

*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 : Biologie  
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

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

**MASTER**

***Thème***

Présenté par :

**Recherche des extraits végétaux à activité**

**Anti-hémolytique**

Présenté par : AMRANE Hayet  
BABAHANI Mustafa

Soutenu le : 20/06/2017

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> SLIMANI S.

M<sup>me</sup> BEDJOU Fatiha.

M<sup>me</sup> RAHMANI -BERBOUCHA M.

MAA

Professeur

MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

**Année universitaire : 2016 / 2017**

Depuis l'époque préhistorique, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se parfumer ..., mais également pour se soigner contre les maladies. Les plantes médicinales aromatiques ont une longue histoire associée à l'évolution des civilisations. Partout dans le monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont une place importante en médecine et dans tous les domaines, **(Amarti et al., 2011)**.

L'Algérie, un pays du nord d'Afrique, connu par son climat (méditerranéen, semi-aride) et par la nature de ses sols, dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes aromatiques. Il est connu que la plupart des propriétés des plantes aromatiques sont dues aux polyphénols et aux huiles essentielles qu'elles contiennent comme produits de leur métabolisme secondaire, **(Veesenmeyer et al., 2009; Amarti et al., 2011)**.

Les produits naturels en particulier les huiles essentielles ont une grande utilité dans différents domaines tels que les domaines agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les huiles essentielles sont des substances volatiles, contenues dans de nombreux organes végétaux qui sont liés à diverses fonctions, **(Bakkali et al., 2008)**.

Malgré leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles peuvent aussi provoquer des intoxications sévères. Ceci dépend de la dose utilisée et de la composition de l'huile essentielle, certaines étant plus toxiques que d'autres. Notons également qu'elles traversent aisément les membranes biologiques en raison de leur lipophilie, **(Cuba, 2001)**.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence de groupements phénoliques. Ces composants présentent différentes activités biologiques et pharmaceutiques importantes telles que l'activité anti-inflammatoire, anti-tumorale, anticancéreuse et anti-oxydante dues à la présence de groupements hydroxyle qui ont la capacité d'éliminer les radicaux libres, **(Bougandoura et Bendimerad, 2013)**.

L'objectif de notre travail consiste à :

- Rechercher d'un effet anti hémolytique éventuel des huiles essentielles des plantes :  
*Origanum vulgare, Thymus zygis, Lavandula stoechas, Mentha spicata.*
- Rechercher d'un effet anti hémolytique d'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse.

Cette étude comporte deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur les plantes médicinales, la classification des plantes étudiées et leurs utilisations traditionnelles.
- Le second décrit la partie expérimentale, avec une présentation de la technique d'extraction, des tests anti hémolytiques ainsi que le dosage des polyphénols totaux des pépins de pamplemousse.
- Le troisième est consacré aux résultats qui y sont discutés et confrontés à ceux d'autres auteurs.

## I.1-GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES

### I.1.1-*Origanum vulgare*

#### I.1.1.1-Description botanique

Selon **Stojkovic et al (2013)** *Origanum vulgare* L. (origan) est une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées, elle atteint généralement une taille variant entre 20 et 80 cm. Elle est appelée localement Zateur (Figure 1).

C'est une espèce vivace, ses feuilles sont vertes opposées et ses fleurs sont violettes. Elle est originaire de l'Ouest et Sud-ouest de l'Eurasie et de la région méditerranéenne, (**Quezzel et Santa, 1962**).



**Figure 1:** *Origanum vulgare* (photo originale).

#### I.1.1.2-Taxonomie

D'après **Quezel et Santa (1962)** la systématique d'*Origanum Vulgare* est la suivante :

Règne : Plantae.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées

Genre : Origanum.

Espèce : *Origanum Vulgare*

### **I.1.1.3-Utilisation traditionnelle**

Les plantes de ce genre sont traditionnellement utilisées comme traitement des affections dermatologiques, comme trophiques protecteur dans le traitement des crevasses, dans les affections urinaires, et contre les piqûres d'insectes, (**Bruneton ,1999**).

En cas de rhume, l'origan est utilisé comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et ou pharynx, pour traiter les troubles respiratoires, la dyspepsie, les menstruations douloureuses, l'arthrite rhumatoïde, (**Bruneton., 1999**).

L'origan est couramment utilisé dans les aliments, pour sa saveur et son arôme, en Industrie pharmaceutique et en cosmétique, (**Tucker et Maciarello, 1994**).

### **I.1.2-*Mentha Spicata***

#### **I.1.2.1-Description botanique**

C'est une plante herbacée vivace très odorante appelée en kabyle Nana et en arabe Habaq elma .Elle ne dépasse pas un mètre, elle est glabre et d'une couleur vert sombre. La tige est droite de section quadrangulaire, de couleur verte et d'une hauteur de 60 cm à100 cm, (**Quezel et Santa, 1962**).

Les feuilles sont opposées, elles ont une forme ovale-lancéolée, font 3 à 7 cm de long sur 3 cm de large (Figure 2). L'inflorescence se présente sous forme d'épis florifères, situés à l'aisselle des feuilles, disjoints, grêles, de forme cylindrique et allongés .La fleur est presque régulière ; elle est le plus souvent rougeâtre, (**Quezel et Santa, 1962**).



**Figure 2 :** *Mentha spicata* (photo originale).

### I.1.2.2-Taxonomie

D'après **Quezel et Santa (1962)** la systématique de *Mentha spicata* est la suivante :

Règne : Plantae.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées.

Genre : *Mentha*.

Espèce : *Mentha spicata*.

### I.1.2.3-Utilisation traditionnelle

Selon **Snoussi et al (2015)** *M. Spicata* a été utilisée traditionnellement pendant des siècles Comme plante médicinale pour :

- soigner les affections biliaires, la constipation et les maux de ventre, pour combattre la fièvre et les rhumatismes, (**Boukef, 1986**).
  - les maladies gastro-intestinales et respiratoires, et comme carminatif, antispasmodique, diurétique et agents sédatifs, (**Snoussi et al., 2015**).
- La plante est employée comme aromatisant, pour parfumer le thé, (**Boukef, 1986**).

### I.1.3-*Lavandula Stoechas*

#### I.1.3.1-Description botanique

*Lavandula stoechas* de la famille des Labiées (Lamiacées) est appelée Amezzir en kabyle et Djäida en arabe. C'est un sous-arbrisseau à tiges et feuilles persistantes, atteignant jusqu'à 1 mètre de longueur, de couleur vert pâle, avec des fleurs bleu-violet. (**Quezel et Santa, 1962**)

*L. stoechas* est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches. Ses tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, tendant à être plus vertes que grises, à leur extrémité se trouve une inflorescence terminée par un toupet et de longues bractées violettes (Figure 3) (**Chu et Kemper, 2001**). Elle est largement distribuée dans les Iles canaries, l'Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord ainsi que le Sud-ouest de l'Asie, (**Quezel et Santa, 1962**).



**Figure 3 :** *Lavandula stoechas* (Photo originale).

### **I.1.3.2- Taxonomie**

D'après **Quezel et Santa (1962)**, la systématique de *Lavandula stoechas* est la suivante :

- Règne : Plantae.
- Classe : Eudicots.
- Ordre : Lamiales.
- Famille : Lamiacées.
- Genre : Lavandula.
- Espèce : *Lavandula stoechas* (L).

### **I.1.3.3-Utilisation traditionnelle**

*Lavandula stoechas* L (Lamiacée) est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle comme :

- Anticonvulsivant et antispasmodique, (**Gilani et al., 2000**).
- Comme traitement pour diverses maladies du centre système nerveux, comme l'épilepsie et la migraine, (**Nadkarni, 1982**).
- L'huile essentielle de la lavande est utilisée en parfumerie et la cosmétique, (**Gilani et al., 2000**).

### I.1.4- *Thymus zygis*

#### I.1.4.1-Description botanique

C'est un petit sous-arbrisseau en touffes, vivace et endémique à forte odeur aromatique, appelé en arabe Zaïtra et en kabyle Azoukni (Figure 4). Il possède des petites feuilles, sessiles, coriaces, linéaires, de 6 à 10 mm de long sur 1 mm de large, ciliées à la base. Ses tiges sont dressées, de 10 à 30 cm de hauteur, rougeâtres, ligneuses. Il est caractérisé par une inflorescence courte ou allongée à verticillastres interrompus et distants, (Parkash, 1990).



Figure 4 : *Thymus zygis* (Anonyme 2014).

#### I.1.4.2-Taxonomie

La systématique de *Thymus zygis* est la suivante :

Règne : Plantae.

Classe : Dicotylédones.

Ordre : Tubi florales.

Famille : Lamiacées ou Labiées.

Genre : *Thymus*.

Espèce : *Thymus zygis* (Anonyme 2016).

#### I.1.4.3-Utilisation Traditionnelle

Selon (Cabo et al., 1981 ; Amarti et al., 2011) le Thym est traditionnellement utilisé :

- Pour le traitement des petites plaies après lavage abondant.
- En cas de nez bouché, de rhume.
- Comme antalgique dans les affections bucco pharyngiennes.
- En bain de bouche pour l'hygiène buccale.



## I.1.5-*Citrus Maxima*

### I.1.5.1-Description botanique

*Citrus maxima* est un arbuste aromatique de 5 à 15m de hauteur appartenant à la famille des Rutacées, connu également sous le nom de pamplemousse (Figure 5). Il possède de grandes feuilles persistantes avec une base asymétrique et une odeur caractéristique, des fleurs avec des étamines blanches, les fruits sont gros de couleur jaune pâle et la pulpe de couleur variable allant du cramoisi au rose pâle ou au jaune, (Evans, 1997).



Figure 5 : Fruit du *Citrus maxima* (photo originale).

### I.1.5.2-Taxonomie

D'après Kharjul et al (2012) la systématique d'*Origanum Vulgare* est la suivante :

- Règne : Plantae.
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Sapindales.
- Famille : Rutacées.
- Genre : Citrus.
- Espèce : *Citrus Maxima*

### I.1.5.3-Utilisation Traditionnelle

Selon Dubey et al (2004), les différentes parties de cette plante sont largement utilisées par différentes communautés :

Feuilles : sont utilisées comme un traitement des maladies hémorragiques, de la toux convulsive et aussi en cas d'épilepsie.

Fleur : utilisée comme sédatif en cas d'une affection nerveuse.

Fruits : utilisés contre la lèpre, l'asthme, la toux, l'aberration mentale et les maladies cardiotoniques.

## **I.2-LES METABOLITES SECONDAIRES**

### **I.2.1-Les Huiles Essentielles**

Les huiles essentielles sont des produits naturels de composition assez complexes et volatiles, caractérisées par une forte odeur. Elles sont extraites de diverses plantes aromatiques soit par entraînement à la vapeur soit par hydro distillation, **(Bakkali et al.,2008)**.

Elles sont produites par les glandes sécrétrices qui se trouvent dans toutes les parties de la plante (les feuilles, les fleurs, les graines, les fruits), **(Bakkali et al.,2008)**.

les constituants des HE appartiennent presque exclusivement à deux familles biosynthétiques distinctes : les terpénoïdes (monoterpènes,sésquiterpènes) et les phénylpropanoïdes, **(Bakkali et al.,2008)**.

#### **I.2.1.1Activité biologiques des huiles essentielles**

Les HE obtenues à partir des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité pour leurs activités antibactériennes, antifongiques, et antioxydants, **(Baratta et al., 1998)**.

Certains composés des huiles essentielles tels que les Terpènes ou terpénoïdes, le carvacrol et le thymol sont des composés antimicrobiens **(Schwammle et al., 2001)**. Les HE contiennent des antioxydants comme les composés terpéniques et phénoliques. Cette propriété a été souvent vérifiée *in vitro* par des méthodes physicochimiques, **(Bakkali et al., 2008)**.

Certains composés des huiles essentielles ont une activité antifongique, contre les mycètes phytopathogènes, **(Schwammle et al., 2001)**.

#### **I.2.1.2-Toxicité des huiles essentielles**

En général, les huiles essentielles qui ne sont pas utilisées dans l'aromathérapie présentent des effets neurotoxiques et hépatotoxiques et sont associées au cancer comme l'absinthe, la rue et le camphre, **(Tisserand et Young, 2013)**.

Certaines huiles essentielles provoquent des hypersensibilités en cas d'une utilisation topique particulièrement celles qui sont riches en aldéhydes et en phénols telles que la cannelle de Ceylan, la mélisse et le pin. De plus, l'utilisation de différentes huiles en même temps pendant une longue période peut conduire à des effets cumulatifs, **(Dunning, 2013)**.

D'autres huiles peuvent provoquer des troubles au niveau des muqueuses respiratoires à cause de leur pouvoir irritant, **(Elberling et al., 2007)**.

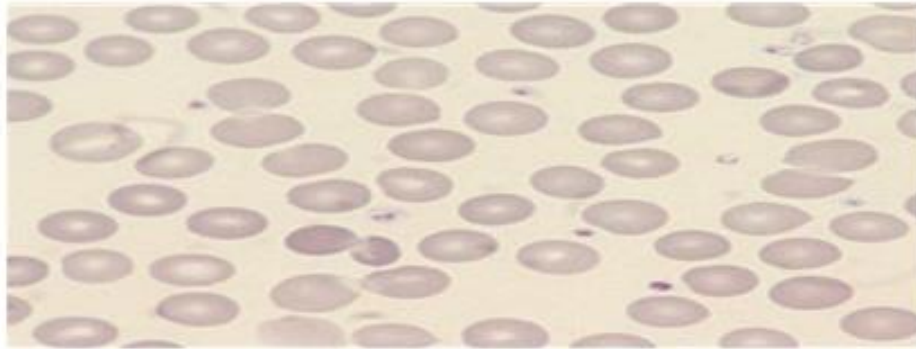
### **I.2.2-Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. La structure de ces composants est caractérisée par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés jusqu'aux tanins complexes de haut poids moléculaire. Ils sont synthétisés selon deux voies : la voie de l'acide shikimique dirigeant, après transamination et désamination aux acides cinnamiques ou cummariques, et à leurs dérivés et la voie de l'acétate qui produit les polyphénols à partir de poly-cétoesters ou polyacétates (malonate). Les polyphénols peuvent être classés selon différents critères tels que la nature de leur squelette carboné, le nombre et l'arrangement des atomes de carbone et la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. Ils sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques, **(Cheynier et al., 1997)**.

## **I.3-L'HEMOLYSE**

### **I.3.1-Les globules rouges**

Les érythrocytes sont des cellules matures ayant une forme biconcave avec un diamètre variant de 6.8 à 7.5  $\mu\text{m}$ . La durée de vie moyenne des hématies est de 120 jours (Figure 6). La forme discoïde du GR favorise l'ancrage du cytosquelette, l'organisation des lipides et les échanges avec le milieu externe. Dans ce type de cellules simplifiées (anucléée) la membrane est le seul composant structural, mais malgré cela son interaction avec le cytosquelette est complexe, **(Mohandas et Gallagher, 2008)**.

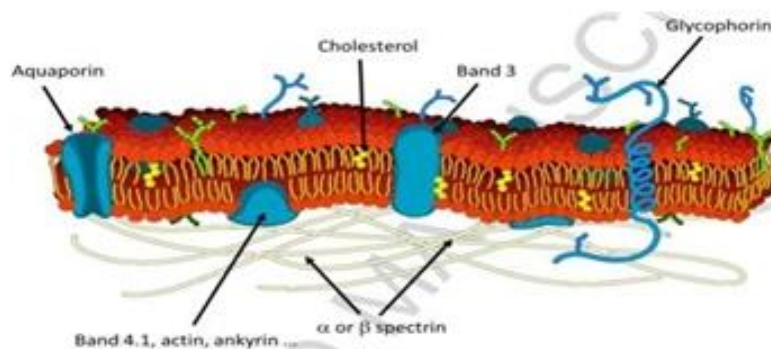


**Figure 6 :** Globules rouges (Bain, 2004).

La membrane plasmique des globules rouges est composée principalement (en poids) de 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides. Les lipides membranaires comportent : les phospholipides (63%), les cholestérols non estérifiés (25%) et les glycosphingolipides qui forment une double couche où les groupements polaires sont orientés vers l'extérieur tandis que les groupements apolaires sont orientés vers l'intérieur (Figure 7), (Dodge *et al.*, 1963).

La cohésion des lipides et des protéines est due à des interactions non covalentes telles que les interactions des Van Der Waals, les liaisons hydrogène, les forces électrostatiques et les liaisons hydrophobes, (Dodge *et al.*, 1963).

La membrane érythrocytaire contient aussi des protéines membranaires qui jouent des rôles importants dans les échanges avec le milieu extérieur tel que les pompes d'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , les protéines de transport des anions, de l'eau et du glucose (Figure 7). Elles jouent aussi un rôle dans la stabilité et l'ancrage des hématies avec le cytosquelette cellulaire grâce à : la protéine bande 3, la Glycophorine A et la Glycophorine C qui forment des interactions avec les protéines intrinsèques, (Elgsaeter *et al.*, 1986).



**Figure 7 :** Structure de la membrane de globules rouges (Manaargadoo-Catin *et al.*, 2016).

### I.3.2-Définition d'hémolyse

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal, **(Thomas, 2013)**.

Cependant, dans certains cas l'hémolyse est exagérée, réduisant la durée de vie des hématies on parle alors d'une hyper hémolyse, **(Ucar, 2002)**.

### I.3.3-Les signes biologiques de l'hémolyse

Généralement, l'hémolyse provoque une augmentation du taux d'hémoglobine, de la lactate déshydrogénase (LDH) et une diminution du taux d'haptoglobine et de l'hémoglobine glycosylé. L'hémoglobine libérée est dégradée en bilirubine, non conjuguée représentant 80% de la bilirubine totale, ou bien forme un complexe avec l'haptoglobine. Ce complexe est éliminé rapidement par le foie, ce qui entraîne des niveaux d'haptoglobine faibles, **(Marchand et al., 1980)**.

L'hémolyse est définie par une couleur rose-rouge détectable lorsque les taux plasmatiques d'hémoglobine dépassent la capacité de liaison à l'haptoglobine (0,3 g / L) et provoque une augmentation de fer dans les urines, **(Wiltink et al., 1972)**.

Cette hémolyse est la cause de pathophysiologies spécifiques telles que les maladies vasculaires aiguës et chroniques, l'inflammation, la thrombose et l'insuffisance rénale. Elle joue un rôle important dans la translocation de l'hémoglobine dans l'espace extravasculaire, les réactions oxydatives, la libération de l'hémine dans la signalisation moléculaire, **(Dominik et al., 2013)**.

## **II.1 MATERIEL VEGETAL**

### **II.1.1- Récolte et identification des plantes**

Les feuilles des plantes utilisées dans cette étude : *Origanum vulgare*, *Mentha spicata* et *Lavandula stoechas* ont été récoltées respectivement dans les régions de : Tala ntagra ,Lbira,Tamrijte (wilaya de Béjaia) au mois de mars 2017.

Le pamplemousse a été récolté dans la région de Souk eltennine.

L'identification botanique des plantes a été réalisée par monsieur Bouaddam, enseignant à l'université de Bejaia.

Les feuilles des plantes fraîchement récoltées, ont été lavées avec l'eau courante afin de les débarrasser des poussières puis séchées à l'ombre dans un endroit aéré.

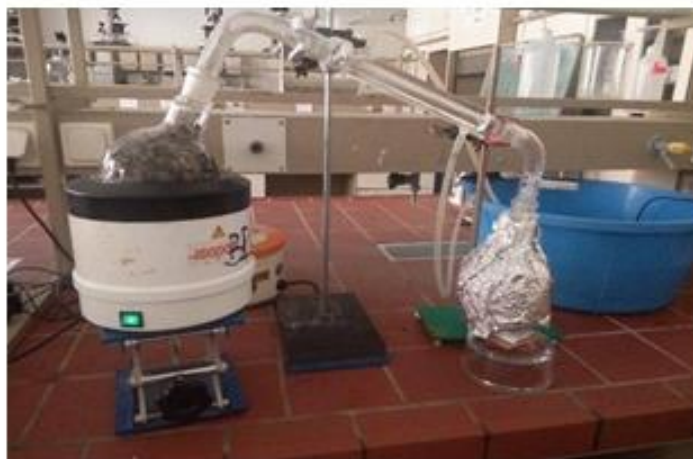
## **II.2. METHODES**

### **II.2.1- Extraction des molécules bioactives**

#### **II.2.1.1 Extractions des huiles essentielles**

##### **➤ Protocol d'extractions**

Les huiles essentielles des plantes ont été obtenues par Hydrodistillation (Figure8) Pour ce faire, 50 g de chaque plante ont été introduits dans un ballon à col rodé contenant 600 ml d'eau de source puis laissées macérer pendant une nuit avant l'extraction. Celle-ci est réalisée grâce à un montage inspiré de celui de Clevenger, composé d'un ballon contenant les feuilles et l'eau de source, un réfrigérant et une ampoule, dans laquelle est récupérée l'huile essentielle qui surnage une phase aqueuse. L'ensemble est soumis à une ébullition pendant environ 2h, et les vapeurs chargées en huile sont récupérées. Après décantation l'huile essentielle est récupérée puis conservée dans des flacons hermétiquement fermés à 4°C, (Msaada *et al.*, 2012).



**Figure 8** : photographie de l'hydrodistillateur (photo originale).

#### ❖ Rendement d'extraction pondérale

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après distillation sur la quantité de la biomasse, exprimé en pourcentage, (Carré, 1953).

➤ Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = M_1 / M_0 * 100$$

Où :

**R (%)** : Rendement de l'huile essentielle en pourcentage.

**M<sub>1</sub>** : masse d'extrait récupéré exprimée en grammes.

**M<sub>0</sub>** : masse du végétal utilisée pour l'extraction exprimée en grammes.

### II.2.1.2- Préparation de l'extrait éthanolique

#### ❖ Protocole d'extraction

L'extraction des polyphénols des pépins de pamplemousse a été réalisée selon le protocole décrit par Fellah et al (2008) :

➤ Les pépins de pamplemousse ont été séchés dans une étuve à 40°C pendant 4 jours.

- Après le séchage, le matériel végétal, destiné à l'extraction des composés phénoliques, a été broyé, à l'aide d'un broyeur électrique, en une poudre fine pour permettre une meilleure extraction.
- 90 g de la poudre de pépins de pamplemousse ont été macérés à température ambiante pendant 48 h avec 100 ml d'une solution d'éthanol à 70 %.
- Le macérât a été filtré à l'aide d'un papier Wathman et le filtrat a été récupéré (pour éliminer les déchets des pépins) (Figure 9).



**Figure 9** : Filtration du macérât (photo originale).

- Le résidu d'éthanol est complètement éliminé par le rota vapor.
- L'extrait de polyphénols a été séché à l'étuve pendant une semaine, à 40°C.

#### ➤ Rendement d'extrait éthanolique

Le rendement en polyphénols est calculé selon la formule suivante (Fellah et al., 2008):

$$R (\%) = M_1 / M_0 * 100$$

Où :

**R (%)** : Rendement de polyphénols en pourcentage.

**M<sub>1</sub>** : masse d'extrait récupéré exprimée en grammes.

**M<sub>0</sub>** : masse du végétal utilisée pour l'extraction exprimée en grammes.

### II.2.2- Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé sur les extraits éthanoliques de pépins de pamplemousse.



### II.2.2.1-Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), oxyde les composés phénoliques ; les oxydes métalliques produits sont de couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. (Ribéreau-Gayon et al., 1982)

### II.2.2.2-Mode opératoire

Le teneur en composés phénoliques est estimé selon la méthode de **Kahkonen et al (1999)**. Un volume de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 0.2 ml d'extrait. Après 3 minutes, 0.8 ml de la solution de carbonate de sodium (7,5 %) sont ajoutés. Après 1 heure d'incubation l'absorbance est lue à 740 nm. La concentration en composés phénoliques des extraits est exprimée en gamme équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche, déterminée en se référant à la droite d'étalonnage.

## II.3- RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE

Les huiles essentielles et l'extrait éthanolique de pépins de pamplemousse ont été réalisés in vitro sur une suspension du sang humain.

### II.3.1-Préparation des Globules rouges

Cinq millilitre de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tour/min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du PBS (0,2 M, pH 7,4) puis remis en suspension dans une solution saline (4%), (Yang et al., 2005).

L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 1000 tour/min (5min) et la suspension du culot dans le PBS, (Yang et al., 2005).

Après la dernière centrifugation, 0.4 ml du culot a été additionné à 9.6 ml de tampon phosphate salin (0,2M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4 %.

### II.3.2-Préparation des extraits des polyphénols

Différentes concentrations de l'extrait de polyphénols totaux (5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml) ont été solubilisés dans le PBS.

### II.3.3-Protocole expérimental

Le test permettant de rechercher un effet anti hémolytique des extraits de plantes étudiées est réalisé selon la méthode de **Yang et al (2005)**.

- Mettre dans des tubes 1 ml de la suspension érythrocytaire préparée avec 0.5 ml de l'huile essentielle (dilué avec le PBS) à différentes concentrations initiales.
- Incuber les tubes à 37°C durant 20 min.
- Ajouter 0,5 ml de solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) dilué avec PBS au mélange réactionnel.
- Centrifuger les tubes à 1000 tour / minute durant 10min.
- Récupérer le surnageant.
- Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible.

L'hémolyse relative a été évaluée en comparaison avec l'hémolyse induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence d'huile essentielle (contrôle négatif). Les globules rouges, en présence de tampon phosphate a été utilisé comme contrôle positif.

Chaque série d'expériences a été effectuée en triplicata et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par les différents extraits a été calculé.

#### • Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante (**Miki et al., 1987**) :

$$\%d'inhibition = (Ac - A_{ex} / Ac) \times 100$$

Où :

**Ac** = Absorbance du contrôle négative.

**A<sub>ex</sub>** = Absorbance d'extrait.

### III.1-RENDEMENT D'EXTRACTION

L'extraction des huiles essentielles à partir des feuilles des plantes sèches a donné les taux les rendements suivants (Tableau I) :

**Tableau I** : Rendements d'extraction des huiles essentielles et d'extrait éthanolique.

Extrait	Nom de l'espèce	Taux d'extraction
Huiles essentielles	<i>Lavandula stoechas</i>	0.95%
	<i>Mentha spicata</i>	0.33%
	<i>Origanum vulgare</i>	2.21%
	<i>Thymus zygis</i>	/
Extrait éthanolique	<i>Citrus maxima</i> (pépins)	8.00 %

- **Remarque**

L'huile essentielle de *Thymus zygis* est une huile commerciale.

Le rendement d'extraction des huiles essentielles et d'extrait éthanolique varie d'une plante à une autre.

D'après les résultats (Tableau I), nous constatons qu'*Origanum vulgare* présente le pourcentage d'extraction le plus élevé (2.21%) ceci est probablement dû à sa richesse en composés volatils. On remarque aussi que le rendement en huile essentielle est plus important dans le cas de *Lavandula stoechas* comparée à *Mentha spicata*.

Dans une autre étude sur la même plante **Vazirian et al (2015)** a constaté que le rendement en huile essentielle d'*Origanum vulgare* provenant de Iran n'était que de 0.5 %.

En revanche, *Lavandula stoechas* a donné un pourcentage d'extraction de 0,95 %. **Bouzouita et al (2005)** n'ont extrait que 0.77% d'huile essentielle à partir des feuilles de la même espèce provenant de l'ouest de la Turquie.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kofidis et al (2004)**. Ces auteurs ont constaté que le rendement d'huile essentielle de *Mentha spicata*, cultivée en Grèce allait de 0,1 à 1,8

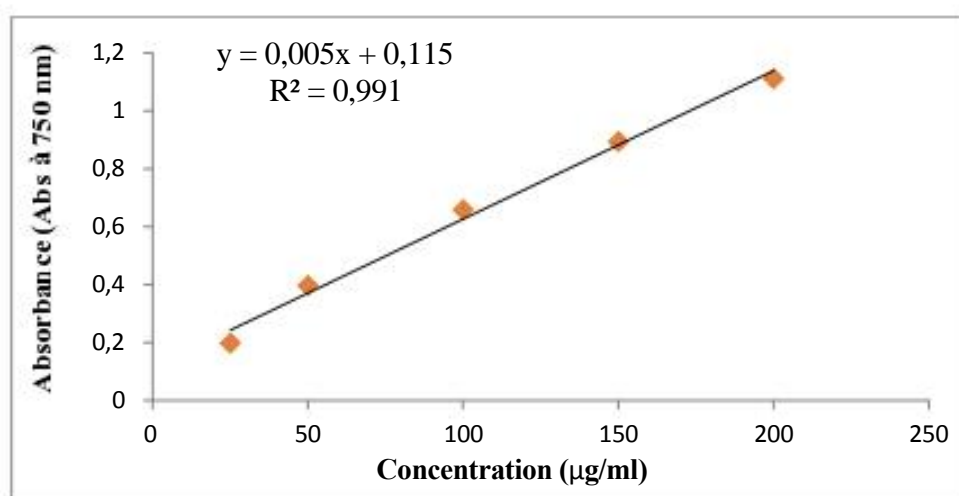
Cependant **Brahmi et al (2016)** dans leurs études sur la même espèce provenant de Béjaïa ont enregistré un rendement de 1,1%. Dans une autre étude sur *Mentha spicata* provenant d'une autre région d'Algérie, en l'occurrence Sétif, **Allali et al (2013)** ont enregistrés un rendement de 1,3%.

**Zinini et al (2011)** ont extrait 0.53% d'huile essentielle à partir des feuilles de la même espèce provenant du sud est du Maroc.

Ainsi, de manière générale les variations des taux d'extraction des huiles essentielles pourraient être dues essentiellement à la période de récolte et l'origine de l'espèce, le taux d'humidité, la période de récolte et le stade de développement de la plante ainsi qu'aux conditions climatiques et de conservation, (**Ross et Sombrero, 1991**).

### III.2-DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX

Les teneurs en phénols totaux des extraits des pépins de pamplemousse, ont été exprimées à partir d'une courbe standard utilisant l'acide gallique comme étalon de référence (Figure 10).



**Figure 10** : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique.

Les taux en composés phénoliques totaux sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique / g d'extrait

Les résultats montrent que la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse est de 1.66 mg EAG/g.

Le teneur de notre extrait est très faible par rapport à celle obtenue par **Al- Anbari et Hasan (2015)** qui a été évaluée à 373.2 mg EAG/g.

La variation du taux de polyphénols peut être due à la diversité des variétés, les conditions climatiques, la maturité et les différents procédés d'extraction tels que le type de solvant, la température et le temps d'extraction, (Popovici *et al.*, 2009).

### III.3-RECHERCHE DE L'EFFET ANTI HEMOLYTIQUE

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine, (Situ et Bobek, 2000).

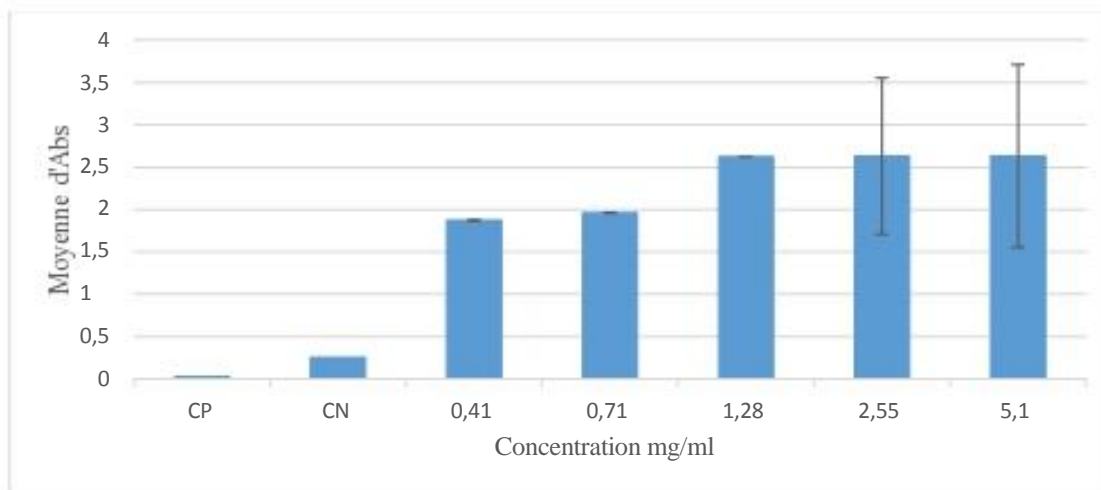
En outre, la présence d'une concentration très élevée d'acides gras polyinsaturés, sur la membrane et le rôle de transport d'oxygène joué par les molécules d'hémoglobine, rend les érythrocytes une cible privilégiée des radicaux libres, (Situ et Bobek, 2000).

L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse. (Tiwari *et al.*, 2011).

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce oxygénée réactive très utilisée dans les tests d'évaluation de l'activité anti-hémolytique. Il provoque la dégradation de la membrane cellulaire des hématies en libérant le contenu cytoplasmique et particulièrement l'hémoglobine. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimule la production du radical hydroxyle en mobilisant le Fe<sup>2+</sup> grâce à la réaction de Fenton. (KupierGoodman et Scott, 1989)

#### III.3.1-Effet de l'huile essentielle d'*Origanum Vulgare* sur les globules rouges

La figure 11 représente l'évolution de l'effet hémolytique en présence de différentes concentrations d'huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, comparée à un tube témoin négatif contenant des globules rouges en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puissant oxydant provoquant la perturbation de la structure membranaire cellulaire, et un témoin positif contenant des hématies intactes (en présence de PBS).



**Figure 11:** L'évolution du taux d'hémolyse en présence des différentes concentrations d'huile essentielle d'*Origanum Vulgare* (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm).

CP : Contrôle positif ; CN : Contrôle Négatif.

D'après les résultats obtenus, l'huile essentielle d'*origanum vulgare* induit une hémolyse intense comparée au peroxyde d'hydrogène. Celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'huile essentielle utilisée au cours du test.

Il est intéressant de remarquer que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration d'HE. Ainsi, ces absorbances sont beaucoup plus élevées à l'absorbance du contrôle négatif (0.256) (Figure 11).

L'activité hémolytique de l'huile d'*origanum vulgare* peut être expliquée par la présence de thymol et de carvacrol dans leur composition chimique. Ces composés interagissent avec les acides gras polyinsaturés provoquant une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges et une fuite des composants intra cytoplasmiques, (Di Pasqua et al., 2007 ; Gong et al., 2014).

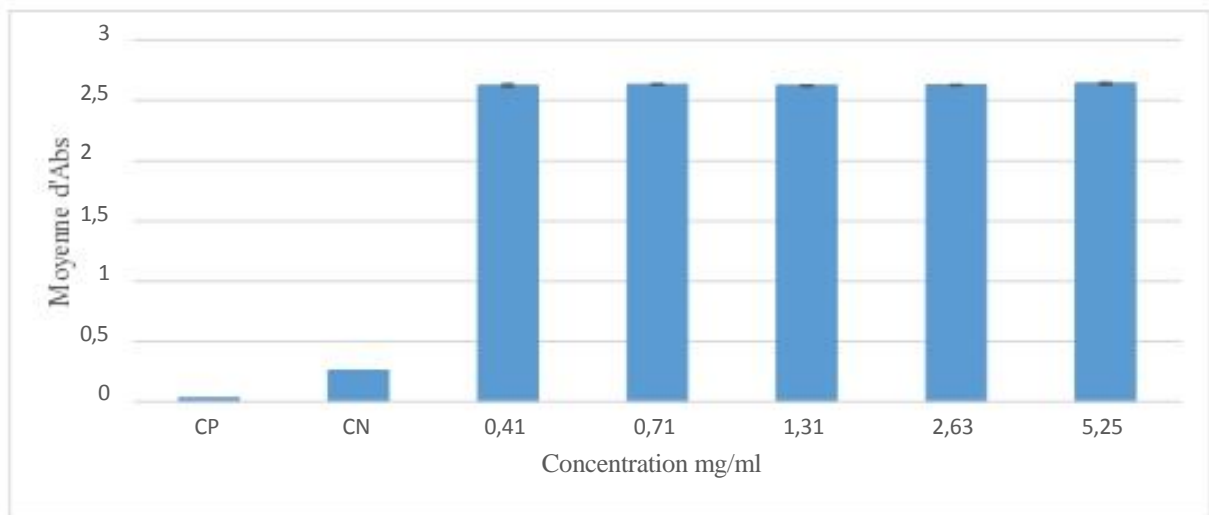
Dans une autre étude réalisée sur la même espèce, Gill et Holley (2006) ont constaté que l'HE d'*Origanum vulgare* possède une activité inhibitrice de l'ATPase qui induit la dissipation de la force proton-motrice, touchant le fonctionnement de la cellule.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Scandorieiro et al (2016) qui ont montré un effet hémolytique des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* en fonction de la dose (9.54-0.595mg /ml).

**Misharina et al (2014)** ont enregistré des taux d'hémolyse de 85% des globules rouges traités par les huiles essentielles d'*Origanum vulgare*. Cette étude vient confirmer l'effet hémolytique d'*Origanum vulgare*.

### III.3.2-Effet de l'huile essentielle de *Thymus zygis* sur les globules rouges

La figure 12 représente l'évolution de l'effet hémolytique en présence de différentes concentrations d'huile essentielle de *Thymus Zygis* comparée au témoin négatif contenant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et un de témoin positif contenant du tampon PBS.



**Figure 12** : Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations d'huiles essentielles de *Thymus zygis* (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm).

CP : Contrôle positif ; CN : Contrôle Négatif.

D'après les résultats obtenus l'huile de *Thymus zygis* présente une activité hémolytique très importante, quel que soit la concentration utilisée, puisque cet effet est observé à de très faibles taux en cette huile essentielle.

La toxicité d'une huile essentielle dépend de sa concentration, ceci a été confirmé par **Réginaldo et al (2016)** dans leur étude, réalisée sur l'huile essentielle de *Thymus vulgare*, plante appartenant au même genre que *Thymus zygis*. Ils ont enregistré un taux d'hémolyse de 0.7% à une concentration très faible (4.096 µg /ml). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par ces auteurs puisqu'on obtient des taux d'hémolyse élevés dès

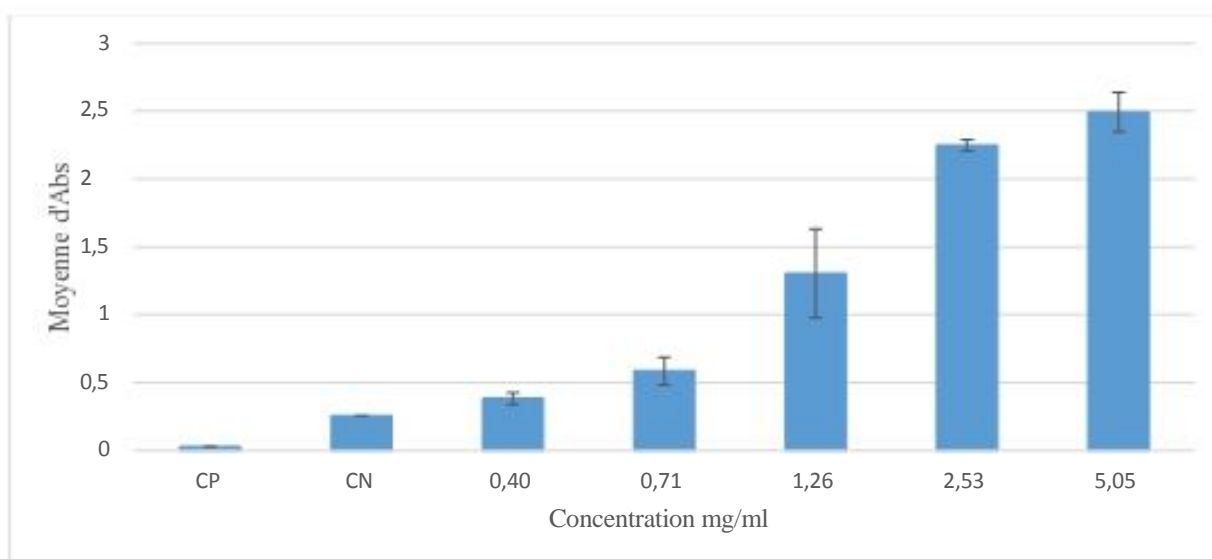
les premières concentrations utilisées (figure 12). Par contre, nos résultats sont différents de ceux de **Pinto et al (2014)** qui ont montré que l'huile essentielle de *Thymus caespitius* présente une faible activité hémolytique (4.9%) à une concentration de 2.5 mg/ml

L'activité hémolytique de l'huile essentielle, des plantes appartenant au genre *Thymus*, peut être expliquée par la présence de thymol (78%) ainsi que des composés terpéniques qui induisent le gonflement et l'éclatement de la membrane, l'inhibition des enzymes respiratoires et une modification de la fonction de la pompe ATPase en provoquant une dissipation partielle du gradient de pH, (**Sikkema et al., 1994**).

Selon **Manabe et al (1987)**, le thymol a une grande capacité à provoquer une lyse de la membrane dans les érythrocytes et les hépatocytes.

### III.3.3-Effet de l'huile essentielle de *Lavandula Stoechas* sur les globules rouges

La figure 13 représente l'évolution de l'effet hémolytique en présence de différentes concentrations d'huile essentielle de *Lavandula Stoechas* comparée à un tube témoin négatif contenant des globules rouges en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puissant oxydant provoquant la perturbation de la structure membranaire cellulaire, et un témoin positif contenant des hématies intactes (en présence de PBS).



**Figure 13** : Evolution du taux d'hémolyse en présence des différentes concentrations d'huile essentielle de *Lavandula Stoechas* (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm).



Les résultats obtenus montrent que les taux d'hémolyse sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations d'huile essentielle de *L. stoechas*. La moyenne d'absorbance varie entre 2.493 et 0.383.

Nous avons enregistré des faibles absorbances qui ne dépassent pas 0.587 en présence des concentrations inférieures à 1 mg/ml. Par contre, nous avons noté une augmentation importante de l'absorbance pour les concentrations supérieures à 1 mg/ml.

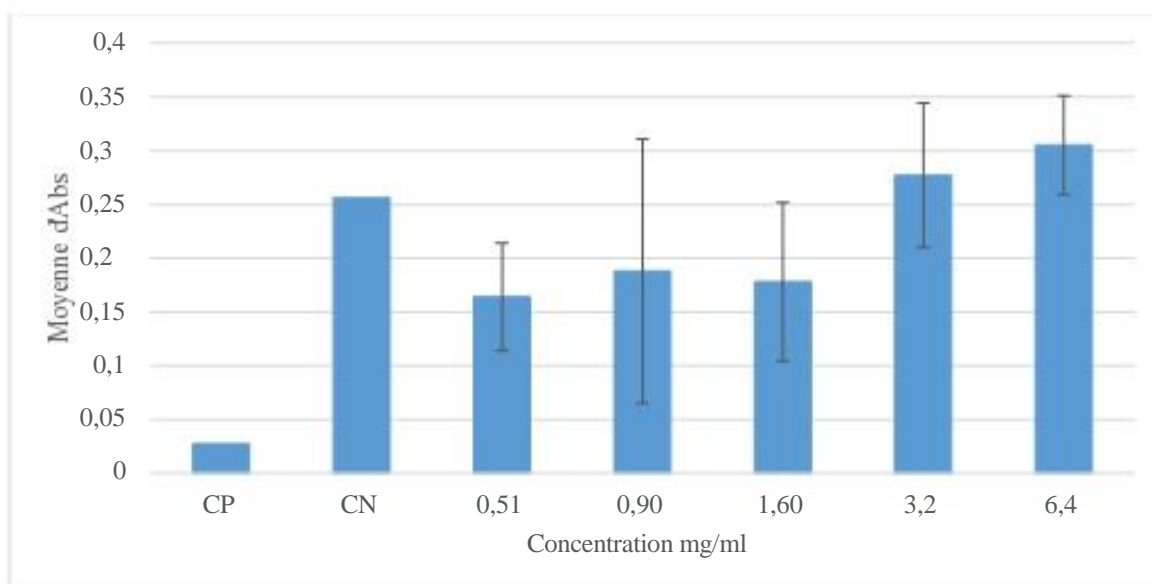
Selon **Dob et al (2006)**, la caractéristique principale de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* est sa grande richesse en composants terpéniques tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes qui représentent 73% de sa composition. Ces constituants sont reconnus pour leur effet hémolytique lorsqu'ils sont présents à forte concentration, en induisant une lyse cellulaire par l'augmentation de la fluidité de la membrane. De plus, les composés terpéniques pourraient déclencher divers mécanismes, y compris les interactions avec la membrane cellulaire, qui surviennent lors de l'hémolyse induite par les terpènes, (**Mendanha et al., 2013**).

Ces résultats sont en accord avec les recherches de **Prashar et al (2004)** qui ont noté que la cytotoxicité de l'acétate de linalyle et linalool, deux composants majoritaires de l'huile de *Lavandula angustifolia*, était plus élevée que celle de l'huile elle-même. Ces composés peuvent entraîner des dommages au niveau de la membrane cellulaire.

Vu que les saponines sont des composants terpéniques, l'effet hémolytique de cette plante peut être expliqué, aussi par la présence de ces molécules, qui ont la capacité d'induire la formation de pores à travers les membranes cellulaires, entraînant l'hémolyse et la libération de l'hémoglobine dans le plasma, (**Makkar et Becker, 1997**).

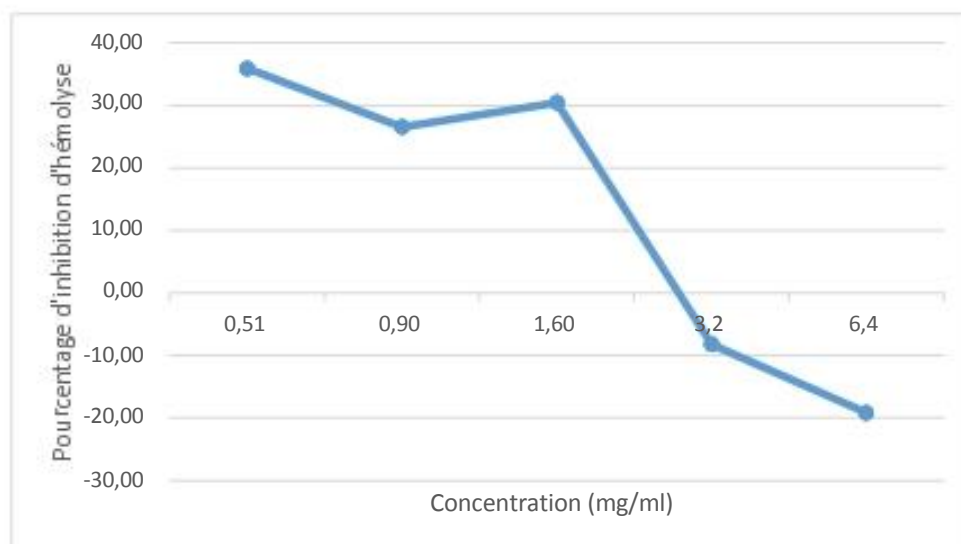
### **III.3.4-Effet de l'huile essentielle de *Mentha spicata* sur les globules rouges**

Les figures 14 et 15 représentent l'évolution de l'effet anti hémolytique par absorbance et en pourcentage en présence de différentes concentrations d'huile essentielle de *Mentha spicata* comparée à un témoin négatif contenant des globules rouges en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puissant oxydant provoquant la perturbation de la structure membranaire cellulaire, et un témoin positif contenant des hématies intactes (en présence de PBS).



**Figure 14** : Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations d'huile essentielle de *Mentha spicata* (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm).

D'après les résultats présentés dans la figure 14, nous constatons que les faibles concentrations d'huile essentielle de *Mentha spicata* (0,51 ; 0,90 ; 1,60 mg/ml) ont une faible moyenne d'absorbance en comparaison avec celle du contrôle négatif.



**Figure 15** : Evolution du taux d'inhibition de l'hémolyse (%) par l'huile essentielle de *Mentha spicata*.

D'après la figure, Nous avons enregistré des taux d'inhibition de l'hémolyse (49.53%, 26.56%, 30.47%) pour les faibles concentrations d'huile essentielle de Mentha

Spicata 1.60, 0.90 et 0.51 mg/ml respectivement. Au fur et à mesure que les concentrations augmentent, on constate l'installation d'un effet hémolytique (Figure 15).

On remarque que l'huile essentielle de *Mentha spicata* présente une double activité hémolytique et anti-hémolytique tout dépend de sa concentration, ce qui confirme que les huiles essentielles peuvent présenter des effets thérapeutique et nocives en même temps.

On peut remarquer que l'huile essentielle de *M.spicata* a un effet anti hémolytique maximale à la concentration de 0.51 mg/ml (35.94%).

L'activité hémolytique peut être due à des concentrations élevées d'huile essentielle de *M.spicata* (>3 mg/ml). Ce résultat se rapproche des travaux réalisés par **Silva et al (2017)** sur l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et *Mentha viridis*, des plantes appartenant au même genre que *Mentha spicata*. Ils ont enregistré des taux significatifs de l'activité hémolytique (100% et 83%) à partir d'une concentration de 1 mg/ml et 0.6 mg/ml pour les huiles essentielles de *M.viridis* et *M. pulegium* respectivement.

La richesse de l'huile essentielle de *Mentha spicata* en carvone, composant majoritaire, peut expliquer son effet hémolytique car cette molécule peut causer des lésions cellulaires de manière dose dépendante, en perturbant la membrane érythrocytaire, (**Mendanha et al., 2013**).

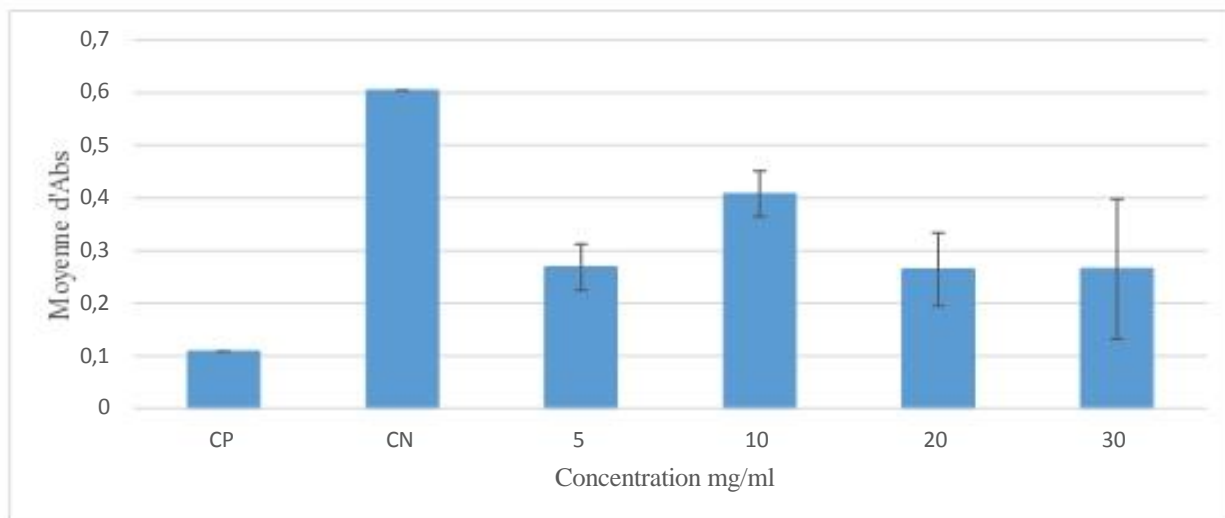
Par contre, l'activité anti hémolytique est probablement due à la présence d'une faible quantité de composés terpéniques qui, à faibles concentrations jouent un rôle anti hémolytique. Ces molécules favorisent les interactions avec les protéines et les phospholipides grâce à leurs affinité avec ces derniers ce qui entraine un effet protecteur contre les oxydants, (**Silva et al., 2017**).

Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par **Brahmi et al (2016)** qui ont montrés que l'huile de *Mentha Spicata* peut traverser la membrane plasmique pour réduire les dommages causés par l'attachement des molécules oxydantes telle que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les globules rouges à une concentration de 50 µg/ml.

### III.3.5-Effet de l'extrait de Pamplemousse sur les globules rouges

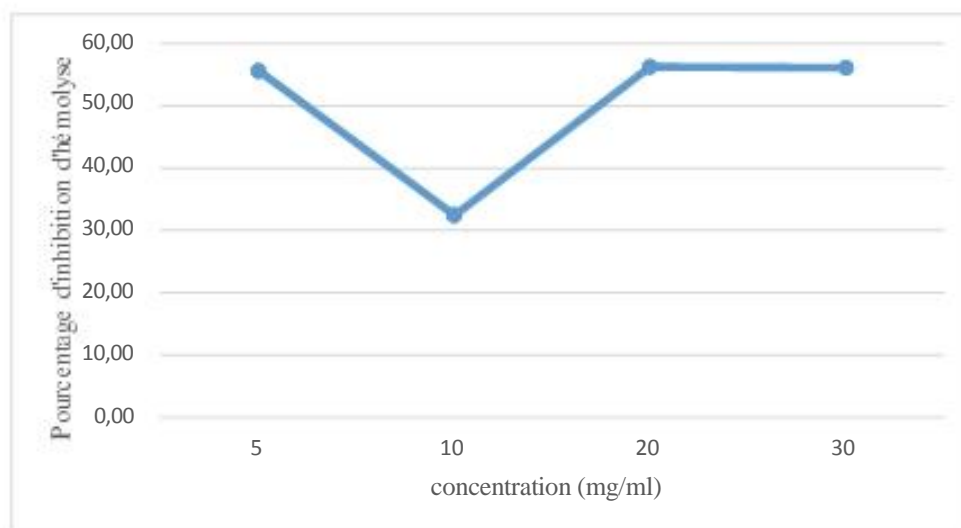
Les figures 16 et 17 représentent l'évolution de l'effet anti hémolytique par absorbance et en pourcentage en présence de différentes concentrations d'extraits éthanolique de pépins de pamplemousse (5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml et 30mg/ml)

comparée au témoin négatif contenant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et un tube de témoin positif contenant une solution de PBS.



**Figure 16** : Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm).

D'après la figure 16, les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des pépins du pamplemousse présentent des faibles absorbances en comparaison à l'absorbance de contrôle négative



**Figure 17** : Evolution du taux d'inhibition de l'hémolyse (%) de différentes concentrations de l'extrait des pépins de pamplemousse.

Nous avons remarqués que les différentes concentrations de l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse ont exercés une activité inhibitrice importante. Le taux le plus élevé

est retrouvé pour la concentration de 20 mg/ml alors que le plus faible taux est enregistré à la concentration de 10 mg/ml.

Les extraits éthanoliques des pépins de pamplemousse présentent un effet inhibiteur important contre l'hémolyse provoqué par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allant de 32% à 56.37 %. Cette activité inhibitrice ne dépend pas de la dose de ces extraits (Figure 17).

**Abirami et al (2014)** dans leur étude sur l'activité anti-hémolytique du jus des fruits de *C.maxima* ont signalé un pourcentage d'inhibition de l'hémolyse très élevée (92.03%).

Les principales flavanones de *Citrus maxima* sont la néohesperidine et la naringine, qui sont plus élevées dans les pépins en comparaison avec les fruits. Certaines recherches ont montré que l'extrait de *citrus maxima* présente une activité antioxydants importante ce qui pourrait expliquer l'effet protecteur de notre extrait éthanolique des pépins de pamplemousse, (**Chung et al., 2000 ; Lim et al., 2006**).

Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Singh et al (2016)** qui ont montré que le naringine peut réduire au maximum l'hémolyse qu'induite par les nanoparticules d'or (AuNPs.) et améliorer les activités enzymatiques antioxydants érythrocytaires.

Les recherches de **Asad et al(2014)** Montrent que l'extrait méthanolique de *Citrus limon* (L) présente une activité anti hémolytique à des concentrations supérieures à 160 µg /ml.

De plus, **Ramful et al (2010)** ont noté que l'extrait de fruits de tangorre et tangelo peuvent inhiber l'hémolyse induite par les radicaux libres.

L'effet des huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Lavandula stoechas* et *Mentha spicata* et de l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse a été mis en évidence sur des globules rouges humains, traités avec un agent oxydant : le(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Les résultats de l'extraction des huiles essentielles, à partir des feuilles des trois plantes étudiées, ont clairement montré qu'*Origanum vulgare* possède un rendement élevé (2.21%) en composés volatiles, par rapport à *Lavandula stoechas* (0.95%) et *Mentha spicata* (0.33%). Alors que les résultats du dosage des composés phénoliques totaux à partir des pépins de pamplemousse ont montré qu'ils possèdent une teneur de 8% en composés phénoliques.

Les composés bioactifs contenus dans l'huile essentielle de *Mentha spicata* et dans l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse ont montré une inhibition de l'hémolyse. Par contre les huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, *Thymus zygis* et de *Lavandula stoechas* ont provoqué une hémolyse importante, en comparaison avec le contrôle négatif.

La présente étude nous permet de conclure que l'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ses effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer son utilisation traditionnelle non contrôlée. De ce fait, les résultats de notre travail méritent d'être affinés et pour cela il serait intéressant :

- D'identifier les principes actifs responsables de l'activité anti hémolytique et hémolytique par des techniques analytiques telles que l'HPLC pour les composés phénoliques et la GC-MS pour les huiles essentielles.,
- De faire des tests in vivo pour étudier la toxicité des huiles essentielles et vérifier les propriétés biologiques de leurs différents composants.,
- Evaluer l'activité anti hémolytique en utilisant des concentrations plus faibles.,
- Evaluer d'autres activités biologiques éventuelles.

- ❖ **Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2014).** In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from Citrus hystrix and C. maxima fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16-25.
  
- ❖ **Allali, H., Chikhi, I., Dib, M. E. A., Muselli, A., Fekih, N., Meliani, N., Kamal, M.A., Tabti, B., Costa, J. (2013).** Antioxidant activity and chemical analysis of Mentha spicata cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation. *Natural Products: An Indian Journal*, 9(6), 258-263.
  
- ❖ **Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de Thymus zygis du Maroc. *Phytothérapie*, 9(3), 149-157.
  
- ❖ **Anonyme (2016).** tela botanica, Avible [online] from: <http://www.tela-botanica.org>. 15/04/2017
  
- ❖ **Anonyme (2014).** biodiversida dvirtual, Avaible [online] from: <http://www.biodiversidadvirtual.org>. 29/04/2017
  
- ❖ **Asad, M., Sabih, D., Chaudhory, B., Ahmad, I., Hussain, M., Izhar, N., Akmal, A., Shahzad, H., Hussain, I. (2014).** Anti-hemolytic property of local medicinal plant (s) upon Pakistani cobra venom induced hemolysis. *J Anim Plant Sci*, 24, 1701-1708.
  
- ❖ **Al- Anbari, A.K., & Hasan, M.A. (2015).** Antioxidant Activity in Some Citrus Leaves and Seeds Ethanolic Extracts. *International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences*, 93-97.
  
- ❖ **Bain, J.B. (2004).** A Beginner's Guide to Blood Cells. 2ème Ed, Blackwell Publishing Ltd, London, 3.
  
- ❖ **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Baratta, M. T., Dorman, H., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998).** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.
- ❖ **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*(9), 14.
- ❖ **Boukef, K. (1986).** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris Lemordant D (1977) *Plantes utiles et toxiques de Tunisie. Fitoterapia*, 18, 191-214.
- ❖ **Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M., Aissa, R. B., Zgoulli, S., Tonart, P., Carlier, A., Marlier, M., Lognay, G. (2005).** Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 584-586.
- ❖ **Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Falconieri, D., Yalaoui-Guellal, D., Madani, K., & Chibane, M. (2016).** Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 28(3), 211-220.
- ❖ **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris.
- ❖ **Cabo, J., Jimenez, J., Revert, A., & Bravo, L. (1981).** Effects of ecological factors (altitude) on the content and composition of essential oils from the sample of *Thymus zygis* L collected in different areas. *Ars Pharm*, 22, 187-194.
- ❖ **Carr↑, P. (1953).** Pr↑cis de technologie et de chimie industrielle: Baillièere & Fils.
- ❖ **Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M. (1997).** Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification: Dossier: *in vino analytica scientia. Analisis*, 25(3), M14-M21.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Chu, C. J., & Kemper, K. J. (2001).** Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force, 32.
- ❖ **Chung, S., Kim, S., Choi, Y., Song, E., & Kim, S. (2000).** Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Industry and Nutrition*, 5, 42-52.
- ❖ **Cuba, R. (2001).** Toxicity myths essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, 11(2), 76-83.
- ❖ **Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007).** Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- ❖ **Dob, T., Dahmane, D., Agli, M., & Chelghoum, C. (2006).** Essential Oil Composition of *Lavandula stoechas*. from Algeria. *Pharmaceutical biology*, 44(1), 60-64.
- ❖ **Dodge, J. T., Mitchell, C., & Hanahan, D. J. (1963).** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 100(1), 119-130.
- ❖ **Dominik J. Schaer, Paul W. Buehler, Abdu I. Alayash, John D. Belcher, and Gregory M. Vercellotti. (2013).** Hemolysis and free hemoglobin revisited exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood Journal*, vol(8),121.
- ❖ **Dubey, N., Kumar, R., & Tripathi, P. (2004).** Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. *Curr Sci*, 86(1), 37-41.
- ❖ **Dunning, T. (2013).** Aromatherapy: overview, safety and quality issues. *OA Altern Med*, 1(1), 6.
- ❖ **Elberling, J., Skov, P., Mosbech, H., Holst, H., Dirksen, A., & Johansen, J. (2007).** Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(11), 1676-1680.
- ❖ **Elgsaeter, A., Stokke, B. T., Mikkelsen, A., & Branton, D. (1986).** The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234(4781), 1217-1223.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Evans, W. (1997).** Trease and Evans Pharmacognosy, Singapore: Hartcourt Brace and Company Asia Pvt: Ltd.
- ❖ **Fellah, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karry-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organ and their biological activities. *Compt. Rend. Biol.* vol(331), 372-379.
- ❖ **Gilani, A., Aziz, N., Khan, M., Shaheen, F., Jabeen, Q., Siddiqui, B., & Herzig, J. (2000).** Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1), 161-167.
- ❖ **Gill, A., & Holley, R. (2006).** Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 111(2), 170-174.
- ❖ **Gong, H., Liu, W., Lv, G., & Zhou, X. (2014).** Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(1), 25-32.
- ❖ **Köhlk<sup>o</sup>nen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999).** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- ❖ **Kharjul, A., Kharjul, M., Vilegave, K., Chandankar, P., & Gadiya, M. (2012).** Pharmacognostic investigation on leaves of *Citrus maxima* (Burm.) Merr.(Rutaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(12), 4913.
- ❖ **Kofidis, G., Bosabalidis, A., & Kokkini, S. (2004).** Seasonal variation of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 469-472.
- ❖ **Kuiper-Goodman, T., & Scott, P. (1989).** Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2(3), 179-248.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Lim, H.-K., Yoo, E.-S., Moon, J.-Y., Jeon, Y.-J., & Cho, S. (2006).** Antioxidant activity of extracts from Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) fruits produced in Jeju Island. *Food Science and Biotechnology*.
- ❖ **Makkar, H., & Becker, K. (1997).** Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 243-245.
- ❖ **Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougnas, J.-L., & Perrin, C. (2016).** Hemolysis by surfactants—A review. *Advances in colloid and interface science*, 228, 1-16.
- ❖ **Manabe, A., Nakayama, S., & Sakamoto, K. (1987).** Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 44(1), 77-84.
- ❖ **Marchand, A., Galen, R. S., & Van Lente, F. (1980).** The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. *Jama*, 243(19), 1909-1911.
- ❖ **Mendanha, S. A., Moura, S. S., Anjos, J. L., Valadares, M. C., & Alonso, A. (2013).** Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 323-329.
- ❖ **Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., & Niki, E. (1987).** Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by  $\alpha$ -tocopherol. *Archives of biochemistry and biophysics*, 258(2), 373-380.
- ❖ **Misharina, T., Fatkullina, L., Alinkina, E., Kozachenko, A., Nagler, L., Medvedeva, I., Goloshchapov, A.N., Burlakova, E. (2014).** Effects of low doses of essential oils on the antioxidant status of the erythrocytes, liver and the brain of mice. *Applied biochemistry and microbiology*, 50(1), 88.
- ❖ **Mohan, C. (2003).** *Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems.*
- ❖ **Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008).** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Msaada, K., Salem, N., Tammar, S., Hammami, M., Jamal Saharkhiz, M., Debiche, N., Limam, F., Marzouk, B. (2012).** Essential oil composition of *Lavandula dentata*, *L. stoechas* and *L. multifida* cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 1030-1039.
- ❖ **Nadkarni, K.M. (1982).** *Indian Materia Medica*, third ed. Popular Prakashan, Bombay, p: 730.
- ❖ **Pinto, E., Gonçalves, M. J., Oliveira, P., Coelho, J., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2014).** Activity of *Thymus caespitosus* essential oil and  $\alpha$ -terpineol against yeasts and filamentous fungi. *Industrial Crops and Products*, 62, 107-112.
- ❖ **Prakash, V. (1990).** *Leafy spices*: CRC Press, Inc.
- ❖ **Prashar, A., Locke, I. C., & Evans, C. S. (2004).** Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 37(3), 221-229.
- ❖ **Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, (4), 25-39.
- ❖ **Quzel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*-v. 1-2.
- ❖ **Ramful, D., Tarnus, E., Rondeau, P., Robert Da Silva, C., Bahorun, T., & Bourdon, E. (2010).** Citrus fruit extracts reduce advanced glycation end products (AGEs)-and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human adipocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(20), 11119-11129.
- ❖ **Reginaldo, T.N., Do Rosário, M., Silva, R., Yano Abrão, F., De Fátima, O., Fernandes, L., Da Silva S, F.M., Hasimoto e Souza, L.K. (2016).** EFFECTS OF THE ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* L. AGAINST *Cryptococcus neoformans*. *Rev Patol Trop*, Vol. 45 (3), 273-284
- ❖ **Ribreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., & Ribreau-Gayon, P. (1982).** *Traité d'oenologie-Sciences et techniques du Vin*, tome 1: Analyse et contrôle des Vins. Dunod. Paris. Francia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ **Romani, A., Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A., & Heimler, D. (2006).** Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 95(2), 221-225.
- ❖ **Ross, J.D., & Sombrero, C.,(1991).** Environmental control of essential oil production in Mediterranean plants. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. 83-94
- ❖ **Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., Andrade, J., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R. K. (2016).** Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Frontiers in microbiology*, 7.
- ❖ **Schwammle, B., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., & Steiner, W. (2001).** Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 341-346.
- ❖ **Sikkema, J., Weber, F. J., Heipieper, H. J., & Bont, J. A. D. (1994).** Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. *Biocatalysis*, 10(1-4), 113-122.
- ❖ **Silva, L. F., das Graças Cardoso, M., Pretinho, P. S. C., Teixeira, M. L., Nelson, D. L., Magalhães, M. L., Ferreira, V.R.F., Souza, R.V., Soares, L.I., Marcussi, S. (2017).** Essential Oils from *Mentha viridis* (L.) L. and *Mentha pulegium* L.: Cytogenotoxic Effects on Human Cells. *American Journal of Plant Sciences*, 8(06), 1423.
- ❖ **Singh, B., Rani, M., Singh, J., Moudgil, L., Sharma, P., Kumar, S., Saini, S.K. Tripathi, Gurinder Singh, D., Kaura, A. (2016).** Identifying the preferred interaction mode of naringin with gold nanoparticles through experimental, DFT and TDFT techniques: insights into their sensing and biological applications. *RSC Advances*, 6(83), 79470-79484.
- ❖ **Situ, H., & Bobek, L. A. (2000).** In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1485-1493.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & De Feo, V. (2015).** *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. *Molecules*, 20(8), 14402-14424.
- ❖ **Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Biljegović, J., & Soković, M. (2013).** Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of biological sciences*, 65(2), 639-643.
- ❖ **Thomas, L. (2013).** Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4.
- ❖ **Tisserand, R., & Young, R. (2013).** *Essential oil safety: a guide for health care professionals*: Elsevier Health Sciences.
- ❖ **Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011).** Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 98-106.
- ❖ **Tucker, A. O., Maciarello, M.J. (1994).** *Oregano: botany, chemistry, and cultivation*. In: CHARLAMBOUS, G.(ed.) *Spices, herbs and edible fungi* Amsterdam, Elsevier Science, 439-456.
- ❖ **Ucar K. (2002).** Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncology*, 16(9 suppl 10):163-70.
- ❖ **Vazirian, M., Mohammadi, M., Farzaei, M., Amin, G., & Amanzadeh, Y. (2015).** Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(1), 41-46.
- ❖ **Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical care medicine*, 37(5), 1777.
- ❖ **Wallerstein, R. O., & Aggeler, P. M. (1964).** Acute hemolytic anemia. *The American journal of medicine*, 37(1), 92-104.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Wiltink, W., Van Eijk, H., Bobeck-Rutsaert, M., Gerbrandy, J., & Leijnse, B. (1972).** Urinary iron excretion in nephrotic syndrome. *Acta haematologica*, 47(5), 269-276.
- ❖ **Yang, Z.-G., Sun, H.-X., & Fang, W.-H. (2005).** Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 23(44), 5196-5203.
- ❖ **Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J., Al-Deyab, S. (2011).** Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *Int. J. Electrochem. Sci*, 6(3), 691-704.

## Résumé

Le but de notre étude est la recherche de l'effet anti hémolytique de certains extraits végétaux. Ceux qui ont été testés sont les huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Lavandula stoechas* et *Mentha spicata* et l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse. L'activité anti hémolytique a été évaluée sur les globules rouges en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), agent oxydant qui perturbe la structure membranaire. Nos résultats montrent l'absence d'un effet anti hémolytique dans les HE de l'*Origanum vulgare*, *Thymus zygis* et *Lavandula stoechas* et la présence de cette activité à des concentrations faibles pour l'huile essentielle de *Mentha spicata* et l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse. Enfin, l'effet des extraits végétaux vis-à-vis des globules rouges dépend de leurs compositions.

**Mots clé :** activité anti hémolytique, huile essentielle, *Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Lavandula stoechas*, *Mentha spicata*, pamplemousse, polyphénols

## Abstract

The aim of our study is the search for the anti-hemolytic effect of certain plant extracts. Those, which have been tested, are the essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Lavandula stoechas* and *Mentha spicata* and the ethanolic extract of the grapefruit seeds. Antihemolytic activity was evaluated on red blood cells in the presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), an oxidizing agent that disrupts the membrane structure. Our results show the absence of an anti-hemolytic effect in the EO of *Origanum vulgare*, *Thymus zygis* and *Lavandula stoechas* and the presence of this activity at low concentrations for the essential oil of *Mentha spicata* and the ethanolic extract of Grapefruit seeds. Finally, the effect of vegetable extracts on red blood cells depends on their composition.

**Key words:** anti-hemolytic activity, Essential oil, *Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Lavandula stoechas*, *Mentha spicata*, grapefruit, polyphenols.

## المخلص

الهدف من دراستنا هو البحث عن وجود مضاد انحلال الدم في بعض المستخلصات النباتية. تم اختبار الزيوت الأساسية لكل من نبات: الزعتر، الزعيرة، الخزامى والنعناع الأخضر ومستخلص الإيثانول من بذور الليمون الهندي. تم تقييم نشاط المضاد الانحلالي للدم على خلايا الدم الحمراء في وجود بيروكسيد الهيدروجين، عامل مؤكسد الذي يتلف بنية الغشاء. أظهرت نتائجنا عدم وجود تأثير مضاد الانحلالي في الزيوت الأساسية لكل من نبات الزعتر، الزعيرة والخزامى ووجود هذا النشاط في تراكيزات منخفضة من زيوت النعناع الأخضر الأساسية وفي مستخلص الإيثانول لبذور الليمون الهندي. أخيراً، تأثير المستخلصات النباتية على الكريات الحمراء تتعلق بمكوناتها الأساسية.

الكلمات المفتاحية: مضاد انحلال الدم، الزيوت الأساسية، الزعتر، الزعيرة، الخزامى، النعناع الأخضر، الليمون الهندي، البوليفينول.



## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Origanum vulgare.....	3
<b>Figure 2 :</b> Mentha spicata .....	4
<b>Figure 3 :</b> Lavandula stoechas .....	6
<b>Figure 4 :</b> Thymus zygis .....	7
<b>Figure 5 :</b> Fruit du Citrus maxima ...	8
<b>Figure 6 :</b> Globules rouges ...	11
<b>Figure 7 :</b> Structure de la membrane de globules rouges...	11
<b>Figure 8 :</b> photographie de l'hydrodisstillateur .....	14
<b>Figure 9 :</b> Filtration du macérât .....	15
<b>Figure 10 :</b> Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique .....	19
<b>Figure 11:</b> L'évolution du taux d'hémolyse en présence des différentes concentrations d'huile essentielle d'Origanum Vulgare (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm. ....	21
<b>Figure 12 :</b> Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations d'huiles essentielles de Thymus zygis (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm) .....	22
<b>Figure 13 :</b> Evolution du taux d'hémolyse en présence des différentes concentrations d'huile essentielle de Lavandula Stoechas (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm .....	23
<b>Figure 14 :</b> Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations d'huile essentielle de Mentha spicata (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm .....	25
<b>Figure 15 :</b> Evolution du taux d'inhibition de l'hémolyse (%) par l'huile essentielle de Mentha spicata ...	25
<b>Figure 16 :</b> Evolution du taux d'hémolyse en présence de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des pépins de pamplemousse (évaluée grâce à l'absorbance à 540 nm) ...	27
<b>Figure 17 :</b> Evolution du taux d'inhibition de l'hémolyse (%) de différentes concentrations de l'extrait des pépins de pamplemousse .....	27

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Rendements d'extraction des huiles essentielles et d'extrait éthanolique.....	20
--	----

## Liste d'abréviations

**ATPase** : Adenosine Tri Phosphatase

**AuNPs**: Gold Nano Particles

**EDTA** : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

**GC-MS**: Gas chromatography-mass spectrometry

**HE** : Huile Essentielle

**HPLC**: High-Performance Liquid Chromatography

**LDH**: Lactate Déshydrogénase

**Nm** : Nano mètre

**SOMMAIRE**

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

**INTRODUCTION.....1**

**CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**I.1-GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES ..... 3**

I.1.1-Origanum vulgare ..... 3

I.1.1.1-Description botanique ..... 3

I.1.1.2-Taxonomie ... ..... 3

I.1.1.3-Utilisation traditionnelle ..... 4

I.1.2-Mentha Spicata ..... 4

I.1.2.1-Description botanique ..... 4

I.1.2.2-Taxonomie ... ..... 5

I.1.2.3-Utilisation traditionnelle ..... 5

I.1.3-Lavandula Stoechas ..... 5

I.1.3.1-Description botanique ..... 5

I.1.3.2- Taxonomie ... ..... 6

I.1.3.3-Utilisation traditionnelle ..... 6

I.1.4-Thymus zygis ..... 7

I.1.4.1-Description botanique ..... 7

I.1.4.2-Taxonomie ... ..... 7

I.1.4.3-Utilisation Traditionnelle ... ..... 7

I.1.5-Citrus Maxima ..... 8

I.1.5.1-Description botanique ..... 8

I.1.5.2-Taxonomie ... ..	8
I.1.5.3-Utilisation Traditionnelle ... ..	8
<b>I.2-LES METABOLITES SECONDAIRES .....</b>	<b>9</b>
I.2.1-Les Huiles Essentielles ... ..	9
I.2.1.1Activité biologiques des huiles essentielles .....	9
I.2.1.2-Toxicité des huiles essentielles ... ..	9
I.2.2-Les composés phénoliques .....	10
<b>I.3-L'HEMOLYSE .....</b>	<b>10</b>
I.3.1-Les globules rouges ... ..	10
I.3.2-Définition d'hémolyse .....	12
I.3.3-Les signes biologiques de l'hémolyse ... ..	12
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>II.1 MATERIEL VEGETAL ... ..</b>	<b>13</b>
II.1.1- Récolte et identification des plantes .....	13
<b>II.2. METHODES .....</b>	<b>13</b>
II.2.1- Extraction des molécules bioactives ... ..	13
II.2.1.1 Extractions des huiles essentielles .....	13
II.2.1.2- Préparation de l'extrait éthanolique ... ..	14
II.2.2- Dosage des composés phénoliques totaux .....	15
II.2.2.1-Principe... ..	16
II.2.2.2-Mode opératoire ... ..	16
<b>II.3- RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE ... ..</b>	<b>16</b>
II.3.1-Préparation des Globules rouges ... ..	16
II.3.2-Préparation des extraits des polyphénols ... ..	17
II.3.3-Protocole expérimental ... ..	17

**CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1-RENDEMENT D EXTRACTION .....</b>	<b>18</b>
<b>III.2-DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX .....</b>	<b>19</b>
<b>III.3-RECHRCHE DE L EFFET ANTI HEMOLYTIQUE .....</b>	<b>20</b>
III.3.1-Effet de l’huile essentielle d’Origanum Vulgare sur les globules rouges .....	20
III.3.2-Effet de l’huile essentielle de Thymus zygis sur les globules rouges ... ..	22
III.3.3-Effet de l’huile essentielle de Lavandula Stoechas sur les globules rouges ... ..	23
III.3.4-Effet de l’huile essentielle de Mentha spicata sur les globules rouges ... ..	24
III.3.5-Effet de l’extrait de Pamplemousse sur les globules rouges ... ..	26
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES... ..</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>GLOSSAIRE</b>	

## Remerciements

*Tout d'abord, louange à « ALLAH » : le tout puissant, le très miséricordieux qui nous a donné la santé, la force, le courage et l'opportunité de mener ce travail à terme.*

*Nos chaleureux remerciements et profonde reconnaissance s'adressent à notre promotrice **Mme BEDJOU Fatiha** pour sa gentillesse, sa bienveillance, ses précieux conseils constructifs et pertinents et sa présence permanente tout au long de la réalisation de notre travail. Nous le remercions ainsi pour ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'elle avait consenties avec beaucoup de sympathie et de patience, ce qui nous a permis de mener à terme ce mémoire.*

*Nos Remerciements également à **Mme SLIMANI** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury qui va juger ce travail.*

*Nous adressons nos remerciements à **Mme RAHMANI**, pour avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Nos hommages également à tous nos Enseignants du Département de Biologie Physico-chimique pour avoir fortement contribué à enrichir nos connaissances.*

*Nos remerciements à toute la promotion de Biochimie Appliquée*

*Et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne sont pas cités*

## 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 très chers parents,*

*Tout d'abord et spécialement à ma chère mère qui aurais été fière de ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte maman, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que le Dieu l'accueil dans son vaste paradis.*

*A mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi et pour assurer mon bien être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue Vie.*

*Mes frères et sœurs*

*Kaci, Foudil, Kamel, Lamine, Faicel, Louanes, Rida, Fatima, Farida, Hakima, 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 mes neveux : Saber, Imen, alaa eddine, Amine, Abd erraouf, Romaiissa, Maria, Abd errahim, Imed.*

*A mes nièces : Khaoula, Mellissa, Anis, Islem, Sami, Djaouade, ALaa, Sérine, Hadil, Asil.  
à m grande famille, A mes chers cousins et cousines et a tous les membres de la famille Amrane et Boubaya, petits et grands.*

*Tout la promotion 2017 Biochimie Appliquée Sans exception.*

*A tous mes amis (es) et mes collègues de travail en particulier BABAHANI Mustafa*

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*Hayet*

## *Dédicaces*

*Avec l'aide de dieu le tout puissant, je dédie ce travail à tous qui ont mon  
encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études :*

*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 chers frères et sœurs Kacem, Said, Nadir, Fafa et Ayah*

*A mon grand-père et ma grand-mère*

*Mes oncles, tantes, a toutes la famille BABAHANI, KOUTA et KHIAT A*

*tous mes amis et mes collègues de travail en particulier AMRANE Hayet*

*A Tout la promotion 2017 de master Biochimie Appliquée*

*Mustafa.*



## Glossaire

**Acide gras** : un acide gras est une molécule formée d'une chaîne de carbones liés à des hydrogènes (c'est ce qu'on appelle un hydrocarbure en chimie organique) terminée par un groupement acide : COOH.

Il existe trois types d'acides gras :

- les acides gras saturés.
- Les acides gras insaturés (mono-insaturés ou polyinsaturés) ils comportent une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone.

**Acide shikimique** : est un intermédiaire biochimique important dans les plantes et les microorganismes. Il est isolé pour la première fois en 1885 par le Néerlandais Johann Frederik Eijkmann à partir de la fleur shikimi.

**Antispasmodique** : est un produit permettant de lutter contre les spasmes musculaires.

**Bilirubine** : est un pigment jaune, produit de dégradation de l'hémoglobine (lors de la destruction des globules rouges). Son catabolisme est assuré par le foie.

**Carvacrol** : est une molécule de la famille des phénols. Il est présent naturellement dans certaines plantes, en particulier le thym, l'origan et la sarriette. Il entre également dans la composition des huiles essentielles extraites de ces plantes. Ces huiles essentielles sont à appliquer en dilution sur la peau, principalement pour combattre les infections et soulager les douleurs musculaires.

**Carvone (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O)** : est un liquide incolore à jaune pâle ayant un point d'ébullition de 230 °C. La molécule de carvone appartient à la famille des terpènes et possède un carbone asymétrique.

**Cytosquelette** : le cytosquelette d'une cellule est l'ensemble organisé des polymères biologiques qui lui confèrent l'essentiel de ses propriétés architecturales et mécaniques. Il est constitué de polymères biologiques de protéines, qu'on qualifie parfois de fibres étant donnée leur taille importante à l'échelle cellulaire.

**Désamination** : est une réaction chimique au cours de laquelle une molécule perd un groupement amine. Les enzymes catalysant cette réaction sont appelées désaminases. Dans

le corps humain, la désamination a lieu principalement dans le foie, néanmoins on trouve également la désamination du glutamate dans les reins.

**Dyspepsie** : correspond à un ensemble des symptômes de douleur ou de malaise épigastrique (région supérieure de l'abdomen) dont l'origine se situerait au niveau de l'estomac ou des structures proches. Ces troubles sont fréquents, chroniques ou ponctuels, pouvant être liés à des causes variées, organiques et fonctionnelles. Des problèmes infectieux, ou de malformation (du système cardia/pylore par exemple) peuvent être en cause, ainsi que des déséquilibres hormonaux (impliquant par exemple la mélatonine).

**Epilepsie** : est une affection neurologique grave, qui a des implications à long terme sur la santé et le bien-être.

**Flavanones** : sont un sous-groupe de flavonoïdes, dérivés 2,3-dihydrogénés des flavones. Elles sont généralement glycosylés par un disaccharide en position 7 pour donner des hétérosides de flavanones.

**Flavonoïde** : Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux.

**Glycophorine** : est un terme générique désignant une famille de glycoprotéines, porteuses de nombreuses chaînes osidiques, Chez l'homme, quatre glycophorines ont été isolées de la membrane des érythrocytes. Les glycophorines A, B, C, et D qui sont des protéines transmembranaires.

**Haptoglobine** : est une mucoprotéine existant dans le plasma sanguin se combinant facilement avec l'hémoglobine extra-globulaire. Sa valeur normale est nulle chez le nouveau-né, et de 30 à 200 mg/dL à partir de l'âge de 4 mois et chez l'adulte. Une valeur inférieure à 25 mg/dL évoque une hémolyse.

**Hémoglobine** : est une protéine qui se trouve à l'intérieur des globules rouges du sang et responsable de sa couleur rouge. Elle existe sous plusieurs formes. Son rôle est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus de l'organisme et le gaz carbonique des tissus vers les poumons.

**Interactions des van der Waals** : est une interaction électrique de faible intensité entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal.

**Lactate-deshydrogénase (LDH)** : est une enzyme importante dans le métabolisme des sucres, la transformation des sucres en énergie, afin que les cellules puissent les utiliser. On la retrouve dans les cellules de différents organes et tissus : rein, cœur, muscles, pancréas, rate, foie, cerveau, poumons, peau, globules rouges, placenta...

**Membrane cellulaire** : désigne un assemblage de molécules en un double feuillet séparant la cellule de son environnement et délimitant le cytoplasme cellulaire, ainsi que les organites à l'intérieur de celui-ci. La membrane est un ensemble complexe de lipides, de protéines et de sucres (ou oses) régulant les échanges de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou entre deux compartiments cellulaires par des transporteurs, bourgeonnement de vésicules, phagocytose, etc. Les composants-clé de la membrane biologique sont les phospholipides. Ils ont la capacité de s'auto-organiser en un double feuillet, leurs têtes hydrophiles pointant vers l'extérieur et leurs chaînes hydrophobes pointant vers l'intérieur de la membrane.

**Monoterpènes** : Ce sont des molécules légères, très peu fonctionnalisées, très odorantes, Ils comportent dix (10) atomes de carbones. Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles.

**Nanoparticules** : est une particule dont la taille est inférieure à celle d'une cellule, elle se présente sous la forme de poudres de gel ou de solutions.

**Naringine** : est le principal hétéroside de flavonoïde du pamplemousse et du pomélo et donne aux jus de pamplemousse et de bergamote une saveur amère.

**Néohesperidine** : est un hétéroside composé de 2 oses (un glucose et un mannose) attaché à un polyphénol.

**Pharynx** : est le passage obligé de tout ce que l'on avale et que l'on respire. Il s'étend depuis le fond de la bouche (le voile du palais avec la langue et les amygdales), jusqu'à l'oesophage.

**Polyarthrite rhumatoïde** : C'est une maladie dégénérative inflammatoire chronique, elle est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes.

**Pompe sodium-potassium** ou **Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase** : est une protéine transmembranaire dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate

inorganique pour transporter des ions potassium et sodium contre leur gradient de concentration. Elle joue un rôle dans le maintien du potentiel de repos des cellules nerveuses, musculaires et cardiaques. La pompe permet d'échanger les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) issus du milieu intracellulaire avec les ions potassium  $\text{K}^+$  issus du milieu extracellulaire dans un rapport précis ( $3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$ ). Cette pompe est responsable du rétablissement de l'équilibre initial après un potentiel d'action.

### **Radicaux libres :**

Les radicaux libres sont des molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme. Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène. Cette instabilité chimique fait que ces substances sont très réactives et certaines des réactions avec des structures de la cellule entraînent des dégâts en leur sein.

**Réaction de Fenton :** est une réaction d'oxydation avancée aboutissant à la formation du radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$  qui est le deuxième oxydant le plus puissant présent dans la nature après le fluor. Au cours de la réaction, le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée) oxyde le fer ferreux (ou ion fer II) selon la réaction d'oxydo-réduction :  $\text{Fe}^{2+ (\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+ (\text{aq})} + \text{OH}^{- (\text{aq})} + \cdot\text{OH}$ .

**Rhume :** est une infection fréquente et généralement bénigne des voies aériennes supérieures (cavité nasale et pharynx) par un virus, principalement les picornaviridés (dont les rhinovirus), les adénovirus ou les coronavirus.

**Sesquiterpènes :** forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures, ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

**Terpène :** Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux. Il désigne aussi un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, ... etc.).

**Thrombose :** se définit par l'obstruction d'une veine ou d'une artère par un thrombus (ou caillot).

**Thymol** : Le thymol est un composé aromatique de la famille des phénols. Le thymol est notamment présent en solution dans plusieurs huiles essentielles végétales, en particulier celle du thym. Sous forme solide, le thymol à l'apparence de cristaux sans couleur mais dégageant une odeur très marquée.

**Transamination** : est une réaction chimique réversible qui consiste en l'échange d'une fonction amine primaire entre un acide  $\alpha$ -aminé et un  $\alpha$ -cétoacide. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la transaminase. Par exemple : Glutamate + Oxaloacétate  $\rightarrow$  Alpha-cétoglutarate + Aspartate.