République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico – Chimique
Filière : Sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée

Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Activité anti-hémolytique *in vitro* des extraits de *Tamus sp*

Présenté par :
Melle DEFLAOUI Kenza et Melle OUAMARA Kenza

Soutenu : **26 / 06 / 2018**

Devant le jury composé de :

Mme BOUDRIA A.	MCB	Présidente
Mme KHETTAL B.	Professeur	Encadreure
Mme KADJI H.	MCA	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Le travail réalisé dans le cadre d'un projet de recherche sur la valorisation des principes bioactifs d'une plante du genre *Tamus* de la région de la Kabylie de l'équipe de recherche de laboratoire de biotechnologie végétale et éthnobotanique de la FSNV de l'université de Bejaia

On tient à témoigner toute notre reconnaissance à notre promotrice Professeure KHETTAL Bachra qui a proposé le thème et qui nous a fait l'honneur d'encadrer notre travail, pour ses encouragements, ses conseils judicieux, sans oublier notre co-promotrice Mme MEZAHEM Tassaadit doctorante à la FSNV.

Nous sommes très honorées par la présence de Mme KADJI et Mme BOUDRIA dans notre jury.

On tient aussi à remercier l'ingénieure du laboratoire d'enzymologie (FSNV) Mme MAMASSE Habiba et Samia ingénieure du laboratoire de biologie végétale et éthnobotanique.

On ne saurait terminer sans remercier tout le personnel du laboratoire d'analyses médicales de CHU du Bejaia d'avoir fourni le sang sur lequel on a travaillé.

Dédicaces

A l'aide de dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents

A mes chers frères et sœurs

(Khellaf et sa femme Enora, Faiza et son mari Taleb,

Nabil, Sabrina et Yasmina)

A ma nièce Meriem et mes neveux Yanis et Maël

A toute ma famille et tous ceux que j'aime

(Nora, Tama, Nouria, Abdellah)

A mon âme Fouad

O.Kenza

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon
Profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

A Mes sœurs et mon frère Sakina, Zineb, Chahinez et Mehdi, aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

A la famille Bendjeddou Ahmed, khalida, Zinou, Ritedj, Tadjo et Abd.arazak

A tous mes amis Koko, Nadjet, Nabila, Sara, Mellissa, Massissilia, Ryma, Balaid et surtout Wahid

A ma grande famille Deflaoui, A mes chers cousins et cousines.

A Toute la promotion 2018 Biochimie Appliquée Sans exception.

Kenza.D

Liste des abréviations

AGPI : Acide gras polyinsaturé

ANOVA : Analysis Of Varience

AS : Acide Salicylique

ATP ase : Adénosine Tri Phosphate

EqAG : Equivalent d'Acide Gallique

EqQ : Equivalent de Quercétine

G6PD : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase

GR : Globule Rouge

Hb : Hémoglobine

H_2O_2 : Le peroxyde d'hydrogène

IC50 : concentration inhibitrice à 50% d'hémolyse

LDH : Lactate déshydrogénase

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

OH^- : Le radical hydroxyle

PBS : Phosphate Buffer Salin (tampon phosphate)

Liste des figures et tableaux

Figure 01 : Echanges de la membrane érythrocytaire.....03

Figure 02 : Différentes espèces de *Tamus sp*……..10

Figure 03 : Localisation géographique de station de la récolte de la plante étudiée…….. 13

Figure 04 : Rendements des extraits bruts des différentes parties de la plante étudiée……...19

Figure 05 : Teneurs en polyphénols des extraits bruts des différentes parties de *Tamus sp*...20

Figure 06 : Teneurs en flavonoïdes des extraits bruts des différentes parties de *Tamus sp*…22

Figure 07 : Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations d'AS……...……..23

Figure 08 : Effet des différentes concentrations des extraits de la plante sur l'hémolyse induite par l'AS…….....24

Figure 09 : Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations de Na Cl……..….25

Figure 10 : Effet anti-hémolytique des différentes parties de la plante sur l'hémolyse hypotonique……..……26

Figure 11 : Effet de différentes concentrations de Triton X100 sur l'hémolyse des globules rouges……...…….…27

Figure 12 : Taux d'inhibition d'hémolyse induite par le Triton X100 en présence de différentes concentrations des extraits de *Tamus sp*……...…….…….28

Figure 13 : Effet des différentes parties de *Tamus sp* sur l'hémolyse induite par H_2O_2…..…30

Tableau I : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique……...08

Tableau II : Taux d'hémolyse induite par différentes dilutions de H_2O_2.....29

SOMMAIRE

Introduction 1

I. synthèse bibliographique

I.Généralités 2

I.1. structure, fonction et biosynthèse du globule Rouge 2

I.1.1. Structure et fonction du globule rouge 2

I.1.2. Structure de la membrane érythrocytaire..... 2

I.1.3. Echanges membranaires du globule Rouge 3

I.1.4. Biosynthèse du globule rouge..... 4

I.2. Processus d'hémolyse et les anti- hémolytiques 4

I.2.1. Destruction des hématies ou hémolyse physiologique 4

I.2.2.1. Anémies hémolytiques corpusculaires 5

I.2.2.2. Anémies hémolytiques non corpusculaire 6

I.2.2.3. Anémies résultante d'une carence nutritionnelle 6

I.2.3. Anti-hémolytiques 6

I.3. *Tamus sp* 8

II.Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal……13

II.2.Extraction et dosage des composés phénoliques 13

II.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique..... 15

II.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire……...15

II.3.2. Mise au point des tests de l'hémolyse induite *in vitro* ……..15

II.3.3. Mesure de l'effet anti-hémolytique des extraits de *Tamus sp*……..17

II.4. Traitement statistique desrésultats…...……..……18

III. Résultats et Discussions

III .1. Taux d'extraction des extraits bruts…..…...……...……19

III.2. Teneurs en polyphénols et flavonoïde……20

III.2.1 Teneurs en polyphénols totaux……..…20

III.2.2. Teneurs en flavonoïdes……21

III.3. Activités anti-hémolytiques des extraits de *Tamus sp*……23

III.3.1. Activité anti-hémolyse induite par l'AS……..…….23

III.3.2. Activité anti-hémolyse hypotonique (par le Na Cl)……..25

III.3.3. Activité anti-hémolyse induite par le détergent Triton x100……...…….27

III.3.4. Activité anti-hémolyse induite par le radical H_2O_2……...……29

Conclusion……..32

Référeces bibiographiques……33

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales constituent une alternative idéale aux médicaments chimiques ayant des effets secondaires trop importants et qui sont trop chers à fabriquer pour les pays en voie de développement **(Bnouham et *al*., 2006)**. Certaines espèces possèdent des propriétés pharmacologiques qui leur confèrent un intérêt médicinal. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreuses composés appelés métabolites secondaires et constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique possédant un large éventail d'activités biologiques, c'est le cas par exemple des polyphénols qui sont largement utilisés en thérapie comme antioxydants et/ou anti-hémolytiques **(Haddouchi et *al*., 2006).**

L'anémie hémolytique demeure un problème majeur de la santé publique durant ces dernières décennies à travers le monde, malgré l'amélioration remarquable des conditions de vie, elle est classée selon l'OMS comme l'un des problèmes les plus sérieux au monde, pour combattre cette anémie qui est due à une hyper-hémolyse le plus souvent liée à un stress oxydatif, la recherche des plantes médicinales ayant des antioxydants naturels reste l'une des meilleures investigations. **(Zinebi et *al*., 2017)**.

Dans cet axe de recherche globale sur les plantes médicinales douées de propriétés thérapeutiques s'insère l'objectif de notre travail dont le but est l'évaluation du pouvoir anti-hémolytique d'une plante du genre *Tamus* récoltée dans la région de Bejaia (Tazmalt).

Notre étude expérimentale comporte :

1- Evaluation, *in vitro,* de l'effet inducteur de l'hémolyse des cellules érythrocytaires humaines par différents agents :
   a. Induction par l'acide salicylique
   b. Induction hypotonique au Na Cl
   c. Induction par un détergent, le Triton x100
   d. Induction par une espèce réactive oxygénée « ROS » l'H_2O_2

2- Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits organiques des différentes parties (racine, tige, feuille, fruit et graine) d'une plante appartenant au genre *Tamus*.

Synthèse Bibliographique

I. Généralités

I.1.Structure, fonction et biosynthèse du globule Rouge

Le sang est un liquide vital visqueux et fluide de pH compris entre 7.35 et 7.45, qui coule dans les artères et les veines, pèse 8% du poids corporel humain et son volume varie de 5 à 6L chez l'homme et de 4 à 5L chez la femme. Il est composé de cellules représentants les éléments figurés du sang en suspension dans une matrice extracellulaire liquide, le plasma. Ce dernier représente 55% du volume sanguin. Les cellules sanguines occupent 45% du volume sanguin total chez l'adulte. On peut distinguer 3 catégories de cellules variant par leur morphologie et leur fonction ; les thrombocytes (plaquettes), les leucocytes (globules blancs) et les érythrocytes (les globules rouges) **(Béraud, 2014).**

I.1.1. Structure et fonction des globules rouges

Les globules rouges également appelés hématies ou érythrocytes sont de petites cellules anucléées, de forme biconcave contenant essentiellement l'hémoglobine, un pigment respiratoire qui assure le transport d'un élément indispensable à la vie, l'oxygène, des poumons aux tissus, et aussi le transport du dioxyde de carbone (CO_2) des tissus aux poumons. Ces cellules mesurant 7µm du diamètre et 2µm d'épaisseur, baignent dans le sang à une concentration d'environ 5 millions de cellules par mm^3. Le nombre constant de ces cellules dans la circulation sanguine est le résultat d'un équilibre dynamique entre leur production dans l'os et leur élimination de la circulation sanguine à la fin de leur cycle de vie qui dure 120 jours. **(Girasole et *al*., 2012).**

I.1.2. Structure de la membrane érythrocytaire

L'intégrité de la membrane cellulaire et le maintien de sa structure est indispensable au bon fonctionnement de la cellule, ceci est particulièrement vrai pour le globule rouge. La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche phospholipidique opposée par leur pole hydrophobe. Les parties hydrophiles regardent la périphérie de la bicouche. La face externe de la bicouche est dirigée vers le cytoplasme, est en contact avec le cytosquelette protéique globulaire. Des molécules de cholestérol viennent se positionner dans les zones hydrophobes. Cette bicouche est également traversée de part en part par des protéines transmembranaires, sur ces protéines se fixent des sucres qui déterminent les groupes sanguins. Les plus importantes protéines membranaires des érythrocytes sont la bande 3 qui

présente un antiport pour le passage des ions du chlore (Cl^-) et les sialoglycoprotéines qui jouent le rôle de transporteurs de dioxyde de carbone (CO_2).

I.1.3. Echanges membranaires du globule Rouge

Les transports transmembranaires peuvent être regroupés en deux mécanismes **(Figure1) :** les transports passifs selon le gradient de concentration et les transports actifs contre le gradient de concentration. La pompe à sodium correspond à une ATPase magnésium-dépendante qui permet la sortie de 3 Na^+ du globule rouge et l'entrée de 2 K^+. Le fonctionnement de cette pompe nécessite un apport énergétique fourni par l'ATP issu de la glycolyse anaérobie. Il existe également une pompe ATPase magnésium-dépendante qui rejette hors de l'hématie un ion Ca^{2+}. Le transport des anions, notamment les ions Cl^- et HCO^{3-}, s'effectue au niveau de la protéine 3 transmembranaire. La sortie d'acide carbonique est contrebalancée par une entrée d'ions Cl^- La protéine 3 permet également le transport de l'eau à travers la membrane érythrocytaire. (**Lenormand, 2001 ; Portier et *al*., 2007).**

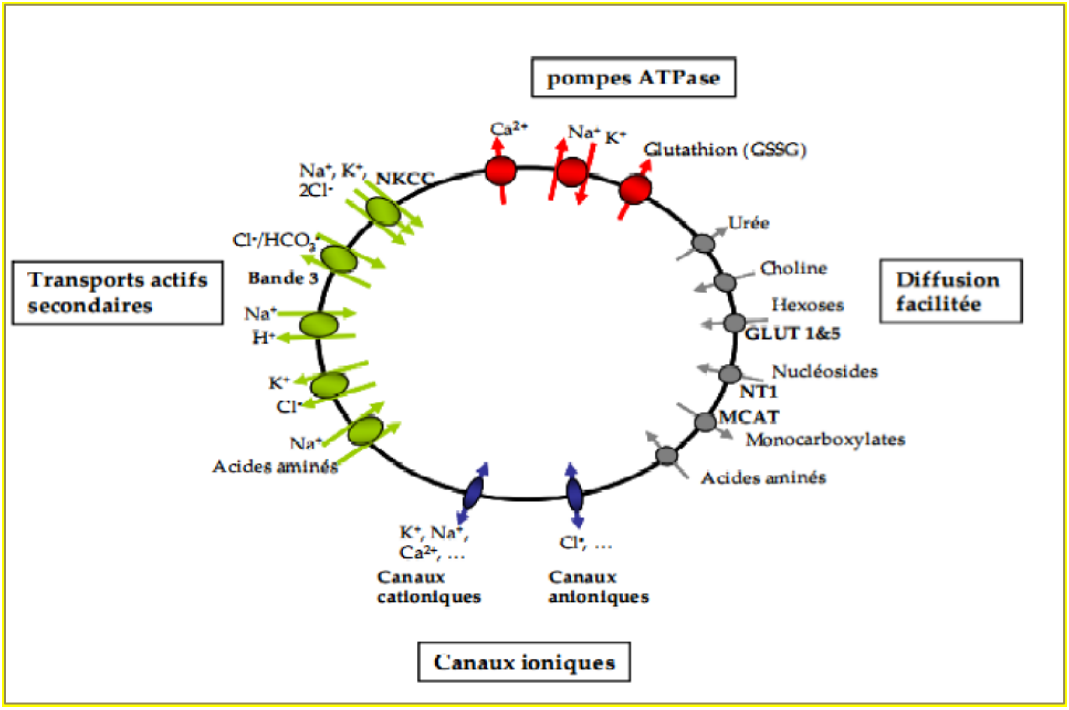


Figure 01 : les échanges de la membrane érythrocytaire **(Jauréguiberry, 2015)**

I.1.4. Biosynthèse du globule rouge

L'érythropoïèse est un processus complexe qui a lieu dans la moelle osseuse et aboutit à la formation de 100 milliards des érythrocytes par jour. Les érythrocytes sont formés à partir de cellules souches multipotentes. Sous l'action d'une hormone, l'érythropoïétine, les globules rouges se différencient et perdent leur noyau, formant des réticulocytes qui entrent dans la circulation sanguine et terminent leur maturation en 24 à 48h. comme cette maturation peut se produire dans la rate, avec synthèse d'hémoglobine puis la perte des mitochondries et des ribosomes, après maturation les globules rouges migrent dans le sang ou ils surviennent généralement entre 100 et 120 jours.**(Courtois et *al*., 2007)**

I.2. Processus d'hémolyse et les anti- hémolytiques

I.2.1. Destruction des hématies ou hémolyse physiologique

L'accumulation de modifications de la membrane du globule rouge au cours du vieillissement (peroxydation lipidique membranaire, perte de résidus d'acide sialique et formation de néoantigènes de sénescence) sont autant de signaux qui permettent aux macrophages d'identifier les globules rouges à éliminer par phagocytose avec réutilisation des composants **(Beaumont et Canonne-Hergaux, 2005).**

L'hémolyse (hémo : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies provoquant la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine, Ce phénomène est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans l'échantillon après centrifugation ou en mesurant la densité optique de surnageant (hémoglobine) par spectrophotométrie **(Mezzou et *al*., 2006)**.L'hémolyse est manifestée par une augmentation des taux sériques en hémoglobine associée à une augmentation du lactate déshydrogénase (LDH), de phosphate et de la créatine kinase(CK) **(Ali et *al*., 2014)**, et aussi par une diminution du taux d'haptoglobine et d'hémoglobine glycosylée. L'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse est dégradée en bilirubine non conjuguée, ou bien sous forme d'un complexe avec l'haptoglobine qui est éliminée rapidement par le foie **(Marchand et *al*., 1980).**

I.2.2. Hyperhémolyse et les maladies associées

L'hyperhémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des GR qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des hématies ou à un raccourcissement de leur durée de vie. Il peut se dérouler dans les vaisseaux (intravasculaire) ;

l'hémoglobine libérée se lie alors à l'haptoglobine. Comme, il peut se manifester hors des vaisseaux (extravasculaire), notamment au niveau de la rate **(Béraud, 2014).**

L'hyperhémolyse peut se produire par l'introduction d'agents chimiques tel que certains médicaments, capables de modifier l'intégrité cellulaire en induisant une réorganisation et des changements morphologiques qui résultent d'une cascade d'effets à partir de l'altération de la membrane lipidique conduisant finalement à la formation de sphérocytes et par conséquent à la lyse des érythrocytes. **(Portier et *al*., 2007 ; Manaargadoo-Catin et *al*., 2016).** Un déséquilibre dans les proportions des radicaux libres générés et le répertoire antioxydant inhérent au système explique la diminution de la durée de vie des globules rouges pendant de nombreuses pathologies hyperhémolytiques **(Hebanni et *al*., 2014).**

I.2.2.1. Anémies hémolytiques corpusculaires

L'hémolyse pathologique se traduit souvent par des anémies hémolytiques. Ce sont des anémies congénitales par anomalies héréditaires des hématies qui peuvent affecter :

- La membrane des hématies **:** Anomalies de structure des protéines membranaires telles que l'Anykrine et la protéine 3, conduisant au dysfonctionnement des ATP ase membranaires et à une augmentation de la perméabilité aux ions Na^+ (sphérocytose, stomatocytose).

- L'Hémoglobine **:** Ces anomalie qui causent les hémoglobinopathies, Peuvent être soit constitutionnelles de la synthèse de globine (diminution ou absence de la synthèse des chaines de globines cas des α et β thalassémie) ou constitutionnelles de la structure de globine (cas de la drépanocytose). Comme, elles peuvent être des anomalies acquises de la molécule d'hémoglobine, c'est le cas de la méthémoglobine qui est congénitale ou acquise, la forme acquise provient d'une exposition aux toxiques ou aux agents oxydants.

- Les enzymes**:** Il existe plusieurs formes de déficiences d'enzymes (enzymopathies) pouvant causer l'anémie hémolytique, la plus courante est la déficience en une enzyme nommée glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), un déficit de cet enzyme provoque un déficit en NADPH qui se répercute sur la régénération du glutathion réduit et par conséquent sur l'activité du glutathion peroxydase au niveau du globule rouge, ce déficit se traduit par un défaut des peroxydes, a l'état basale, cette anomalie est bien supportée mais la prise de facteurs déclenchant (agents chimiques ou certains médicaments anti inflammatoires) déclenche des crises hémolytiques**.(Béraud, 2014)**

I.2.2.2. Anémies hémolytiques non corpusculaire

L'hémolyse est induite par une destruction directe des hématies après leur altération. Ces anémies correspondent à des maladies acquises, telles que les anémies hémolytiques immunologiques et toxiques qui sont la conséquence de l'action de divers produits toxiques comme certains médicaments.

I.2.2.3. Anémies résultantes d'une carence nutritionnelle

- **Anémie ferriprive :** C'est la plus fréquente des anémies, l'anémie par carence martiale se développe par stades, au cours de la première étape, les besoins en fer sont supérieurs aux apports ce qui provoque l'épuisement progressif des réserves de fer dans la moelle osseuse, à mesure que les stocks diminuent, l'absorption du fer alimentaire augmente au cours des étapes ultérieures, la carence altère la synthèse des globules rouges, puis finit par provoquer une anémie. **(Béraud, 2014)**.
- **Anémie par manque en vitamine B12 et en acide folique :** Cette anémie est particulièrement courante chez les personnes âgées (plus de 75 ans). Elle est provoquée plutôt par un trouble d'absorption de la vitamine B12 au niveau intestinal qu'à une carence alimentaire (car les réserves sont importantes). Une carence en vitamine B12 et en acide folique affecte la moelle osseuse et est responsable d'une anémie macrocytaire mégaloblastique (les globules rouges sont plus grand que la normale) **(Béraud, 2014).**

I.2.3. Anti-hémolytiques

A- Anti-hémolytiques classiques

L'anémie hémolytique est un sujet relativement complexe qui demande obligatoirement une investigation spécialisée pour déterminer des traitements appropriés, il y a autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de substances synthétiques anti-hémolytiques qui réduit l'hyper-hémolyse, sont disponibles. Le choix du traitement se porte notamment sur la prescription de fer, de vitamine B12 et d'acide folique**. (Federici et *al*., 2007 ; Leporrier, 2008).**

- **Le fer :** Le rôle physiologique du fer est la synthèse de l'hème dans la mitochondrie. Le Fe^{2+} et la protoporphyrine vont donner l'hème, qui passe alors dans le cytoplasme. L'hème ensuite s'associe aux sous unités de globine α et β pour former l'hémoglobine. Quand l'équilibre en fer est rompu (manque d'apport ou pertes élevées), l'organisme fait appel aux stocks de ferritine et d'hémosidérine. Lorsque ces stocks sont épuisés,

on observe alors une diminution du fer plasmique ; l'érythropoïèse est ralentie, les érythroblastes s'appauvrissent en granules ferrugineux et les sidéroblastes disparaissent progressivement, l'anémie s'installe.

- **La vitamine B12 et B9 (cobalamine et acide folique) :** Ces deux vitamines dites anti mégaloblastiques sont indispensables à la physiologie de l'hématopoïèse. En cas de carence de l'une de ces deux vitamines une hématopoïèse inefficace s'installe aboutissant à un état pathologique nommé « anémie mégaloblastique » où les taux sanguins de plaquettes, de globules blancs et des globules rouges seront diminués. La conséquence commune aux modes d'action de la vitamine B12 et des folates est d'intervenir au niveau cellulaire dans la synthèse de l'ADN, une carence de ces vitamines se traduira par un trouble cellulaire très particulier dans lequel la division cellulaire (ADN) sera affectée **(Dubost et Dupuis, 2011).**

B- Autres anti-hémolytiques

L'étude et la recherche de substances anti-hémolytiques d'origine végétale est en plein essor. En effet, des études entrepris ont montrés que les plantes constituent un réservoir de substances à potentiel anti-hémolytique dont les mécanismes d'action restent dans l'ensemble à déterminer. Quelques exemples en sont cités dans le **Tableau N°I**.

Tableau I : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique

Matrice végétale	**Tests utilisés**	**Effets**	**références**
Fleur de *Albutinus indicum*	Hémolyse induite par Na Cl	Activité Anti-hémolytique :70,24% à 1mg/ml d'extrait	Vidhya et Shobana, 2016
Feuilles, tige, fleur de Gymnemas ylvestre	Hémolyse induite par le H_2O_2	Activité anti hémolytique : IC50=29,83 g/ml	(James et Alewo 2014)
Fleur de *Cassia auriculata*	Hémolyse induite par le Na Cl	Activité Anti-hémolytique :64% à 500µg/ml d'extrait	(Rani et *al*., 2014)
Extrait de *Annona muricata*	Hémolyse par TritonX100	Activité Anti-hémolytique :85,7% à500 µg/ml d'extrait	(Muthu et Duraira, 2015)
Extraits de *Oryza sativa*	Hémolyse induite par le Na Cl	Effet Anti-hémolytique :63,77% à 500µg/ml	(Rahman, Eswaraiah et *al*., 2015)
Fruit de *Persea americana*	Hémolyse induite par le H_2O_2	Effet anti-hémolytique IC50=0,0422mg/ml	(Nabavi et *al*., 2013)
Feuilles de *Piber betel*	Hémolyse induite par le H_2O_2	Activité Anti-hémolytique : 40.6% pour une concentration de 5mg/ml	(Chakraborty et Shah , 2011)

I.3. *Tamus sp*

C'est un genre de plantes tout à fait rapproché du genre Dioscorea, soit pour l'organisation générale, soit pour la structure florale, c'est ainsi que le genre *Tamus* se trouve inclût dans le genre Dioscorea, l'espèce la plus connue est sans doute le Tamier « *Tamus communis* » **(Caddick et *al*., 2002).** La classification systématique du *Tamus* selon **Caddick et *al*., 2002** est la suivante **:**

Règne : plantae

Embranchement : spermatophytae

Sous embranchement : angiosperma

Classe : monocotylédoneae

Ordre : liliales

Famille : dioscoreaceae

Genre : Tamus

Le genre Tamus renferme 4 espèces : *Tamus comunis* qui est la plus connue, *Tamus orientalis, Tamus elephantipes et Tamus sylvestrus.*

Un grand nombre de dénominations vernaculaires du *Tamus* sont connus et ne sont souvent que des adaptations ou traductions d'une langue à une autre. Ainsi, *Tamus communis L ou Dioscorea communis* en latin, porte les noms d'herbe aux femmes battues en Français, Black bryony en anglais, enarabe El-karma saouda et en kabyle Thouchanines ; *Tamus orientalis* ou *Dioscorea orientalis* ; *Tamus sylvestris*, *Dioscorea hederifolia* ou *Dioscorea montana* en latin et porte plusieurs noms communs : pied d'elephant, wild yam, tortue au dos en français ; *Tamus elephantipes*, *Dioscorea testudinaria*, *Testudinaria elephantipes* et pieds d'elephant en français. **(Nell et *al*., 2008)**

I.3.1. Description botanique

Toutes les espèces du genre *Tamus* ont une morphologie analogue notamment le *Tamus communis* **(Figure 02.A)** et le *Tamus orientalis* **(Figure02.B)** bien que ce dernier est dioïque, mais il ne faut pas les confondre, car le *T. orientalis* est très toxique. Ces deux espèces sont herbacées vivaces, rhizomateuses, grimpantes de 2 à 3m d'hauteur, à tige grêle, cylindrique, striée ; la racine est grosse noirâtre, ressemblant à un grand navet et pèse plusieurs kilos, les feuilles sont alternes, en forme du cœur vert, avec 5 à 7 nervures ramifiées , luisantes en dessus, ont un long pétiole et un limbe très développé, les fruits sont sous forme de baies charnues rouge, renfermant 5 graines sphériques, la floraison du *Tamus communis* a lieu au printemps et celle du *Tamus orientalis* en mois de Décembre et Janvier**. (Boulard, 2003).**

Le *Tamus Sylvestris* **(Figure 02.C)** se croitre sur les roches, la tige est de couleur sombre, les feuilles en forme de flèche sans avoir un sinus profond, les fleurs solitaires sur pédicelles. Alors que le *Tamus elephantipes* **(Figure 02.D)** pousse jusqu'à 1,5m de long, le tubercule a un diamètre allant jusqu'à 75cm, se trouve en grande partie au-dessus du sol, la peau de tubercule

est gris-brun et dure, avec des plaques épaisses de lièges qui sont semblables aux plaques d'une tortue. Avec l'âge le tubercule ressemble un peu à une patte d'éléphant, les feuilles sont petites en forme du cœur, la florescence aura lieu en hiver, le fruit est une capsule brun clair, chaque capsule porte jusqu'à 6 graines et murissent d'Avril à octobre. **(Boulard, 2003)**

A.

B.

C.

D.

Figure 02 : Différentes espèces du Tamus **(Boulard 2003).**

A. *Tamus communis,* **B**. *Tamus orientalis,* **C.** *Tamus Sylvestris et* **D.** *Tamus elephantipes*

I.3.2. Répartition géographique

Les espèces du genre Tamus sont originaires d'Afrique, Europe centrale et d'Asie occidentale. Une large distribution du *Tamus communis* dans l'Asie, Europe centrale, sud-ouest d'Afrique et Afrique du nord et proche orient, tandis que le *Tamus orientalis* est réparti dans la zone méditerranéenne. En ce qui concerne l'Algérie, généralement on y rencontre ces 2 espèces dans les montagnes. Le *Tamus sylvestris* et le le *Tamus elephantipes* se distribuent en Afrique de sud.**(Kovács et *al*., 2007)**

I.3.3. Usage traditionnel et médicale

Les espèces de Tamus sont toxiques à cause des saponines qu'elles contiennent. Le *Tamus communis* et le *Tamus orientalis* sont populaires dans certaines zones comme remèdes externes puissants pour le rhumatisme, l'arthrose, les hématoses et les ecchymoses, d'où le nom herbe aux femmes battues ayant un effet secondaire irritant pour la peau **(D'Antuono et Lovato, 2003 ; Boulard, 2003).** En médecine traditionnelle, il a été rapporté que les différentes parties de la plante *tamus communis* sont utilisées pour le traitement des tumeurs et polypes et que les fruits de Tamus communis soulagent les douleurs arthritiques et rhumatismale une fois frottés sur la peau. **(Kovács et *al*., 2007).**

Le *Tamus elephantipes* et le *Tamus sylvestris*, leur tubercule peut être consommé mais après une longue ébullition pour éliminer les toxines. **(Guerrera et Lucia, 2007)**

I.3.4. Propriétés pharmacologiques de *Tamus sp*

A part l'espèce *Tamus communis,* d'après notre documentation, aucune étude n'a été rapportée sur les propriétés pharmacologique ou biologique des autres espèces du genre *Tamus*. Plusieurs effets et activités biologiques ont été démontrés pour *Tamus communis.* Ainsi, il a été rapporté que les extraits de rhizomes et racines de *T. communis* présentent de potentiels activités cytotoxiques, anticancéreux, antiviraux et anti-inflammatoire **(Capasso et *al*., 1983; Kovács et *al*., 2007)**.

Par des études réalisées *in vitro,* il a été démontré que des Polyphénols dérivés des rhizomes de *T. communis* ont une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du col de l'utérus et d'adénocarcinome humain (HeLa)**.(Kovács et *al*., 2007)** et que la racine de la plante est une source prometteuse d'antioxydants **(Zerargui, 2015)**.

Aquino et *al*., 1985 ont démontré que les phénanthrènes dérivés de rhizomes de *T. communis* ont une activité antivirale particulièrement sur les virus de type Rhinovirus 1B.

Les études réalisées, *in vivo,* sur model animal à inflammation proliférative par **Capasso** et ces collaborateurs, (**1983**) ont montrés que l'extrait éthanolique de racines de *T. communis* présente des effets anti-inflammatoires et analgésiques. Le Tamier est capable de moduler la réponse inflammatoire à des degrés variables de sévérité tels que la formation d'œdèmes, la perméabilité vasculaire et la dégranulation. Selon ces auteurs, il semblerait que ces activités soient reliées à la présence des constituants de stérol comme la diosgénine, β-sitostérol, ou le stigmastérol, Ces même auteurs ont indiqué que les extraits éthanoliques de feuilles et de

baies pouvaient empêcher la formation d'œdèmes induit par le carragénine. (**Capasso et *al.*, 1983**).

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel végétal

La récolte de notre plante du genre *Tamus* sp a été faite durant la période de floraison et fructification où la plante est entièrement bien développée à **Tazmalt** (Figure 03), Bejaia-Algérie (36°23’04’’N ; 4°23’57’’E ; 450m d’altitude) (Google Earth V.7.1.2.2014) le matin. Les différentes parties de la plante ont été séparées puis nettoyées de tout contaminant à l’eau courante, séchées à l’étuve puis broyées grâce à un broyeur électrique « KIgranulométrie » et tamisées pour obtenir une poudre fine à granulométrie inférieur à 125 µm. Les poudres obtenues ont été ensuite conservées dans des flacons en verre à l’abri de la lumière.

Figure 03 : Localisation géographique de station de la récolte de la plante étudiée

II.2. Extraction et dosage des composés phénoliques

II.2.1. Préparation des extraits bruts éthanoliques

L’extraction des substances actives a été réalisée par la technique d’extraction solide/liquide en suivant le protocole décrit par **Benhammou et *al*., 2008.**100 g de la poudre végétale ont été laissées macérés dans un volume d’un litre d’éthanol 70%. Le macéra a été ensuite filtré sur papier wattman. L’évaporation du solvant organique a été réalisée sous pression réduite dans une étuve à 40°C. Les extraits secs obtenus ont été ensuite complètement séchés à l’étuve (40°C) pendant 24h et conservés jusqu’à l’utilisation.

- **Calcule du taux d'extraction**

Le taux d'extraction exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante **(Fellah et *al*., 2008)** :

Taux d'extraction (%)= [P1 / P0] *100

P1 : poids de l'extrait sec exprimé en gramme.
P0 : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

II.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocaltau, mélange de l'acide phosphotungstique (H3PW12O0) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12O40). Ce réactif est réduit en présence des phénols totaux en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W8O23) et de molybdène (Mo8O23). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel. Cette coloration possède une absorption maximale aux environs de 750 à 760 nm **(Wong et *al*., 2006)**

Pour cela, 0.2ml de l'extrait végétal ont été solubilisés dans l'éthanol (1mg/ml) et mélangés avec 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10% et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7.5%). Après agitation, laissés réagir à température ambiante pendant 2h avant la mesurer de la DO à 765 nm. Il est à noter qu'un blanc a été préparé en mélangeant 0,2 ml d'éthanol avec 1,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium (**Wong et *al*., 2006).**

Expression des résultats

Les taux de composés phénoliques totaux contenus dans les extraits éthanoliques des différentes parties de notre plante ont été déterminés en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec différentes concentrations d'acide gallique **(Annexe 03)** dans les mêmes conditions précédemment citées**.**

Le taux de polyphénols sera exprimé en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait végétal (mg EQAG/g MS).

II.2.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique (**Djeridane et *al*., 2006)** dont le principe étant la capacité du groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 des

flavonoïdes à se complexer au chlorure d'aluminium par chélation de l'ion Al^{3+} formant ainsi un complexe jaunâtre qui présente un maximum d'absorbance à 488nm.

1ml d'extrait végétal (1mg/ml) a été mélangé avec 1ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2%). Après incubation pendant 10 mn à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 488 nm. Un blanc a été préparé en mélangeant 1 ml de la solution d'extrait avec 1 ml du méthanol pour chaque extrait.

- **Expression des résultats**

La concentration en flavonoïdes contenue dans les différents extraits est calculée par référence à une courbe d'étalonnage, en utilisant la quercétrine comme standard **(Annexe 04)** et le taux de flavonoïde est exprimée en mg équivalent de quercétine /g de la matière sèche

II.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

L'effet anti-hémolytique d'extraits de plante est évalué *in vitro* par l'utilisation de modèle érythrocytaire. Ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane présente des similitudes avec d'autres membranes cellulaire (**Shobana et Vidhya, 2016).**

II.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang utilisé pour préparer les suspensions érythrocytaires a été prélevé à partir des personnes saines et récupéré de CHU de Bejaia dans des tubes héparines auxquels des analyses sérologiques ont été faites, et cela à fin d'exclure tout risque de contamination d'une quelconque pathologie.

Après centrifugation du sang à 3000rpm /5min, le culot récupéré est lavé 3 fois avec la solution PBS iso-saline formée de tampon phosphate de potassium 10mM, pH=7,4 et 154mM de Na Cl. Chaque lavage consiste en une suspension des cellules dans du PBS Iso salin et une centrifugation à 3000rpm/5min. Après la dernière centrifugation, le culot est resuspendu à nouveau dans une solution du PBS iso-salin à raison de 1 volume du culot et 9 volumes du PBS, permettant ainsi d'obtenir une hématocrite à 10%. **(Rani et *al*, 2014)**

II.3.2. Mise au point des tests de l'hémolyse induite *in vitro*

L'exposition des globules rouges (RBC) à certains paramètres physicochimiques tel que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactifs oxygénées, provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique provoquant

ainsi la libération de l'hémoglobine qui sera alors dosée par spectrophotométrie d'absorbance visible à 540 nm .

Pour tester l'effet anti hémolytique de nos extraits éthanoliques des différentes parties de *Tamus sp,* des tests sur modèle érythrocytaire à hémolyse induite par différents agents « milieu hypotonique, acide salicylique, triton X-100 et l'H_2O_2) ont été faits.

II.3.2.1. Induction par l'acide salicylique

Dans des tubes à essai contenant chacun 4.5ml de Na Cl hypotonique (4,5mg/ml), on a ajouté 50µl de l'AS de concentrations variant entre 0 et 0.5mg/ml. Le tube témoin reçoit le même volume du tampon PBS, Puis une quantité de 500 µl de la suspension érythrocytaire est ajoutée dans chaque tube. Ces tubes sont ensuite homogénéisés et incubés à 37°c pendant 30 min dans un bain marie. Les tubes sont centrifugés (3000rpm ;5min) et l'absorbance de surnageant est mesurée à 540 nm. **(Houcher et *al*., 2001)**

II.3.2.2. Induction hypotonique

Afin de déterminer la concentration du Na Cl qui provoque la lyse des globules rouges, on a additionné 100µl de la suspension érythrocytaire (10%) à 5ml de Na Cl à différentes concentrations (2,5-7mg/ml), ainsi qu'un témoin négatif (Na Cl isotonique 9mg/ml) et un témoin positif (l'eau distillée). Après incubation pendant 30min à température ambiante, le mélange a été centrifugé 10 min à une vitesse de 3000rpm, à la fin on a effectué une lecture des densités optiques à 540 nm **(Louerrad et *al*., 2016).**

II.3.2.3. Induction par le triton X100

Un volume de 800µl du triton X100 à différentes concentrations (0.001%, 0.03%, 0.04%, 0.05%,0.1%,1%) a été mélangé avec 2.2ml du tampon phosphate (0.2M, pH=7.4 contenant 0.9% de Na Cl) et 500µl de la suspension érythrocytaire (10%). Le mélange a été incubé 1h, à 37°C, puis centrifugé à 3000rpm pendant 5min .la densité optique de surnageant a été mesurée à 540 nm, on a préparé de même façon le contrôle mais en absence du triton X100 (**Muthu et Duraira, 2015).**

I.3.2.4. Induction par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

500µl de H_2O_2 à différentes dilutions (1/10,1/30,1/60,1/100) ont été mélangés avec un volume de 250µl de la suspension de globules rouges, après une durée de 3h d'incubation à 37°C, on a ajusté par le PBS jusqu'à 4,500ml puis le mélange a été soumis à une

centrifugation pendant 10 min avec une vitesse de 3000 rpm. L'absorbance des surnageant a été lue à 540 nm**.** Les contrôles ont été préparé en remplaçant l'H_2O_2 par l'eau distillée pour le contrôle positif et par la solution PBS pour le contrôle négatif **(James et Alewo, 2014).**

II.3.2.5. Calcule des taux d'hémolyse

Le pourcentage d'hémolyse pour tous les teste a été calculé en suivant la formule suivant **(Shobana et Vidhya, 2016) :**

% d'hémolyse= (Abs du test/Abs du contrôle) x 100

II.3.3. Mesure de l'effet anti-hémolytique des extraits de *Tamus sp*

II.3.3.1. Effet sur l'hémolyse induite par l'AS

Un volume de 1ml de l'extrait à différentes concentrations (0,1 à 1mg/ml) a été additionné à 300µl de la suspension érythrocytaire et incubé 5 min, puis 50µl de l'AS à une concentration de 0.3mg/ml ont été ajouté avec 4.5ml du Na Cl hypotonique, le mélangea été ensuite dilué par 5ml du PBS. Après homogénéisation et incubation pendant 1h à 37°C puis centrifugation à 3000rpm pendant 5 min, les densités optiques des surnageant ont lues à 540 nm. Un contrôle positif a été préparé en absence de l'extrait dans les mêmes conditions et une molécule pure de référence (acide salicylique isotonique) comme standard **(Houcher et *al., 2001).***

II.3.3.2. Effet sur l'hémolyse induite par la solution hypotonique (Na Cl)

100 µl de l'extrait du *Tamus sp* à différentes concentrations (0,1-1mg/ml), ont été mélangé avec 100µl de la suspension érythrocytaire, après une incubation de 10min à température ambiante, 5ml du Na Cl à une concentration de 3.5mg/ml ont été ajouté. Le mélange est laissé incubé à 37°C pendant 30 min puis centrifugé à 3000rpm/ 10 min. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm **,** de même Un contrôle en absence d'extrait et un standard (quercétine) ont été réalisé **(Louerrad et *al.*, 2016)** .

II.3.3.3. Effet sur l'hémolyse induite par le triton X100

Un volume de 1ml d'extrait de plante à différentes concentrations (0.1-1mg/ml) a été ajouté à 500µl de la suspension érythrocytaire, le mélange a été incubé pendant 5 min à une température ambiante, puits additionné 800µl du détergent triton X100 à 1% ; après une incubation d'une heure à 37°C suivie d'une centrifugation à 3000rpm/10 min, une lecture des

DO à 540 nm a été réalisée. Le contrôle a été préparé en absence de l'extrait remplacé par le même volume en eau distillée **(Muthu et Duraira, 2015)**.

II.3.3.4. Effet sur l'hémolyse induite par l'H_2O_2

250µl de la suspension érythrocytaire et 500µl d'extrait à différentes concentrations (0.1-1mg/ml) ont été incubés pendant 30 min à température ambiante puis on a ajouté 500µl de H_2O_2 (1/30), et après une incubation pendant 3h à 37°C, on a ajusté le volume final à 4500µl par le PBS, à la fin une centrifugation et une lecture des DO à 540 nm et de même façon on a réalisé le test standard en utilisant la quercétine comme molécule de référence. Le contrôle a été réalisé en absence d'extrait et en présence de l'eau distillée. **(James et Alewo, 2014).**

II.4. Traitement statistique des résultats

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous forme moyenne ± écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statistica. Les différences ont été considérées comme étant significatives à $\alpha = 0,05$. L'analyse des données des régressions linéaires et des régressions non linéaires a été faite par l'utilisation le programme Excel® (Microsoft Excel 2016).

Résultats

Et Discussions

III. Résultats et Discussions

III.1. Taux d'extraction des extraits bruts

Le choix de la méthode d'extraction à utiliser est très important avant l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plantes. Nous avons opté une extraction par macération de la poudre végétale dans l'éthanol, le choix de ce solvant a été utilisé dans le but d'extraire le maximum de composés phénoliques, comme il est moins altérant que le méthanol **(Mueller-Harvey, 2001).** Dans le but d'avoir une meilleure extraction des principes actifs, la plante a été broyée en poudre la plus fine possible pour augmenter la surface de contact entre le matériel végétal et le solvant d'extraction. L'extraction a été accomplie à température ambiante pour éviter au maximum la dénaturation et la fuite des composés les plus volatilisés. Nous avons opté pour le dosage des polyphénols et flavonoïdes dans les extraits obtenus en raison du fait que la majorité des activités biologiques des plantes leur sont attribuées et que ces métabolites sont doués d'activités antioxydants et d'activité anti-hémolytiques. **(Signo et *al*., 2007)** En utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction par macération, Les taux d'extrait brut des différentes parties de la plante étudiée obtenus varient entre 06.81% et 31.57% **(Figure 04).**

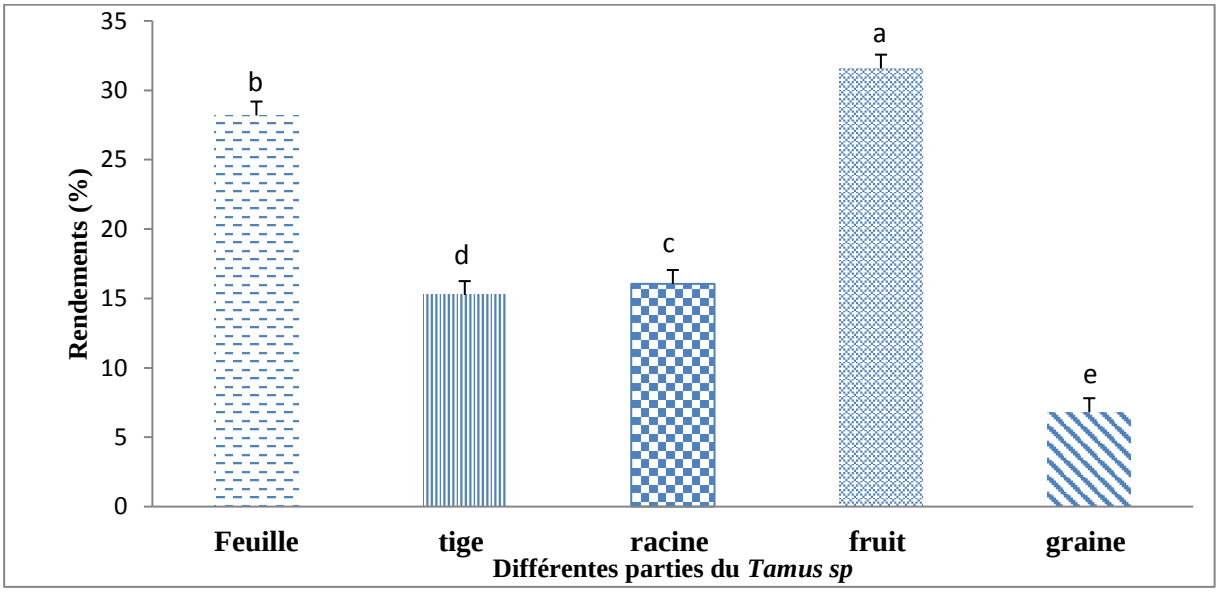


Figure 04 : Rendements des extraits bruts éthanoliques des différentes parties de la plante étudiée.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± écartype pour n=3.ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à α=0.05. a= très hautement significative, b=très significative, c= moyennement significative, d=faible significative, e= très faible significative.

Les résultats de l'étude statistique montrent une différence significative entre les différentes parties de la plante étudiée (p<0,05). Les meilleurs taux d'extraction obtenus ont été obtenus à partir du fruit (31,57%) et des feuilles (28,19%) alors que les faibles taux d'extraction ont été enregistrés pour les graines (05.27%). Aucune différence significative n'a été constatée entre la racine et la tige (16,05% et 15,25%).

La variation des rendements d'extractions entre nos résultats et celle de la littérature peuvent être expliquée par les méthodes d'extraction et de conservation, la granulométrie de la poudre, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leur degré de pureté **(Naczk et Shahidi, 2004 ; Hayat et *al.*, 2009).** Les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique), abiotiques (facteurs édaphiques) **(Ksouri et *al.*, 2008).**

III.2. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes

Les taux en polyphénols totaux, flavonoïdes dans les extraits éthanoliques du *Tamus sp* ont été déterminés par méthode colorimétrique, et les résultats obtenus sont exprimés en mgEqAG/g MS pour les polyphénols totaux et mgEqQ/g MS pour les flavonoïdes **(Figures 05 et 06).**

III.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

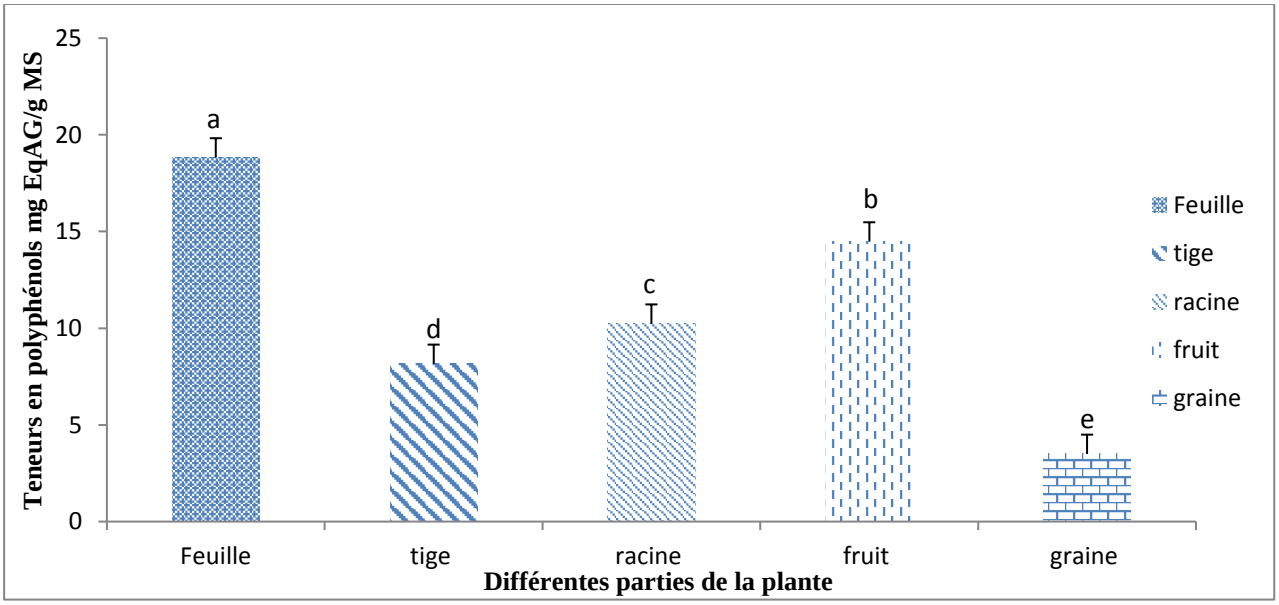


Figure05 : Teneurs en polyphénols des extraits bruts éthanoliques de différentes parties de *Tamus sp.*

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype N=3.ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à α=0.05. a= très hautement significative, b= très significative, c= moyennement significative, d=faible significative, e= très faible significative.

D'après les résultats illustrés dans la **Figure 05,** la variation des taux de polyphénols dans les différentes parties de la plante est significative (P<0,05). Le taux de polyphénols le plus élevé a été observé dans les feuilles (18,83±0,41mgEqAG/g MS), suivit par le fruit (14,48±0,23mgEqAG/g MS), la racine et la tige présentent une faible différence significative (10,23±1,11mgEqAG/g MS ; 8,15±1,04mgEqAG/g MS, respectivement, tandis qu'un très faible taux a été constaté dans la graine (3,50±0,44mgEqAG/g MS). Peu ou pas d'études sur la composition phytochimique sur les espèces du genre *Tamus* ont été réalisées. En effet, seule l'espèce *Tamus communis* qui a été objet d'étude de ce type de caractérisation. Parmi lesquelles, celle réalisée par **Boumerfeg et *a*l., 2008** qui ont révélé que la racine de *Tamus. communis* a une teneur en polyphénols de 26,55±3,93mgEq AG/g MS, plus élevée que les teneurs d'extraction que nous avons obtenus. **Barreira et *al.*, en 2013** ont obtenu un taux de polyphenol de 5,041±0.166 mgEqAG/g MS dans l'extrait des fruits beaucoup plus faibles que ceux que nous avons obtenus.

La variation de teneurs en polyphénols entre les différentes parties de la plante s'explique par une distribution non uniforme entre ces différentes parties. Ainsi que Les conditions d'extraction, les méthodes de conservation et l'exposition des extraits de différentes parties de la plante à la lumière, peuvent également affecter la teneur en polyphénols **(Li et al, 2006).**
D'autre part, La faible spécifié du réactif de Folin-ciocalteu est l'inconvénient principale du dosage colorimétrique, le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques mais également de certains sucres, de protéines etc, d'où les différences significatives entre les extraits de différentes parties de la plante **(Vuorela et *al*., 2005).**

III.2.2. Teneurs en flavonoïdes

Selon l'étude statistique de teneurs en flavonoïdes qu'on a réalisée pour (P<0,05) (figure 7), les feuilles montrent une très forte significativité (32.01±0.70mgEqQ/g MS) suivit par le fruit (23.66±0.70mgEqQ/g MS), la racine et la tige ne présentent aucune différence significative (8,29±0.13 ; 8,47±0,28mgEqQ/g MS respectivement), tandis que la graine montre une très faible significativité (2,84±0,21mgEqQ/g MS).

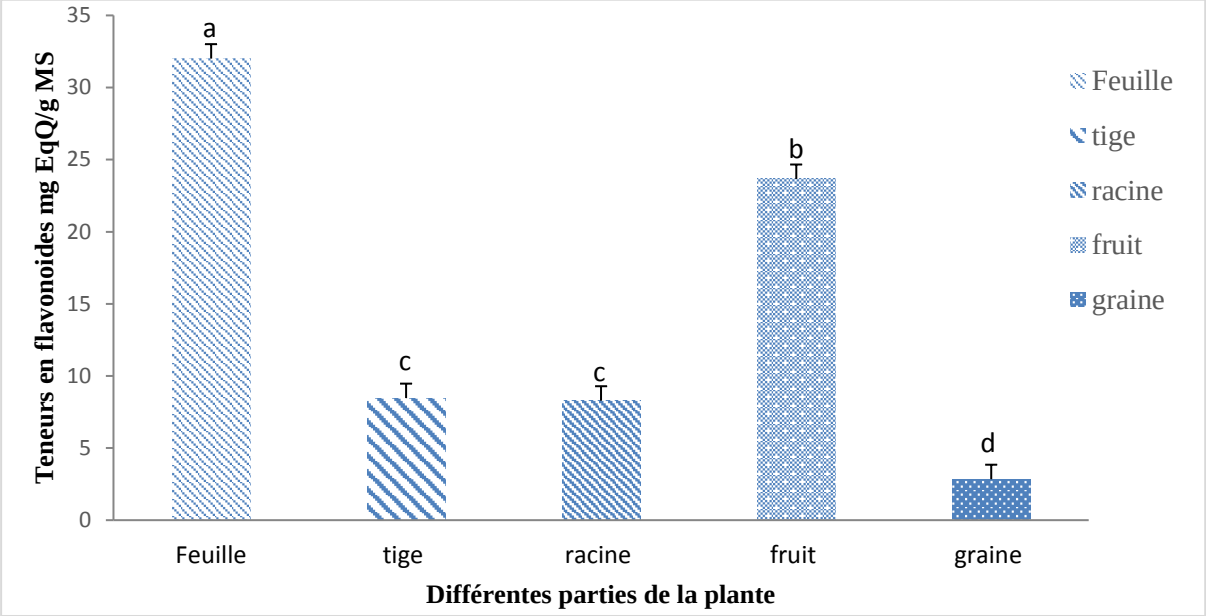


Figure 06 : Teneurs en flavonoïdes des extraits bruts éthanoliques de différentes parties du *Tamus sp.* Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype n=3.ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique.la différence est significative à α=0.05. a= très significative, b= moyennement significative, c= faible significative, e= très faible significative.

Les études réalisées par **Boumerfeg et ses collaborateurs en 2009** sur la racine de l'espèce *Tamus communis* a montré une teneur de 10,15±0.1mgEqQ/g MS qui est supérieure à la teneur qu'on a trouvé pour notre espèce (8,29±0,13mgEqQ/g MS) et c'est dû aux conditions d'extraction. Des autres études réalisées par **Barreira J et al, 2013** sur le fruit, ont révélées une teneur de 1,94±0,043mgEqQ/g MS qui est inférieure à celle qu'on a trouvé (23.66±0,70mgEqQ/g MS).

Les écarts trouvés entre les résultats obtenus et les données de la bibliographie sont tout à fait justifiés. En effet, les conditions d'extraction, l'état et l'origine de l'échantillon en terme de provenance géographique, saison de collecte et cultivation **(Ranalli et *al.*, 2006 ; Falleh et *al.*, 2008 ; Atmani et *al.*, 2009).** Ainsi la diversité structurale des composés phénoliques conduit à la variabilité des propriétés physico-chimiques, la différence des standards utilisés, les méthodes de conservation et d'exposition des plantes à la lumière peuvent affecter la teneur en composés phénoliques **(Mateus et *al.*, 2003)**

III.3. Activités anti-hémolytiques des extraits de *Tamus sp*

III-3-1- Activité anti-hémolyse induite par l'Aspirine

D'après les résultats obtenus **(figure 07),** une hémolyse très significative ($p<0,05$) de 82±0.63%) est obtenue à une concentration de 0,3- 0,5 mg/ml de l'AS. L'hémolyse induite par l'AS est concentrations dépendantes. 50% d'hémolyse sont obtenu pour une concentration de ≈ 0,15 mg/ml d'AS.

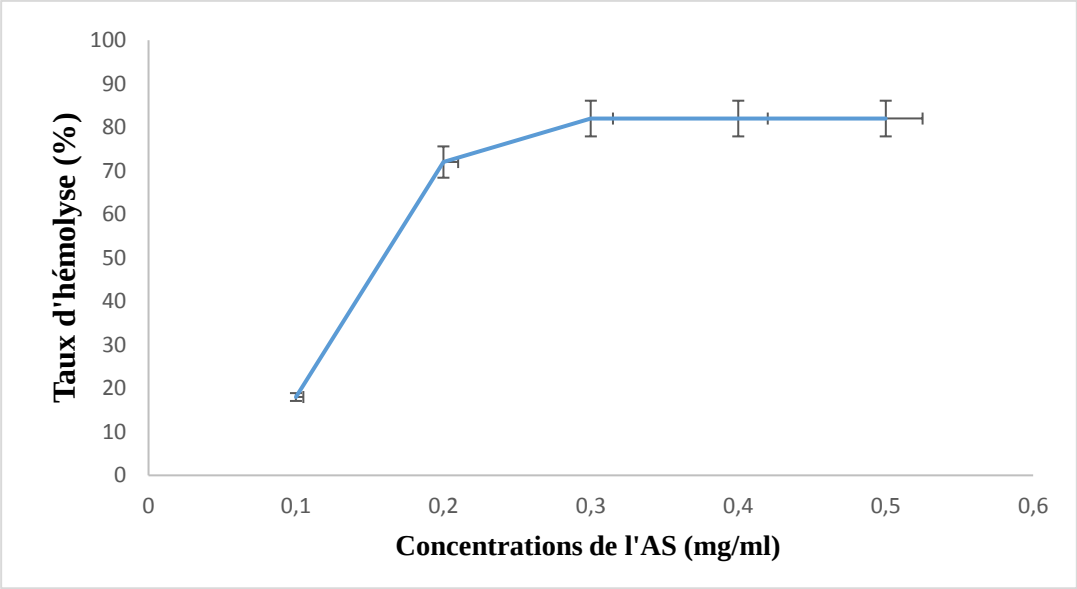


Figure 07 : Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations d'Aspirine

L'étude statistique aussi a montré un taux de lyse des érythrocytes très hautement significatif (100%) pour le contrôle positif et très faible significatif pour le contrôle négatif. Selon **Houcher et *al*., 2001**, l'exposition des érythrocytes humains à des agents oxydants tel que l'AS (précurseur de l'aspirine) ne favorise l'hémolyse qu'en cas de prises importantes, parmi les effets secondaires de l'aspirine, on peut citer son effet oxydant, qui peut entrainer la production des radicaux libres, ces derniers attaquent la membrane.

L'aspirine est indiquée dans la plupart des cas dans l'induction de l'anémie hémolytique chez les sujets possédant un déficit enzymatique en G6PD qui altère le fonctionnement de la voix des pentoses, une des voies principales des métabolismes énergétiques ce qui induit le dysfonctionnement de la pompe sodium (ATPase magnésium dépendante) provoquant une sortie massive des ions Na^+, ce qui rend le milieu hypotonique (**Houcher et *al*., 2001).** Le

déficitaire dispose donc des érythrocytes incapables de résister à un stress oxydatif, car elles ne peuvent pas produire du glutathion réduit faute de NADPH, donc plus de protection contre le stress oxydatif. **(Bancarel et *al*, 2010)**

L'étude de l'effet des extraits d'une espéce du genre *Tamus* sur l'hémolyse induite par l'AS montre que les extraits présentent des effets anti-hémolytiques d'efficacité de l'ordre de IC50 de 200 à 500 µg d'extraits selon la partie de la plante source (**Figure 08)** avec des différences significatives plus ou moins importantes (P<0,05). L'extrait de fruit présente la plus faible activité anti-hémolytique (IC50=272±1,06µg/ml), suivit par la racine (IC50=266±2,01µg/ml), la tige et la graine qui ne présentent aucune différence significative (256±1.08 ; 254±1,11µg/ml) respectivement. Les extraits de feuilles avec une meilleure efficacité anti-hémolytique par rapport à l'acide salicylique isotonique utilisé comme standard (IC50=491±1,99 µg/ml).

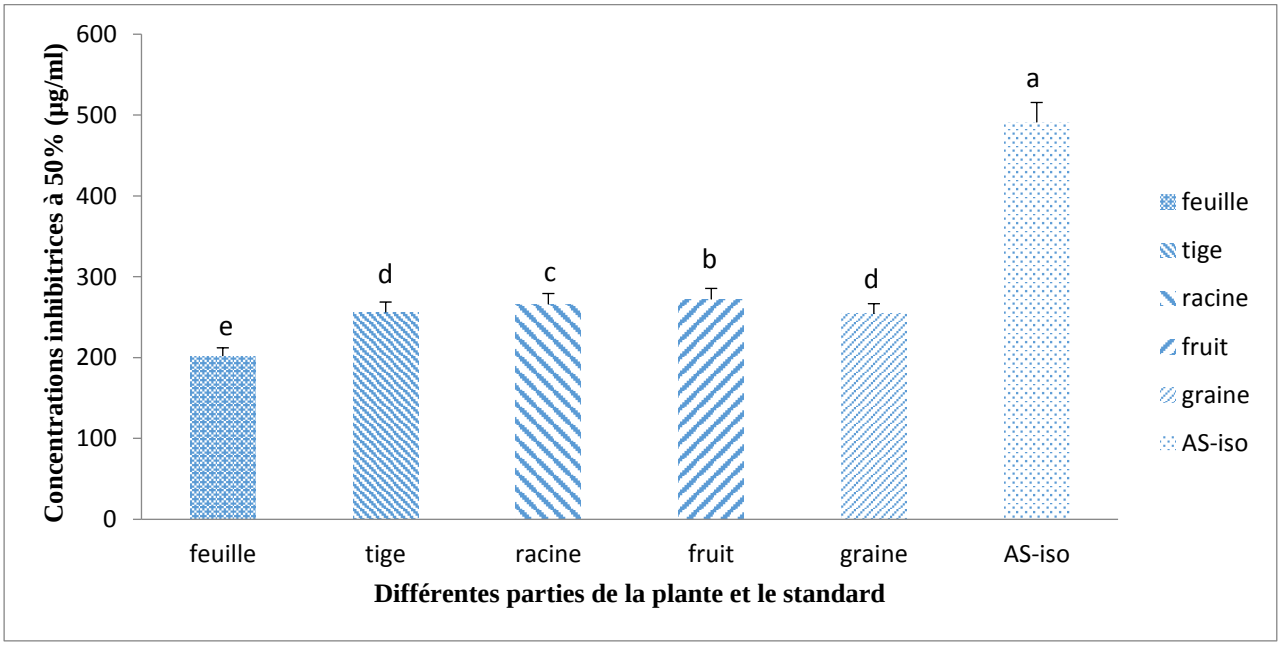


Figure 08 : Effet des différentes concentrations des extraits de la plante sur l'hémolyse induite par l'AS. AS-iso (acide salicylique isotonique) =standard ; Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype n=3. ANOVA MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique.la différence est significative à α=0,05. a=très hautement significatif, b=très significatif, c=moyennement significatif, d=faible significatif, e=très faible significatif.

L'effet anti-hémolytique de notre plante est peut-être dû à sa composition et sa richesse en quelques composants tel que la vitamine E. Ainsi, les études menées par **Houcher *et al.*, (2001)** et **Leger (2000)** ont démontré que la vitamine E est l'un des puissants antioxydants, cette dernière protège les cellules érythrocytaires de la destruction et la peroxydation lipidique et neutralise les radicaux libres.

III-3-2- Activité anti-hémolyse hypotonique

Les résultats de l'hémolyse *in vitro* réalisé sur les globules rouges humains par la solution hypotonique du Na Cl **(Figure 09)** montrent que le maximum d'hémolyse a été trouvé à la concentration entre 2,5 et 3 avec un pourcentage de 91±0.05%.

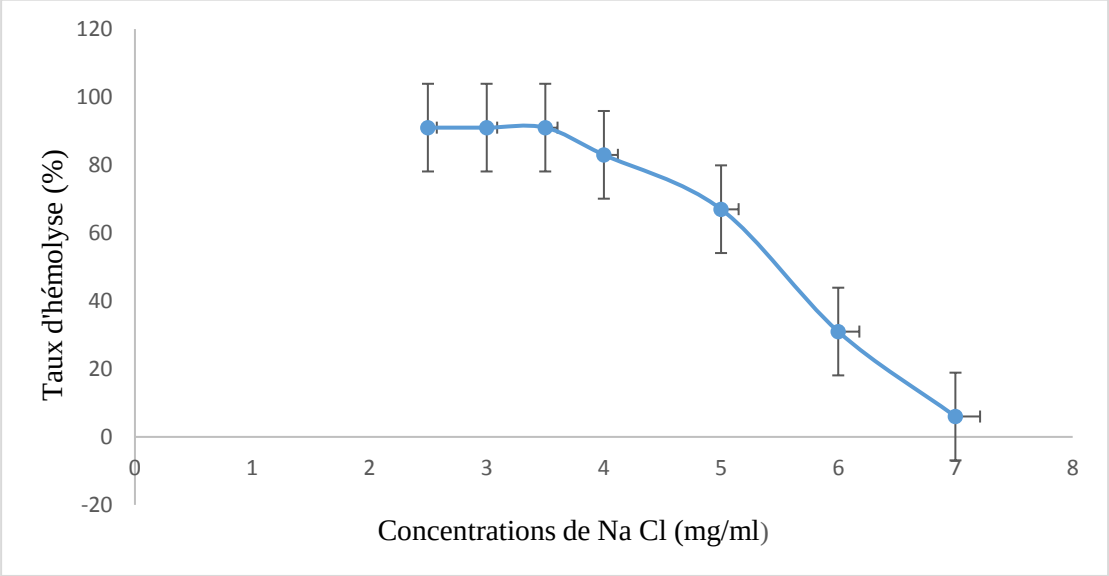


Figure 09 : Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations du Na Cl

Le taux d'hémolyse des globules dépend de la concentration du Na Cl, en effet l'activité hémolytique la plus prononcée est observée dans le milieu hypotonique (3,5mg/ml), tandis que dans le milieu isotonique, à partir de la concentration 5mg/ml, le taux d'hémolyse diminuent jusqu'à ce qu'il atteint un minimum à la concentration 7mg/ml. Si un érythrocyte est placé dans un milieu hypotonique, l'eau pénètre dans la cellule et crée petit à petit une déformation des globules, au-delà d'un certain seuil, la membrane s'éclate et l'hémoglobine intracellulaire passe dans le milieu extérieur (hémolyse). **(Barascud et *al.*, 1998)**

L'effet inhibiteur des extraits de la plante étudiée contre la lyse des globules rouges montre des différences significatives importantes ($P<0,05$) entre les différentes parties de la plante étudiée **(Figure 10)**. L'extrait de feuille présente une activité anti-hémolytique (IC50 = 701

±5,25µg/ml) un peu plus faible que celle enregistrait pour les extraits des autres parties de la plante, en l'occurrence la tige, le fruit, la graine et la racine avec des IC50 respectives de 698 ± 6,23µg/ml, 678±4,76µg/ml, 657±3,46µg/ml et 630±7,05µg/ml. La quercétine, flavonoïde utilisé comme standard, montre une faible significativité par rapport à toutes les parties de la plante (IC50 = 422±1.20µg/ml).

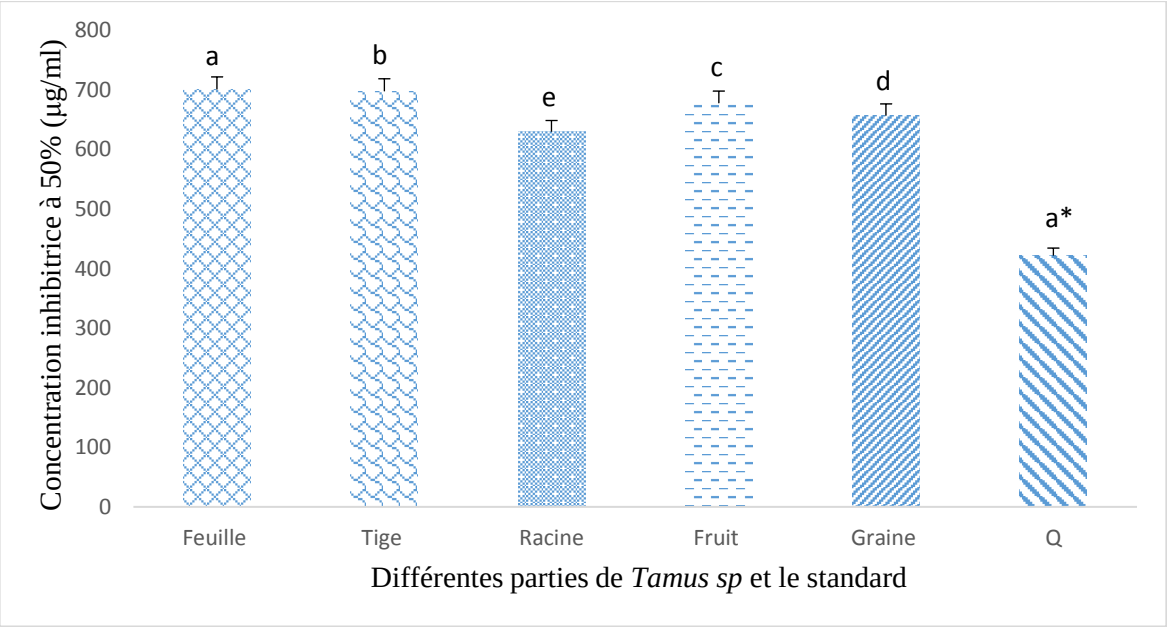


Figure 10 : effets anti-hémolytiques de différentes parties de la plante sur l'hémolyse hypotonique. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype n=3.ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à α=0,05. a=très hautement significative, b=très significative, c=moyennement significative, d=faible significative, e=très faible significative, a*=standard faible significative.

Les résultats obtenus coïncident avec les résultats d'autres travaux qui sont faites sur d'autres genres de plante. Ainsi, **Rahman et *al., (2015)*** ont montré que les extraits de *Oryza sativa* présentaient une activité anti-hémolytique avec un pourcentage de 63,77% à une concentration de 500µg/ml. Alors que **Louerrad *et al.*, (2016)** ont trouvé que les extraits de *Hyloxylon scoparium* présentent un effet protecteur avec un pourcentage d'inhibition de lyse de 63,85% à une concentration de 5g/l. L'effet anti-hémolytique des extraits de plantes peut être attribué au fait que l'extrait équilibre la pression osmotique entre les deux milieux, ou se fixe sur l'aquaporine qui empêche l'eau d'entrer à l'hématie **(Louerrad *et al.*, 2016)**

III-3-3- Activité anti-hémolyse induite par le détergent Triton x100

Le tritonX100 est un détergent non ionique qui possède une partie polaire hydrophile et une queue hydrophobe. Les molécules du tritonX100 s'insèrent dans la bicouche lipidique jusqu'à saturation provoquant ainsi la perturbation de l'organisation des lipides membranaires qui sera totalement solubilisée sous forme de micelles ou de liposomes à des concentrations très élevée en détergent **(Mohamedi et Atik., 2014)**

L'analyse statistique des résultats de l'hémolyse induite par le triton X100 à différentes concentrations du détergent montre une différence significative entre l'effet du triton X 100 aux concentrations utilisées et les deux contrôles (positif et négatif) pour $p<0,05$. Un taux de 100% de lyse est obtenu pour des concentrations de triton ≥ 1% alors que 50% d'hémolyse est produite par une concentration du détergent d'environ 0.1% **(Figure 11)**. En comparant avec le contrôle négatif, les concentrations de triton de 0,01% ; 0,03% et 0,04% présentent des différences significatives plus au moins faibles en revanche, avec le contrôle positif, ces mêmes concentrations montrent de fortes différences significatives.

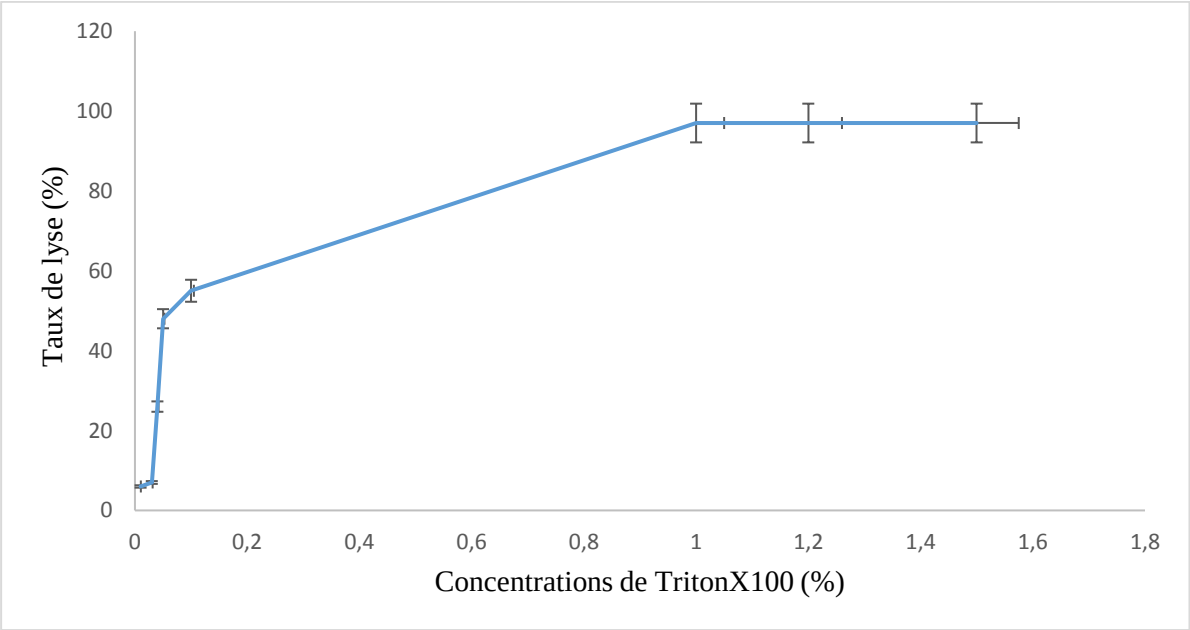


Figure11 : Effets de différentes concentrations du Triton X100 sur l'hémolyse des globules rouges.

Les extraits de la plante du genre *Tamus* ont montré un effet antih-émolytique signficatif contre une hémolyse induite par le triton X100. En effet, les résultats obtenus et leur analyse statistique (**Figure 12**) montrent que les pourcentages d'inhibition d'hémolyse pour les différentes parties de *Tamus sp* (tige, feuille, racine, graine, fruit) varie significativement entre les différentes parties de la plante étudiée. En plus l'effet anti-hémolytique est concentrations dépendant. Ainsi l'extrait de la racine présente un taux d'inhibition de l'hémolyse de 3.98±0.44% pour une concentration de 0,1mg/ml et 13,01±0,32% pour une concentration de 1mg/ml.

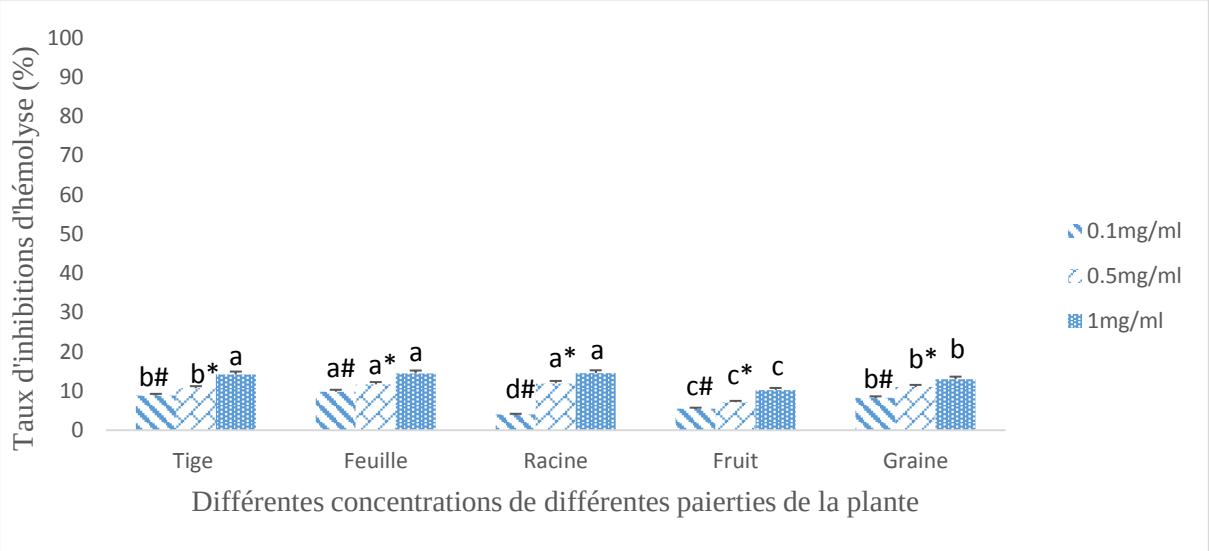


Figure 12 : Taux d'inhibition d'hémolyse induite par le Triton X100 en présence de différentes concentrations des extraits du *Tamus sp.*

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype n=3. ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à α=0,05. a, a*et a#=très significative ; b, b*, b# =moyennement significative ; c, c*, c#= faible significative ; d#=très faible significative.

Les extraits éthanoliques de *Tamus sp* utilisés contre l'hémolyse induite par le triton X100 n'ont montrés aucun effet protecteur de la membrane. Le détergent possède une structure chimique qui le rend plus accessible à la membrane des érythrocytes que les extraits éthanoliques. Les composés bioactifs d'extraits de *Tamus sp* sont probablement incapables d'interagir avec les lipides de la bicouche lipidique. Dans ce cas les cibles de composés bioactifs de *Tamus sp* sont enfuis à l'intérieur des structures conservées qui sont les micelles et les liposomes. **(Preté et *al*., 2011)**

III-3-4- Activité anti-hémolyse induite par le radical H_2O_2

L'étude de pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène a été réalisée à différentes concentrations (dilutions) de H_2O_2, une étape indispensable pour fixer la concentration de H_2O_2 qui provoque une hémolyse optimale. L'analyse statistique des résultats de l'activité hémolytique induite par le radical H_2O_2 (**Tableau II**), montre une différence significative entre les différentes dilutions de H_2O_2 et les deux contrôles (négatif et positif) pour $p<0.05$. L'H_2O_2 diluée au 1/30, provoque une hémolyse presque complète (98±1,9%). Même à dilution de 1/150 de H_2O, l'activité hémolytique avoisine le 100% « taux d'hémolyse est de 90±0,6% ». En comparent les taux de lyse aux différentes dilutions de H_2O_2 avec celui du contrôle positif, les différences sont plus au moins significatives, ainsi avec le contrôle négatif les différences sont fortement significatives.

Tableau II : Taux d'hémolyse induite par différentes dilutions de H_2O_2

Dilutions de H_2O_2	**Taux d'hémolyse (%)**
1/5	91±1,4
1/10	96±0.9
1/30	98±1,9
1/60	97±1,2
1/100	92±0,7
1/150	90±0,6

L'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène à faibles concentrations résulte des dommages oxydatifs destructeurs de la membrane cytoplasmique suite à la peroxydation lipidique des AGPI présents dans celle-ci **(Singh et Rajini, 2008).** Lorsque le H_2O_2 traverse cette membrane, il peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine ainsi les ions Fe^{2+}, ce qui génère le radical hydroxyle qui est très réactif par la réaction de Fenton. Ces deux radicaux induisent une chaine de peroxydation lipidique aboutissant à la lyse des érythrocytes

(**Okoko et Ere, 2012)**. Par contre, à des fortes concentrations le taux d'hémolyse diminue, ce qui peut être lié à l'insolubilité de l'hémoglobine suite à sa polymérisation et à l'agrégation des érythrocytes **(Masuoka et *al*., 2006)**.

D'après les résultats illustrés dans la **Figure 14** l'activité anti-hémolytique , $p<0,05$, la forte significativité en terme d'IC50 a été obtenue pour l'extrait de la graine IC50=499±3,56µg/ml, qui est inversement proportionnelle au pouvoir anti-hémolytique de cet extrait, tandis que la faible significativité a été révélé dans les feuilles (IC50=309±4,99µg/ml) avec le meilleur pouvoir anti-hémolytique, nos résultats présentent un pouvoir anti-hémolytique très important en comparant au standard (quercétine), (3,867mg/ml) avec une très forte significativité.

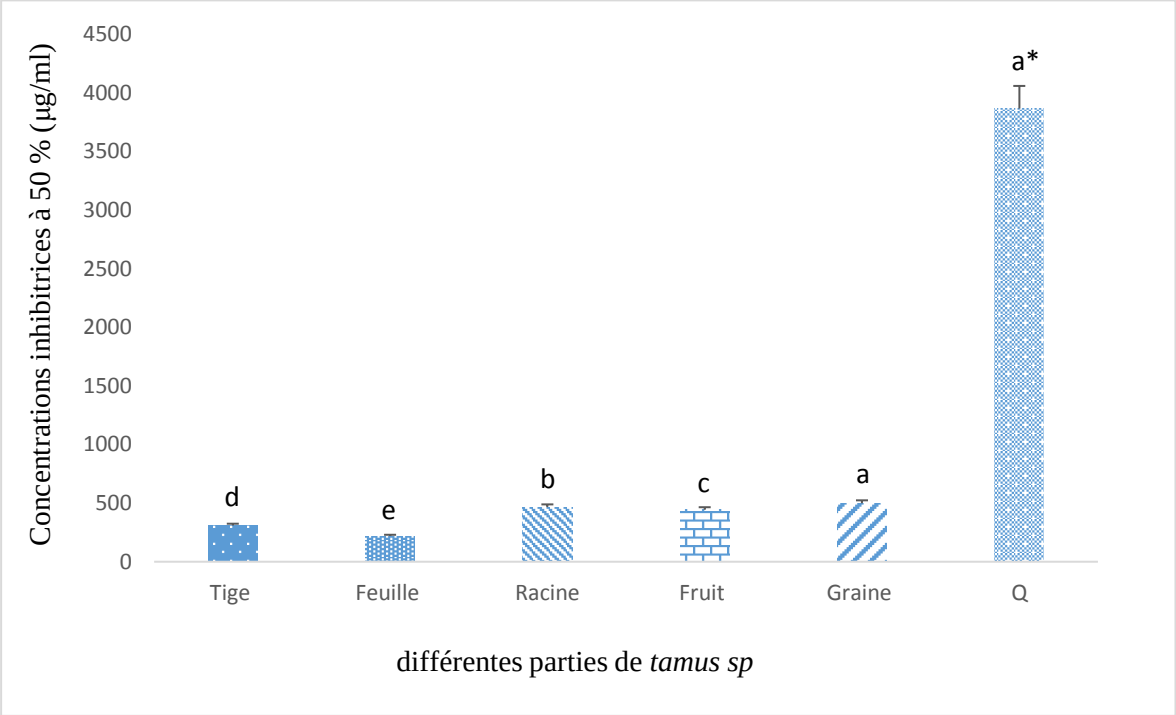


Figure 13 : Effets de différentes parties du Tamus sp sur l'hémolyse induite par le H_2O_2.
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne±ecartype n=3. ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative a à=0,05. a=très hautement significative, b=très significative, c= moyennement significative, d=faible significative, e= très faible significative, a*=très hautement significative correspond au quercitrine (standard).

L'effet puissant des extraits de *Tamus sp* contre l'hémolyse a été montré avec les feuilles (IC50=0,309mg/ml), ces résultats suggèrent que les extraits de la plante ont des effets plus efficaces que le standard (IC50=3,867mg/ml). Ces résultats coïncident avec les résultats

obtenus par **James et Alewo, (2014)** qui ont montré que l'extrait de feuilles de *Gymnema sylvestre* ont une activité anti-hémolytique importante avec une IC50=29,83mg/ml.

L'effet anti-hémolytique peut être attribué aux métabolites secondaires présents dans ces extraits tel que les flavonoïdes et les polyphénols, En effet, plusieurs études ont prouvé que certains des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-radicalaires, en neutralisant ou en piégeant les radicaux libres **(Hatia et *al*., 2014).** De plus, les polyphénols sont connus comme chélateurs de métaux de transition tels que le Fe^{2+}, réduisant ainsi la vitesse de réaction de Fenton. Ils peuvent aussi empêcher les oxydations causées par le radical hydroxyle **(Tsao, 2010)** et empêcher le passage de H_2O_2 à travers la membrane érythrocytaire et la génération des radicaux libres **(Hapner et *al.*, 2010).**

Conclusion

Conclusion

Le monde végétal reste toujours une source importante des principes actifs dotés de diverses propriétés thérapeutiques, le vif objectif de cette étude était l'estimation in *vitro* de l'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des différentes parties de *Tamus sp*.

La présente étude a montré que les différents extraits de différentes parties de *Tamus sp* ont une activité anti-hémolytique contre l'hémolyse induite par de fortes doses d'acide salicylique, l'hémolyse oxydative et l'hémolyse hypotonique par contre, si l'inducteur de lyse est un détergent (Triton X100), les extraits testés n'ont révélés aucune activité anti-hémolytique.

Cette plante peut être une source très importante dans le domaine thérapeutique et pharmacologique comme anti-hémolytique vue que ces extraits ont montré une inhibition d'hémolyse ainsi, le meilleur effet est montré par la feuille avec une IC50=0,20mg/ml contre l'hémolyse induite par l'AS ensuite, par une IC50=0,22mg/ml contre l'hémolyse oxydative (par le H_2O_2), tandis que, contre l'hémolyse hypotonique (induite par le Na Cl) l'extrait de la racine a révélé une IC50=0,63mg/ml. Les résultats obtenus suggèrent que les composants des extraits de *Tamus sp* pourraient être le principal constituant anti-hémolytique. En effet, le dosage des composés polyphénoliques par méthode colorimétrique a montré que les différentes parties de *Tamus sp* contiennent des teneurs importantes en ces métabolites bioactifs, de 3,49±0,43 à 18,83±0,41 mgEqAG/g MS en polyphénols totaux et entre 2,85±0,21 à 32,01±0,70 mgEqQ/g MS en flavonoïdes.

En perspectives, des analyses phytochimiques et biologiques plus détaillés seront nécessaires, en identifiant les principes actifs responsables de l'activité anti-hémolytique par techniques analytiques telles que la HPLC et autres méthodes et en faisant des tests *in vivo* pour étudier la toxicité des composés phénoliques et vérifier les propriétés biologiques de leurs différents composants, évaluer l'activité anti-hémolytique en utilisant des concentrations plus faibles et aussi évaluer d'autres activités biologiques éventuelles.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Ali, D., É, Sacchetto., E, Dumontet., D, carrer., J, Orsonneau., O, Delaroche., E, Bigot-corbel. (2014). Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. Annales de biologie clinique.

Aquino, R., I, Behar., F, De simone., C, Pizza., F,Senatore. (1985). "Phenanthrene derivatives from Tamus communis." Biochemical systematics and ecology **13**(3): 251-252.

Atmani, D., N, Chaher., D, Atmani., M, Berboucha., N, Debbache., H,Boudaoud. (2009). "Flavonoids in human health: from structure to biological activity." Current Nutrition & Food Science **5**(4): 225-237.

Bancarel, J., P, Causse-Le-Dorze., C, Traccard . (2010). "Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase: intérêt du dépistage systématique dans les forces armées." médecine et armées **38**(1): 125-130.

Barascud, Y., J. Guelfi., D, Concordet., O, Dossin., J, Braun. (1988). "La fragilité osmotique des érythrocytes du chien: validation préanalytique et analytique, valeurs usuelles, variations pathologiques.[Erythrocyte osmotic fragility test in dogs: preanalytical and analytical validation, frequent values, variations with diseases.]." Revue Med Vet **149**: 867-874.

Barreira, J. C., E, Pereira, M, Calvalho., C, Santos-Buelga., I, Ferreira. (2013). "Bryonia dioica, Tamus communis and Lonicera periclymenum fruits: characterization in phenolic compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application." Industrial crops and products **49**: 169-176.

Beaumont, C. et F. Canonne-Hergaux (2005). "Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques; régulation par l'hepcidine." Transfusion clinique et biologique **12**(2): 123-130.

Benhammou, N., F, A, Bekkara., T, K, Panovska. (2008). "Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts." African Journal of Pharmacy and Pharmacology **2**(2): 022-028.

béraud, J.(2014). Le techenicien d'analyses biomédicales, 2éme édition, P. 628-650, ISBN: 978-2-7430-1299_1.

Bnouham, M., F, Z, Merhfour.,M, Elachoui., A, Legssyer., D, Lamnaouer., A, Ziyyet. (2006). "Toxic effects of some medicinal plants used in Moroccan traditional medicine." Moroccan J Biol **2**(3): 21-30.

Boulard, B. (2003). "Plants medicinales du monde: réalités et croyances. Paris. PP. 1092 1107.

Boumerfeg, S., A, Baghiani., D, Messaoudi., S, Khennouf., L, Arrar. (2009). "Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of Tamus communis L. root extracts." Phytotherapy Research **23**(2): 283-288.

Caddick, L, R., P, Wilkin., P, J, Rudall., T, A, Hedderson., M, W, Chase. (2002). "Yams reclassified: a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscoreales." Taxon **51**(1): 103-114.

Capasso, F., N, Mascolo., G, Autore., F, De Simone., F, Senatore. (1983). "Anti-inflammatory and analgesic activity in alcoholic extract of Tamus communis L." Journal of ethnopharmacology **8**(3): 321-325.

Chakraborty, D., et B, Shah (2011). "Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **3**(3): 192-199.

Courtois, G., J, Vandekerckhove., M, Dussiot., J, Kersual., S, Coulon., Z, Belaid., Y, Zermati, J, Ribeil., O, Hermine. (2007). "L'érythropoïèse tardive: une mort avortée?" Hématologie **13**(6): 400-408.

D Antuono, L., et A, Lovato (2003). "Germination trials and domestication potential of three native species with edible sprouts: Ruscus aculeatus L., Tamus communis L. and Smilax aspera L." Acta horticulturae: 211-218.

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

Dubost, É.; et A, Dupuis (2011). "La prise en charge des anémies par carence." Actualités pharmaceutiques hospitalières **7**(26): 10-17.

Falleh, H., R, Ksouri., K, Chaieb., N, Bouraoui., N, Trabelsi., M, Boulaaba., C, Abdelly. (2008). "Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities." Comptes Rendus Biologies **331**(5): 372-379.

Federici, L., N, H, Loukili., J, Zimmer., S, Affenberger., F, Maloisel., E, Andrés. (2007). "Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature." La Revue de médecine interne **28**(4): 225-231.

Girasole, M., S, Dinarelli., G, Boumis. (2012). "Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale." Micron **43**(12): 1273-1286.

Guarrera, P, M., et L, M, Lucia (2007). "Ethnobotanical remarks on central and southern Italy." Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **3**(1): 23.

Haddouchi, F., T, Chaouche., N, Halla. (2016). "Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie." Phytothérapie: 1-9.

Hapner, C, D., P, Deuster., Y, Chene. (2010). "Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants." Chemico-Biological Interactions **186**(3): 275-279.

Hatia, S., A. Septembre-Malaterre., F, Le Sage., A, Badiou-Bénéteau., P, Baret., B, Payet ., C, Lefebvre d'hellencourt., M, P, Gonthier. (2014). "Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress." Free radical research **48**(4): 387-401.

Hayat, K., S, Hussain., S, Abbas., U, Farooq., B, Ding., S, Xia., C, Jia., X, Zhang., W, Xia. (2009). "Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro." Separation and Purification Technology **70**(1): 63-70.

Hebbani, A, V., V, D, Reddy., V, Nallanchakravarthula. (2014). "In Vitro Anti-hemolytic Activity of Terminalia arjuna (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract." Ind. J. Adv. Chem. Sci **3**: 02-108.

Houcher, B., D, Naimi., N, Kebir., N, Abbaoui., S, Beggag. (2001). "Effet de l'acide salicylique sur la fragilite osmotique des erythrocytes humains." Sciences & Technologie A(16): 69-72.

James, O., et I, M, Alewo. (2014). "In vitro antihemolytic activity of gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H2O2) induced haemolysis in human erythrocytes." Am. J. Phytomed. Clin. Ther **2**: 861-869.

Jauréguiberry, S. (2015). Rétention et" pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Kovács, A., P, Forgo., I, Zupko., B, Réthy., G, Falkay., P, Szabo., J, Hohman. (2007). "Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from Tamus communis and their cytotoxic activity." Phytochemistry **68**(5): 687-691.

Ksouri, R., W, Megdiche., H, Falleh., N, Trabelsi., M, Boulaaba., A, Smaoui., C, Abdelly. (2008). "Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes." Comptes Rendus Biologies **331**(11): 865-873.

Leger, C, L. (2000). "La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité." Oléagineux, Corps gras, Lipides **7**(3): 258-265.

Lenormand, G. (2001). Elasticité du squelette du globule rouge humain-une étude par pinces optiques, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Leporrier, M. (2008). "Anémies hémolytiques auto-immunes." Hématologie **14**(6): 432-441.

Li, B., B, Smith., M, Hossain. (2006). "Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method." Separation and Purification Technology **48**(2): 189-196

Louerred, Y., R, Haddi., M, K, Harche. (2016). "Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale Haloxylon scoparium POMEL." Journal of Bioresources Valorization **1**(1): 28.

Manaargadoo-Catin, M., A. Ali-Cherif., J, Poignas., C, Perrin. (2016). "Hemolysis by surfactants—a review." Advances in colloid and interface science **228**: 1-16.

Marchand, A., R, S, Galen., F, V, Lente. (1980). "The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease." Jama **243**(19): 1909-1911.

Masuoka, N., H, Sugiyama., N, Ishibashi., D, Wang., T, Masuaka., H, Kodama., T, Nakano. (2006). "Characterization of Acatalasemic Erythrocytes Treated with Low and High Dose Hydrogen Peroxide HEMOLYSIS AND AGGREGATION." Journal of Biological Chemistry **281**(31): 21728-21734.

Mateus, N., E, Carvalho., A, R ,F, Carvalho., A, Melo., A, M, Gonzalez-Paramas., C, Santos-buelga, A, M, S, Silva., V, Freitas. (2003). "Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin− vinyl− flavanol pigments occurring in aging red wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(1): 277-282.

Mezzou, H., A, B, Khelifa., F, Neffati., W, Douki., A, Ben Amor., M, F, Najjar. (2006). "Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de lhemolyse en biochimie clinique." Revue Francophone des Laboratoires **2006**(386): 59-64.

Mueller-Harvey, I. (2001). "Analysis of hydrolysable tannins." Animal feed science and technology **91**(1-2): 3-20.

Muthu, S., et B, Duraira (2015). "Inhibitory effect of hydroethanolic extracts of Annona muricata on human platelet aggregation and hemolysis in vitro." Int J Pharm Pharm Res **2**: 207-213.

Nabavi, S, F., S, M, Nabavi., W, Setzer., S, A, Nabavi., S, A, Nabavi., M, A, Ebrahimzadeh. (2013). "Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits." Fruits **68**(3): 185-193.

Naczk, M et F, Shahidi. (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." Journal of Chromatography A **1054**(1-2): 95-111.

Nelly, A., D, D, Annick., D, Frederic., E, Marc. (2008). "Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon." Journal of ethnopharmacology **120**(3): 315-334.

Okoko, T et D, Ere (2012). "Reduction of hydrogen peroxide–induced erythrocyte damage by Carica papaya leaf extract." Asian Pacific journal of tropical biomedicine **2**(6): 449-453.

Portier, K., N, Kirschvink., N, Fellmann., J, Coudert., P, Leqeux. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. Annales de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.

Preté, P, S., C, C, Domingues., N, C, Meirelles., S, V, Malheiros., F, M, Goni., E, Paula., S , Schreier. (2011). "Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1808**(1): 164-170.

Rahman, H., M, C, Eswaraiah., A, M, Dutta. (2015). "In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of Oryza sativa var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam)." American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences **15**(1): 115-121.

Ranalli, A., S, Contento., L, Lucera., M, Febo., D, Marc., D, Marchegiani., V, Fonzo. (2006). "Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(2): 434-440

Rani, A, A., S, M, J, Punitha., M, Rema. (2014). "Anti-inflammatory activity of flower extract of Cassia auriculata-an in vitro study." Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci. **4**: 57-60.

Shobana, S et R, Vidhya (2016). "Evaluation of In Vitro Hemolytic Activity Of Different Parts of Abutilon indicum (Linn.)." World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **5**(5): 1182-1196.

Singh, N et P, Rajini (2008). "Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage." Chemico-Biological Interactions **173**(2): 97-104.

Spigno, G., L, Tramelli., D, M, Faveri. (2007). "Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics." Journal of food engineering **81**(1): 200-208.

Tsao, R. (2010). "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." Nutrients **2**(12): 1231-1246.

Vuorela, S., H. Salminen., M, Makela., R, Kivikari., M, Karonen., M, Heinonon. (2005). "Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(22): 8492-8497.

Wong, C, C., H, B, Li., W, Cheng., F, Chen. (2006). "A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay." Food chemistry **97**(4): 705-711.

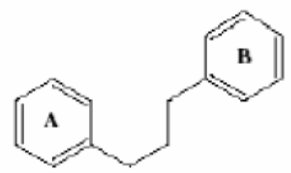
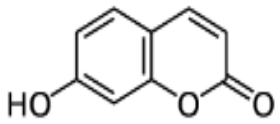
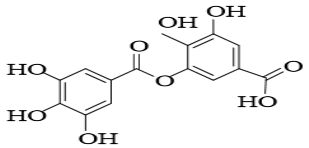
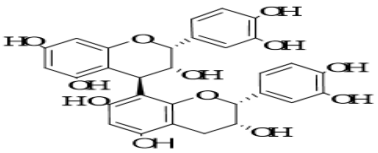
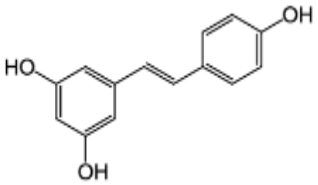
Zerargui, F. (2018). Activité antioxydante des extraits de racines Tamus communis L. et caractérisation des substances bioactives.

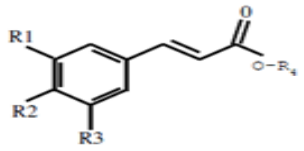
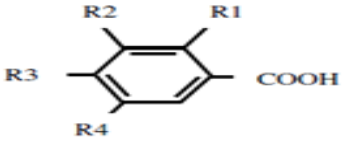
Zinebi, A., H, Eddou., K, M, Moudden., M, Elbaaj. (2017). "Profil étiologique des anémies dans un service de médecine interne." Pan African Medical Journal **26**(1): 1-8.

Zohra, M et A, Fawzia (2014). "Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria." Int J Pharm Sci Research **5**: 8495-8494.

Annexe N° 01

Tableau 02 : Structures chimiques et classification des polyphénols (**Macheix et *al.*, 2006).**

Classes	Sous classes	Exemples	Structures de bases	Références
flavonoïdes	anthocyanidines flavonoles flavones isoflavones flavanols flavanones	Cyanidine Quercétine Apigénine Daidzeine Catéchine Eriodictyol		(Havsteen,2002; Edenharder et Grünhage , 2003 ; Bruneton, 1999).
coumarines	Coumarines simples	l'umbelliférol l'esculétine		(Jain and Joshi, 2012 ; Floc'h et *al.*, 2002 ; Smyth et *al.*, 2009) .
	coumarines complexes	l'angélicine l'impératorine		
tannins	Tannins hydrolysables	gallotanins et ellagitanins		(Cowan, 1999 ; Hartzfeld et *al.*, 2002).
	tannins condensés	tanins catéchiques		
stilbènes		pinosylvine astringine piceatannol		(Scalbert et Williamson, 2000).

acides phénoliques	les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	-acide gallique -acide vanillique -Acide salicylique		(Bruneton , 2008 ; Han et *al.*, 2007 ; Chira et *al.*,2008).
	les dérivés de de l'acide hydroxycinnamique	-acide caffeïque -acide férulique		

Annexe N°02

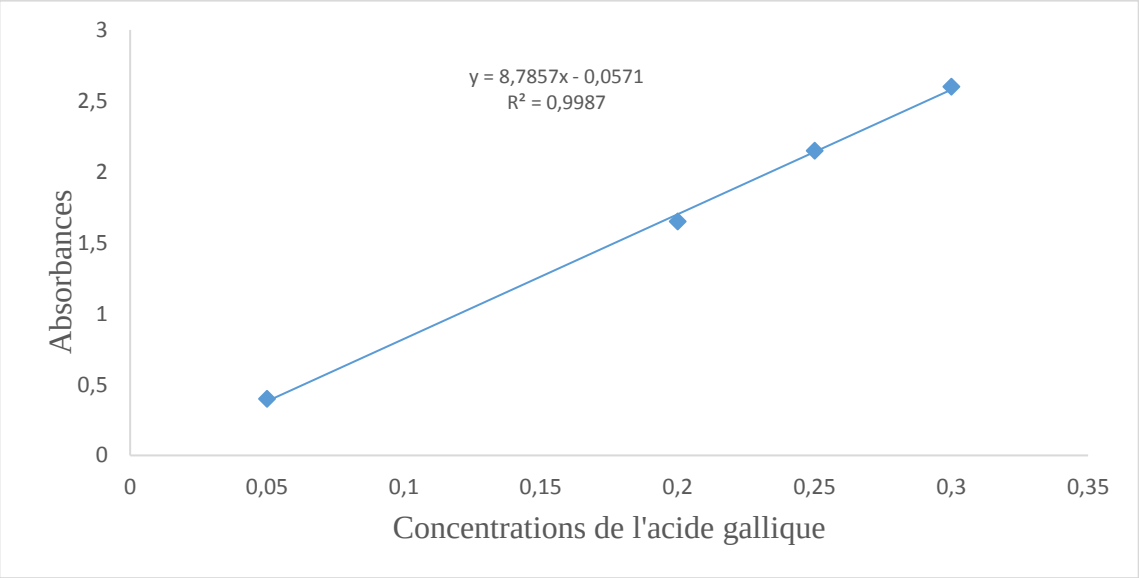


Figure 01 : courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Annexe N°03

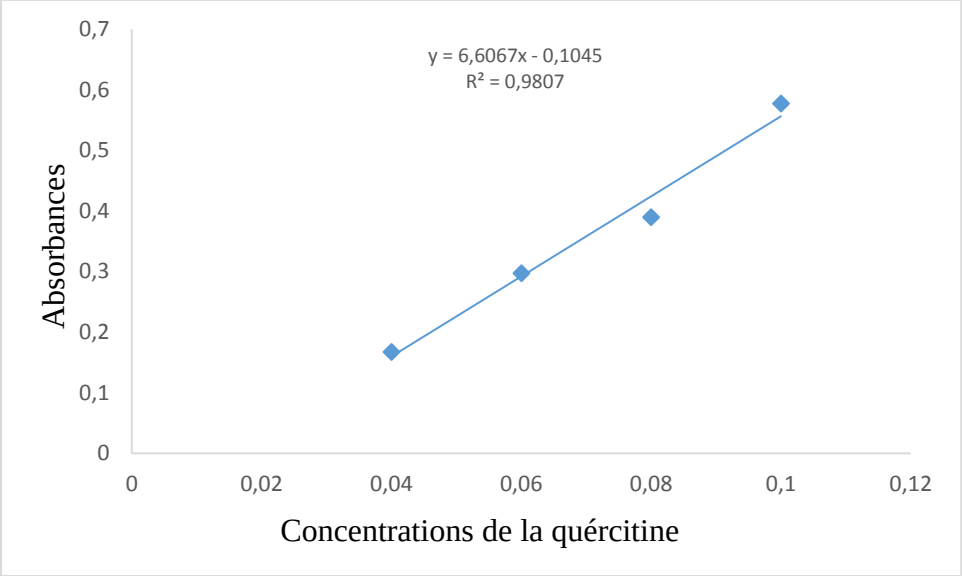


Figure 02 : courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des différentes parties de *Tamus sp* (feuille, tige, racine, fruit, graine) par des tests *in vitro*, les tests d'inhibition de l'hémolyse induite par différents agents (l'AS, Na Cl, H_2O_2 et le TritonX100). Les résultats obtenus ont montré que les extraits de différentes parties de *Tamus* dont les taux en polyphénols totaux entre 3,49±0,44 à 18,83±0,41mgEqAG/g MS et un taux en flavonoïdes qui varie entre 2,85±0,21 et 32,01±0.71mgEqQ/g MS. Le pouvoir inhibiteur de l'hémolyse induite par l'AS est remarqué dans la feuille avec une IC50=0,20±0.01mg/ml, en comparant avec l'acide salicylique isotonique IC50=0.49±0.02mg/ml, et en cas de l'hémolyse hypotonique, l'activité anti-hémolytique est constatée dans la racine avec une IC50=0,63±0,07mg/ml par comparaison avec la quercitrine IC50=4.22±0.02mg/ml et en révélant aussi une activité anti-hémolytique dans le cas de l'hémolyse oxydative (par le H_2O_2) dans la feuille avec une IC50=0,22±0,03 mg/ml comparant aussi avec la quercétine IC50=38.67±0.92mg/ml par contre, aucune activité anti-hémolytique a été constatée avec le TritonX100.

Mots clés : *Tamus sp*, hémolyse, activité anti-hémolytique, polyphénols, flavonoïdes

Abstract

The aim of this study is to evaluate the anti-hemolytic activity of the ethanolic extracts of different parts of *Tamussp* (leaf, stem, root, fruit, seed) by *in vitro* tests, hemolysis inhibition test tests induced by different agents (SA, Na Cl, H_2O_2 and TritonX100). The results obtained showed that the extracts of different parts whose polyphenols enter 3,49±0,44 at 18,83±0,41mgEqAG/G MS and the level in flavonoids wich varies between 2,85±0,21 at 32,01±0,71mgEqQ/g MS. The inhibitory power of SA induced hemolysis is noticed in the leaf with a IC50=0,20±0,012mg/ml, comparing with gallic acid (IC50=0,491±0,02mg/ml) and in case of hypotonic hemolysis, the anti-hemolytic activité is found in the root with a IC50=6,306±0,07mg/ml compared with quercitin IC50= 4,22±0,02mg/ml, also revealing an anti-hemolytic activity in case of oxydative hemolysis (with H_2O_2) in leaf with a IC50=0,22±0,03mg/ml comparing also with quercitin IC50=38,67±0,92mg/ml, on the other hand, any antihemolytic activity was found with TritonX100.

Key words: *Tamus sp*, anti-hémolytic activity, polyphenols, flavonoides.

الملخص

الهدف الرئيسي من هده الدراسة هو تقييم المواد المضادة لانحلال الدم للمستخلصات الايثانولية لجميع أجزاء نبتة Tamus (الورقة، جدع، جدر، فاكهة، بدرة) لدراسات أجريت مخبريا (*vitro In*)لمكافحة انحلال الدم المحرض بمختلف العوامل: حمض الساليسيليك، كلور الصديوم، بيروكسيد الهيدروجيني و التريتونX100

أظهرت النتائج أن مستخلصات جميع أجزاء نبتة Tamus تحتوى على كمية من المركبات الفينولية ما بين 3.49±0.44 إلي 18.83±0.41 ملغ مع مكافئ حمض الغاليك/غ من المادة الجافة، و تحتوي أيضا على المركبات الفلافونيدية ما بين 2.85±0.21 إلي 32.01±0.71 ملغ مع مكافئ حمض الكرستين/غ من المادة الجافة.

النشاط المضاد لانحلال الدم المحرض بحمض الساليسيليك ملاحظ في الأوراق IC_{50}= 0.20±0.01 ملغ/ملل مقارنة بحمض الساليسيليك متساوي التوتر IC_{50}= 0.49±0.02 ملغ/ملل، في حالة ما الانحلال محرض بكلور الصديوم فإن نسبة نشاط مضاد إنحلال الدم ملحوظة في الجدور IC_{50}= 0.63±0.07 ملغ/ملل مقارنة مع الكرستين IC_{50}= 4.22±0.02 ملغ/ملل و نكشف أيضا عن مضاد انحلال الدم باستعمال بيروكسيد الهيدروجيني في الأوراق IC_{50}= 0.22±0.03 ملغ/ملل مقارنة بالكرستين IC_{50}= 38.67 ±0.92 ملغ/ملل، و من ناحية أخرى لم يلاحظ أي نشاط مضاد لإنحلال الدم مع التريتونX100.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضادَ إنحلال الدم ، المركبات الفينولية، المركبات الفلافونيدية ، *Tamus sp*