consommation d'aliment. Tandis que l'étude de KABOUCHE.F et SOUDANI.M a enregistré une croissance différentielle dans la masse moyenne pour le groupe des souris test et qui ont reçu une dose de 2000mg/kg et 5000mg/kg ^[34].

La différence du poids des organes étudiées entre les deux lots était non significative (estomac, cœur, rate, intestin, rein et poumon) sauf pour le foie ($p=0.02$), son poids a été

Significativement diminué de $0,058 \pm 0,006$ dans le lot témoin au $0,048 \pm 0,001$ dans le lot extrait. La mesure du poids relatif des organes et le comparer aux groupe témoin peut révéler certaines affections dues à l'extrait testé, d'ailleurs l'augmentation ou la diminution du poids de ce dernier peut orienter vers une quelconque atteinte. De ce fait la diminution du poids de foie suggère un effet toxique de notre extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., sur cet organe. Il peut signifier une atrophie par une diminution de la multiplication et/ou de la différenciation cellulaires [24,35].

Conclusion :

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. Par la méthodologie du plan factoriel complet a deux niveaux a démontré l'influence de la concentration du méthanol, la durée d'extraction et le ratio masse/solvant sur la teneur en tanins condensés et en flavonoïdes.

Une teneur maximale de 81,100 µg ECT/g MS en tanins condensés était obtenu avec une concentration du méthanol de 30 %, un ratio masse/solvant qui est de 0.08 (p/v), et une durée d'extraction de 120min. versus une teneur de 27,150 µg ER/g MS En flavonoïdes a été déterminée dans les conditions optimales suivantes : une concentration du méthanol de 30 %, un ratio masse /solvant de 0.05 (p/v), et une durée d'extraction de 210min.

L'activité antioxydante des extraits préparés dans ces conditions optimales précédentes a indiqué un bon pouvoir de piégeage des radicaux DPPH ainsi qu'un bon pouvoir réducteur de fer. Ceci montre que cette plante peut constituer une bonne source d'antioxydants naturels d'où l'intérêt d'être valorisée dans le domaine agro-alimentaire et cosmétique comme conservateur.

L'étude de toxicité aiguë par voie orale de l'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., sur des souris balb/c albinos n'a pas révélé une mortalité à 5000mg/kg. Cependant des signes de toxicité ont été observés. Il s'agit d'une diminution de mouvements et d'une fermeture totale de yeux pendant les 30 premières minutes ainsi que des tremblements , isolement , posture allongées, et orientation des oreilles vers l' arrière dans les 4 premières heures.

Vers la fin de l'essai, on a déduit que la consommation d'eau entre les deux lots était différente ou on a constaté que le lot témoin en a consommé plus. Une diminution du poids de foie chez le lot test est également établie par rapport au témoin.

En terme de perspective et dans le but de complétez ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- D'étudier l'effet des autres facteurs en vue de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et en utilisant d'autres modèles des plans d'expériences.
- Etudier l'influence d'autres facteurs sur l'activité antioxydante.
- Evaluer l'activité antioxydante in vivo.
- Elargir les études de toxicité en allant vers la subaiguë et chronique et sur d'autres rongeurs.

Bibliographie

1. Abbassi L, Touil H. Contribution à l'étude phytochimique de feuilles de *Pergularia tomentosa* L., dans la région d'El-Oued [mémoire]. El-Oued : Université Echahid Hamma Lakhdar ; 2019.
2. Chema A et Djebar MR. Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie. 2008 ; 17 : 36-5.
3. Baaissa S, Guettiani FZ. Contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante in vivo de différents extraits de la plante médicinale *Pergularia tomentosa* L. [mémoire]. Biskra : Université Mohammed Khider ; 2020.
4. Tlili ML. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional) [thèse]. Ouargla : Université Kasdi Merbah ; 2015.
5. Belloum N, Nani N. Contribution à l'étude phytochimique de racine de *Pergularia tomentosa* L. dans la région d'El-Oued [mémoire]. El-Oued : Université Echahid Hamma Lakhdar ; 2020.
6. Bellaghouti A, Mrini F. Réponse adaptative de *Pergularia tomentosa* L de différents écotypes dans la région de Ghardaïa. Adaptive response of *Pergularia tomentosa* of different ecotypes in the region of Ghardaïa [mémoire]. Ghardaia: Université de Ghardaia; 2017.
7. Bouchareb O. Etude phytochimique et activités biologiques De *Matricaria pubescens* [mémoire]. Msila : Universsité Mohamed Boudiaf ; 2013.
8. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction de composés phénoliques : une revue. Recherche actuelle en science alimentaire. 2021 ; 4 : 200-214.

9. Lahmar I, Belghith H, Ben Abdallah F. Composition nutritionnelle et activités phytochimiques, antioxydantes et antifongiques de *Pergularia tomentosa* L. *BioMed Res Int.* 2017 ; 2017 : 1-9.
10. Bouchouka E. Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes [thèse]. Annaba : Université Badji Mokhtar ; 2016.
11. Ait Ammar S, Amrani D, Ounnoughi K. Optimisation d'une méthode d'extraction des composés phénoliques dans les différents organes de figuier de barbarie : *Opuntia ficus indica* (L) [mémoire]. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri ; 2022.
12. Abbar M, Tacherfiout M, Barache F. Optimisation de l'extraction des flavonoïdes de *Rhamnus alaternus* en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse, model Box-Behnken et étude de l'activité anti-oxydante [thèse]. Bejaia : Université Abderrahmane Mira ; 2017.
13. Karam S. Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt [thèse]. France : LIMOGES ; 2004.
14. Goupy J. Les plans d'expériences. 3 ème édition. France : Dunod ; 2006.
15. Belbachir AF. Contribution à l'étude phyto-écologique et anatomique des deux espèces médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Juniperus oxycedrus*) Dans les matorrals de Sidi Djilali (Réponses aux perturbations) [mémoire]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid ; 2017.
16. Harborne, JB Méthodes d'analyse des plantes. Dans : Méthodes phytochimiques : un guide des techniques modernes d'analyse des plantes. Dordrecht : Springer Pays-Bas, 1984. p. 1-36.
17. Kamath SD, Arunkumar D, G. Avinash N, Samshuddin S. Détermination de la teneur phénolique totale et de l'activité antioxydante totale dans les aliments consommés localement à Moodbidri, Karnataka, Inde. *Avancées de la recherche en sciences appliquées.* 2015 ; 6(6) : 99-2.
18. Ben Moussa MT, Cherif RA, Lekhal S, Bounab A, Hadeif Y. Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Brochia cinerea* VIS de l'Algérie (Sud-Est). *Algerian journal of pharmacy.* 2022 ; 4 (1) : 49-9.

19. Mistrello J, Sirisena SD, Ghavami A, Marshall RJ, Krishnamoorthy S. Determination of the antioxidant capacity, total phenolic and flavonoid contents of seeds from three commercial varieties of culinary dates. *IJFS*. 2014 ; 3 (1) : 34-4.
20. Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*. 2013 ; (9) : 35-0.
21. Laraba M, Serrat A, Ouassaa G. Etude in vitro de l'activité antioxydante des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale [mémoire]. Constantine : Université des Frères Mentouri ; 2016.
22. Bentabet N, Boucherit OZ, Boucherit K. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*. 2014 ; 12 (6) :364-1.
23. Halim SZ, Abdullah NR, Afzan A, Abdul Rashid BA, Jantan I, Ismail Z. Étude de toxicité aiguë de l'extrait de feuille de papaye *Carica* chez des rats Sprague Dawley. *JMPR*. 2011 ; 5 (10) : 1867-72.
24. Hedhoud Z, Madoui I. *Etude de la toxicité subaiguë de l'extrait de l'Ephedra alata alenda chez les souris femelles BALB/c* [mémoire]. Bordj Bou Arréridj : Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi ; 2022.
25. OCDE. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë. N° 423, 2001.

26. Galtier P, Moré J, Bodin G, Brunel-Dubech N, Alvinerie M. Toxines d'*Aspergillus ochraceus* wilhelm. III. -toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adultes. In : Annales de Recherches Vétérinaires. 1974 : 233-7.
27. Defflers A. Les Asclépiadées de l'Arabie tropicale. Egypt : LE CAIRE ; 1896.
28. Gayral P, Vindt J. Anatomie des végétaux vasculaires. France : G. Doin & Cie ; 1961.
29. Shinkafi SA. Analyse phytochimique et études chromatographiques de *Pergularia tomentosa* L. et *Mitracarpus scaber* Zucc. Journal international de recherche en microbiologie. 2014 ; 4 (5) : 550-9.
30. Bourgou S, Serairi Beji R, Medini F, Ksouri R. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. Journal of New Sciences. 2016 ; 28.
31. Adjal S, Choudani F. Optimisation d'extraction des polyphénols des grains de *Pinus halepensis* Mill Par des méthodes conventionnelles et non conventionnelles [mémoire]. Bouira : Université Akli Mohand Oulhadj ; 2017.
32. Dadda M, Ghrab N, Hammouya O. Etude phytochimique de l'extrait des tanins à partir de *Pergularia tomentosa* L. issue de région d'El-Oued [mémoire]. El-Oued : Université Echahid Hamma Lakhdar ; 2022.
33. Tlili ML, Hammoudi R, Dehak K. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* issue d'El Oued (Algerie). Revue des bios ressources. 2020 ; 10 (2) : 1-11.
34. Kabouche F, Soudani M. Contribution à l'étude de la toxicité aiguë de différents extraits de *Ruta tuberculata* et *Pergularia tomentosa* in vivo [mémoire]. Biskra : Université Mohamed Khider ; 2019.
35. Vandjiguiba D, Francis A, Yolande AA. Evaluation de la toxicité du sulfate de cadmium sur le poids moyen des organes internes chez les rats wistar. 2019 ; 1-18.

