

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



UNIVERSITE de TLEMCEEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la
Terre et de l'Univers



Département de Biologie

Mémoire

Présenté par

M^{elle} Bendi Latreche Mouna

&

M^{elle} Hathout Anissa

En vue de l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Option : Toxicologie Industrielle et Environnementale

Thème

Etude phytochimique et recherche d'activité hémolytique des extraits préparés d'Amande amère

Soutenu le 29/06/2020, devant le jury composé de :

Présidente :	HADDAM Nahida	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur :	AZZI Rachid	MCA	Université de Tlemcen
Examineur :	CHAUCHE Mohammed Tarik	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Remerciement

Tout D'abord on remercie Dieu de nous avoir donné la force, la patience et le pouvoir pour réaliser ce travail.

En premier lieu, on tient vivement à remercier **Mr Azzi Rachid** maître de conférences classe « A » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid, d'avoir accepté de diriger ce travail, et pour ces précieux conseils, sa patience et sa disponibilité.

On remercie également **M^{me} Haddam Nahida** maître de conférences classe « A » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid, d'avoir accepté de présider le jury.

On tient à remercier **Mr Chaouche Mohammed Tarik** maître de conférences classe « A » au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

A cette même occasion, nous tenons à remercier le personnel du laboratoire de Biochimie pour son aide et sa permanente disponibilité.

ملخص

يعتبر اللوز المر (*Prunus Amygdalus var. Amara*)، شجرة من عائلة الورديات المنتشرة بشكل رئيسي في حوض البحر الأبيض المتوسط والمعروف بخصائصه العلاجية والدوائية.

في هذا السياق، يركز عملنا على دراسة كيميائية نباتية، تستند إلى اختبارات كيميائية نباتية نوعية وفحوصات كمية لمركبات الفينول، والبحث عن التأثير السام على كريات الدم الحمراء المعزولة والمحتضنة لمدة 60 دقيقة، في وسط معتدل ($0.2 \pm 7.4\text{pH}$) في وجود المستخلصات الكحولية الخامة المختلفة من اللوز المر.

استنادًا إلى التحليل الكيميائي النباتي لمختلف المستخلصات، وجدنا ان نبتتنا غنية بالالكالويدات، الفلافونويد، الكينون، السابونين ومركبات التاربنويد والمركبات السكرية المرجعية.

أظهر التحليل الكمي لمتعدد الفينول ان المستخلص الذي تم تحضيره بالمستحضر الكحولي المائي الساخن المتبوع بالنقع احتوى أعلى نسبة من مركبات الفلافونويد (6.15 ميكروغرام مكافئ كاتيشين لكل ملغ مستخلص جاف)، بينما المستخلص الاخر المحضر بالغليان فقد احتوي على النسبة الأكبر من متعدد الفينول (30.50 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ملغ مستخلص جاف).

كما كشفت دراسة التأثيرات السامة على كريات الدم الحمراء البشرية عن سمية عالية بمعدل انحلال دم حوالي 55.95% بتركيز 4 ملغ / مل من المستخلص الكحولي المائي الساخن المتبوع بالنقع المحضر بواسطة النقع .

الكلمات المفتاحية: اللوز المر، التحليل الكيميائي النباتي، المركبات الفينولية، التسمم الخلوي، انحلال الدم، كريات الدم الحمراء البشرية.

Résumé

Prunus amygdalus var. *amara* appelées aussi les amandes amères, ou communément appelée « Louz El Mor », est un arbre de la famille des rosacées, majoritairement répandu dans le bassin méditerranéen. Elle est connue par ses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques.

Dans ce contexte, notre travail est porté sur une étude phytochimique, basée sur des tests phytochimiques qualitatifs et des dosages quantitatifs des composés phénoliques, et une recherche de l'effet toxique vis-à-vis des érythrocytes humains isolés et incubés pendant 60 min, dans une solution tampon PBS à pH 7,4 \pm 0,2 en présence des différentes concentrations d'extraits bruts hydrométhanolique d'amande amère, préparés par deux méthodes ; par une infusion suivie d'une macération ou par une décoction.

D'après l'analyse phytochimique, nous avons révélé que notre plante est riche en alcaloïdes, flavonoïdes, quinones libres, saponines, terpénoïdes et composés réducteurs.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium, a montré que l'extrait préparé par décoction est très riche en polyphénols totaux avec une teneur de l'ordre de 30,50 \pm 22,18 μ g EAG / mg ES. Par contre, l'extrait brut préparé par infusion suivie d'une macération a noté la teneur la plus élevée en flavonoïdes de l'ordre de 06,15 \pm 3,35 μ g EC / mg ES.

L'étude de l'effet toxique vis-à-vis des érythrocytes humains, a révélé une toxicité élevée, avec un taux d'hémolyse d'ordre de 55,95% à une concentration de 4 mg/ml, d'extrait préparé par infusion et suivie d'une macération. Alors que, celui préparé par décoction a présenté une faible toxicité, avec un taux d'hémolyse d'ordre de 6,13% à une concentration de 3 mg/ml, par rapport à l'hémolyse totale.

Mots clés : *Prunus amygdalus* var. *amara*, étude phytochimique, composés phénoliques, cytotoxicité, effet hémolytique, érythrocytes humains.

Abstract

Prunus Amygdalus var. *amara*, also known as the bitter almond, or commonly known as "Louz El Mor", is a tree of the rosaceous family, mostly widespread in the Mediterranean basin. It is known for its therapeutic and pharmacological properties.

In this context, our work is focused on a phytochemical study, based on qualitative phytochemical tests and quantitative assays of phenolic compounds, and a search for the toxic effect on human erythrocytes isolated, incubated for 60 min, in a PBS buffer solution at pH 7.4 ± 0.2 in the presence of various crude hydro-methanolic bitter almond extracts, prepared by two ways; by infusion followed by maceration or by decoction.

According to the phytochemical analysis, we found that our plant is rich in alkaloids, flavonoids, free quinones, saponins, terpenoids and reducing compounds.

The quantitative analysis of total polyphenols by the method of Folin-Ciocalteu and flavonoids by the method of aluminum trichloride, showed that the extract prepared by decoction is very rich in total polyphenols with a content of about $30.50 \pm 22.18 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$, on the other hand that prepared by infusion followed by maceration noted the highest content of flavonoids of about $06.15 \pm 3.35 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$.

The study of the toxic effect on human erythrocytes revealed a high toxicity, with a hemolysis rate of 55.95% at a concentration of 4 mg/ml of extract prepared by infusion followed by maceration. Whereas, that prepared by decoction showed low toxicity, with a hemolysis rate of about 6.13% at a concentration of 3 mg/ml, in relation to total hemolysis.

Key words: *Prunus Amygdalus* var. *amara*, phytochemical study, phenolic compounds, cytotoxicity, hemolytic effect, human erythrocytes.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

Introduction _____ 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

1. Introduction _____ 3

2. Récolte _____ 3

3. Identification des plantes _____ 4

4. Préparation des plantes médicinales _____ 4

4.1. Infusion _____ 4

4.2. Décoction _____ 4

4.3. Macération _____ 4

5. Principes actifs (Métabolites secondaires) _____ 4

5.1. Les composés phénoliques _____ 5

5.1.1. Les acides phénoliques _____ 5

5.1.2. Les flavonoïdes _____ 6

5.1.3. Les tanins _____ 6

5.1.4. Les quinones _____ 8

5.1.5. Les coumarines _____ 8

5.2. Les composés azotés (Alcaloïdes) _____ 9

5.3. Les composés terpéniques _____ 9

6. La toxicité des plantes médicinales _____ 9

6.1. Notion de toxicité _____ 10

6.2. Notion de poison / toxique _____ 10

6.3. Toxicité des plantes médicinales _____ 10

6.4. Relation Dose-effet/Dose-réponse _____ 10

6.5. Évaluation d'un effet toxique _____ 11

6.6. Types de toxicité _____ 11

Chapitre 02 : Hémyolyse

1. Les globules rouges _____ 14

2. Définition de l'hémyolyse _____ 14

3. Types d'hémyolyse _____ 14

3.1. L'hémyolyse physiologique _____ 14

3.2. L'hémyolyse pathologique _____ 15

4.	Mécanisme d'hémolyse	15
4.1.	En cas d'hémolyse physiologique	15
4.2.	En cas d'hémolyse pathologique	15
5.	Plantes à effets hémolytiques et anti-hémolytiques	16

Chapitre 03 : Plante étudiée

1.	Noms vernaculaires	18
2.	Taxonomie	18
3.	Description botanique	18
4.	Morphologie de l'amande	20
5.	Répartition géographique	20
6.	Composition chimique	20
7.	Utilisation traditionnelle	20
8.	Toxicité	21
8.1.	Doses toxiques	21
8.2.	Symptomatologie	21

Partie Expérimentale

Matériel Et Méthodes

1.	Matériel végétal	22
2.	Préparation des extraits	22
2.1.	Extrait brut préparé par infusion suivie d'une macération	23
2.2.	Extrait brut préparé par décoction	23
2.3.	Calcul des rendements	23
3.	Tests phytochimiques	24
4.	Dosage des composés phénoliques	25
4.1.	Dosage des polyphénols totaux	25
4.2.	Dosage des flavonoïdes	27
5.	Analyse biologique (Recherche d'effet hémolytique des extraits étudiés)	28
5.1.	Préparation du phosphate buffer saline (PBS)	29
5.2.	Préparation de la suspension érythrocytaire	29
5.3.	Préparation des extraits	29
5.4.	L'effet hémolytique des extraits de la plante étudiée	29
5.5.	Exploitation des résultats	30
6.	Analyse statistique	30
6.1.	La moyenne	30
6.2.	L'écart-type	30

Résultats Et Interprétations

1.	Caractéristiques des extraits préparés	31
----	--	----

2.	Etude photochimique	31
2.1.	Tests phytochimiques	31
2.2.	Dosage des composés phénoliques	33
2.2.1.	Dosage des polyphénols Totaux	33
2.2.2.	Dosage des flavonoïdes	34
3.	Analyse biologique	36
3.1.	L'évaluation de l'effet hémolytique de l'amande amère	36
	Discussion	39
	Conclusion Et Perspectives	42
	Références Bibliographiques	43

Liste des tableaux

Tableau01 : Les formes d'intoxication	13
Tableau02 : Plantes à effet hémolytique	16
Tableau03 : Plantes à effet anti-hémolytique	17
Tableau04 : Méthode de dosage des polyphénols totaux.	26
Tableau05 : Méthode de dosage des flavonoïdes totaux	28
Tableau06 : Rendement, aspect physique et solvant de solubilisation des extraits préparés à partir d'amande amère <i>Prunus amygdalus</i> var. <i>amara</i> .	31
Tableau07 : Résultats des tests phytochimiques des extraits hydrométhanoliques d'amande amère <i>Prunus amygdalus</i> var. <i>amara</i>	32

Liste des Figures

Figure 01 : Structure de quelques acides phénoliques	6
Figure 02 : structure de base des flavonoïdes	6
Figure 03 : structure de l'acide gallique	7
Figure 04 : Structure de l'acide ellagique	7
Figure 05 : Structure des tannins condensés	8
Figure 06 : Structure de base des coumarines	8
Figure 07 : Structure d'isoprène	9
Figure 08 : Mécanisme de décomposition des érythrocytes	16
Figure 09 : Fleur d'amandier	19
Figure 10 : Feuille d'amandier	19
Figure 11 : Fruit d'amandier	19
Figure 12 : grains d'amandier	19
Figure 13 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	33
Figure 14 : La teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg ES}$) des extraits préparés de <i>Prunus amygdalus var. amara</i>	34
Figure 15 : La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux	35
Figure 16 : La teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EC/mg ES}$) des extraits préparés de <i>Prunus amygdalus var. amara</i> .	36
Figure 17 : Taux d'hémolyse (%), des érythrocytes incubés 60 min, à 37°C en présence des différentes concentrations d'amandes amères préparés par infusion suivie d'une macération (EIM)	37
Figure 18 : Taux d'hémolyse (%), des érythrocytes incubés 60 min, à 37°C en présence des différentes concentrations d'amandes amères préparés par Décoction (ED)	38

Liste des abréviations

DL50 : La dose létale 50.

CL50 : la concentration létale 50

ED : Extrait brut -décoction-

EIM : Extrait brut –infusion suivie d’une macération

G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase

HB : Hémoglobine

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

µg EAG/mg ES : microgramme équivalent acide gallique par milligramme d’extrait sec.

µg EC/mg ES : microgramme équivalent catéchine par milligramme d’extrait sec.

Introduction

Au cours des siècles, les plantes ont fourni à l'être humain tous leurs besoins en termes d'abris, de vêtements, de nourriture, de saveurs, de parfums et notamment leurs besoins médicaux. Ces plantes ont constitué la base de systèmes de médecine traditionnelle (**Gurib-Fakim, 2006**). Il y a d'environ 35 000 espèces de plantes qui sont utilisées dans le monde à des fins médicinales, constituant ainsi un éventail plus large de la biodiversité utilisée par l'être humain (**Elqaj, 2007**).

Les plantes médicinales ont été identifiées et utilisées tout au long de l'histoire de l'humanité, car certaines parmi eux peuvent guérir à des très faibles doses. Comme elles peuvent exercer un effet inverse et devenir des poisons mortels à plus forte concentrations (**Debaisieux et Poles, 2009**).

Selon L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des médicaments à base des plantes est un élément essentiel des soins de santé primaire, en vue de standardiser leur usage et les intégrées dans les systèmes de soins conventionnels. Environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire (**OMS, 2000**).

Comme tous les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu en Algérie, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés pour soigner plusieurs maladies (**Azzi, 2013**).

Tlemcen se distingue par sa diversité de plantes, notamment médicinales, où il existe environ 275 espèces de différentes familles identifiées (**Loukkas, 2006**).

L'amande amère (*Prunus amygdalus* var. *amara*) est le fruit de l'amandier, un arbre de la famille des rosacées (**Yada et al., 2011**). C'est une plante originaire de la région méditerranéenne d'Asie. Les amandes amères ont une valeur nutritionnelle importante, et des propriétés thérapeutiques remarquables (**Moradi et al., 2017**).

Pour l'évaluation de la toxicité de la plante (*in vitro*), les globules rouges sont le meilleur choix en vue de leur facilité d'isolement, leur relative simplicité et pour éviter l'utilisation de nombreux lots d'animaux (**Wajeman, 1992**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique de l'amande amère (*Prunus amygdalus* var. *amara*) et à l'évaluation de leur effet hémolytique sur les extraits hydrométhanoliques préparés par infusion suivie d'une macération ou par décoction sur lequel nous avons réalisé :

- Une recherche bibliographique constituée de 3 chapitres traitant les plantes médicinales, les métabolites secondaires et leurs toxicités, une définition de l'effet hémolytique, ses types et son mécanisme et enfin une présentation de la plante étudiée (l'Amande amère ou *Prunus amygdalus* var. *amara*).
- Un screening phytochimique de différentes familles des métabolites secondaires.
- Un dosage des composés phénoliques : les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux.
- Une recherche de l'effet hémolytique des extraits préparés d'amande amère.

Partie

bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

1. Introduction

Les plantes médicinales sont des plantes qui renferment essentiellement un ou plusieurs métabolites secondaires physiologiquement actifs et possèdent des propriétés curatives (**Schauenburg et Paris, 1997**).

Ce sont des usines chimiques naturelles, produisant des substances actives biochimiques : alcaloïdes, huiles essentielles, flavonoïdes, tanins. Elles sont mises à la disposition de l'homme pour faire usage pour sa santé et pour satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenburg et Paris, 1997**).

Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans certains pays du monde et surtout dans les pays en voie de développement qui dépendent d'elles pour assurer leurs soins de santé primaire en l'absence d'un système médicamenteux moderne (**Tabuti et al., 2003**). En effet, 60 % des médicaments employés en médecine courante sont issus des plantes médicinales (**Grosmond, 2001**).

Pour que l'on puisse étudier les plantes médicinales, il faut d'abord identifier la plante, connaître la période et la région de leurs récoltes et de leurs préparations (**Chevallier, 2001**).

2. Récolte

Certaines plantes médicinales peuvent être cueillies durant toute l'année, mais la majorité doit être récoltée à un moment bien précis de leurs croissances. C'est le moment où le taux des principes actifs (métabolites secondaires) est optimal pour qu'elles soient utilisées immédiatement ou après conservation (**Chevallier, 2001**).

La récolte des plantes médicinales doit s'effectuer dans le temps ensoleillé pour faciliter leur séchage (simple séchage à l'air) (**Schauenburg et Paris, 2013**), puis elles doivent être conservées dans un endroit sec (**Chevallier, 2001**).

Il existe d'autres méthodes de séchage :

➤ La déshumidification

C'est une méthode efficace mais onéreuse, nécessite l'utilisation d'un déshumidificateur qui aspire de l'humidité des plantes (**Chevallier, 2001**).

➤ La congélation

Cette méthode conserve les couleurs et les parfums. Elle a plus d'avantages pour les plantes aromatiques que celles des plantes médicinales (**Chevallier, 2001**).

3. Identification des plantes

Avant toute utilisation, les plantes médicinales doivent être identifiées, parce que de nombreux cas d'intoxication sont dus à des erreurs d'identification, et ensuite l'étape de préparation de ces plantes (**Chevallier, 2001**).

4. Préparation des plantes médicinales

Trois principaux procédés sont utilisés. La plupart de ces procédés ne présentent aucune difficulté, sauf qu'ils sont parfois longs à réaliser (**Chevallier, 2001**).

4.1. Infusion

L'infusion consiste à verser sur la plante de l'eau bouillante et à laisser jusqu'à refroidissement en couvrant la préparation. L'infusion convient aux plantes fragiles (fleurs et feuilles) (**Wichtl et Anton, 1999**).

4.2. Décoction

La décoction consiste à maintenir la plante avec de l'eau à ébullition pendant une durée de 15 à 30 minutes. Ce procédé est approprié pour les plantes de consistance dure ou très dure (bois, racines, écorces) (**Wichtl et Anton, 1999**).

4.3. Macération

La macération consiste à maintenir en contact la plante avec de l'eau à température ambiante pendant quelques heures ordinairement 2-12 heures ; dans le but de préserver les principes actifs de certaines plantes qui ne supportent pas la chaleur (**Schauenburg et Paris, 2013**).

5. Principes actifs (Métabolites secondaires)

Les principes actifs des plantes sont des molécules organiques, généralement des métabolites secondaires, biosynthétisés à partir des métabolites primaires par les plantes autotrophes, qui ont une activité thérapeutique et qui jouent un rôle fondamental dans les interactions biologiques des plantes avec son environnement. Ils sont présents à des faibles concentrations dans les tissus végétaux (**Dillemann, 1961**).

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

Les métabolites secondaires ne sont pas par définition, nécessaires pour la survie des cellules ou de l'organisme. Ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques, et sont caractéristiques des plantes supérieures (**Badiaga, 2012**).

Ces métabolites secondaires sont répartis en trois (03) grandes familles chimiques :

- Les composés phénoliques.
- Les composés azotés (alcaloïdes).
- Les composés terpéniques (Les terpénoïdes et stéroïdes) (**Badiaga, 2012**).

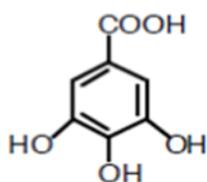
5.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques présentent une large gamme de substances chez les végétaux. (**Macheix, 1996**).

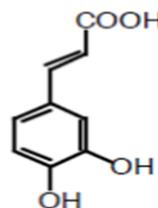
Ces composés aromatiques possèdent dans leurs structures un élément essentiel qui est un noyau benzénique, qui se trouve soit libre ou engagé dans un groupe hydroxyle ou d'autres fonctions éther, ester ou hétéroside (**Bruneton, 2009**).

5.1.1. Les acides phénoliques :

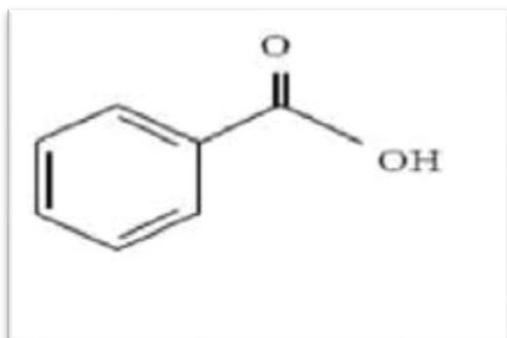
Les acides phénoliques sont des composés organiques qui renferment au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, tel que l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide benzoïque, l'acide cinnamique, ... (**Figure 01**) (**Serve et al., 2008**).



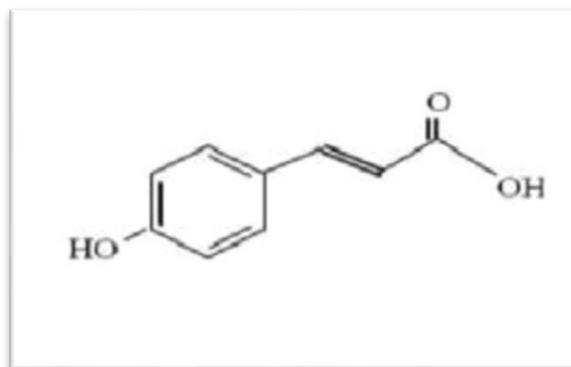
(a) : structure de l'acide gallique (**Krief, 2003**)



(b) : Structure de l'acide caféique (**Krief, 2003**)



(c) : structure de l'acide benzoïque
(Zahalka, 2005)



(d) structure de l'acide cinnamique
(Bruneton, 2008)

Figure 01 : Structure de quelques acides phénoliques

5.1.2. Les flavonoïdes

Le terme " Flavonoïde "provient du latin " *Flavinus*", ce qui signifie " Jaune " (**Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000**). Ce sont des polyphénols qui présentent tous une structure de type (C₆- C₃- C₆) (**Figure 02**) (**Zahalka, 2005**). Ils sont composés de deux cycles aromatiques (A) et (B) et d'un hétérocycle oxygéné (C), et sont divisés en différentes classes telles que, les flavones, flavanols, flavanones, isoflavone et anthocyanidines (**Ghasemzadeh Ali, 2011**).

Les flavonoïdes possèdent diverses activités biologiques ; antioxydante, anti- inflammatoire, cytotoxique et anti- tumoral (**Ghasemzadeh Ali, 2011**).

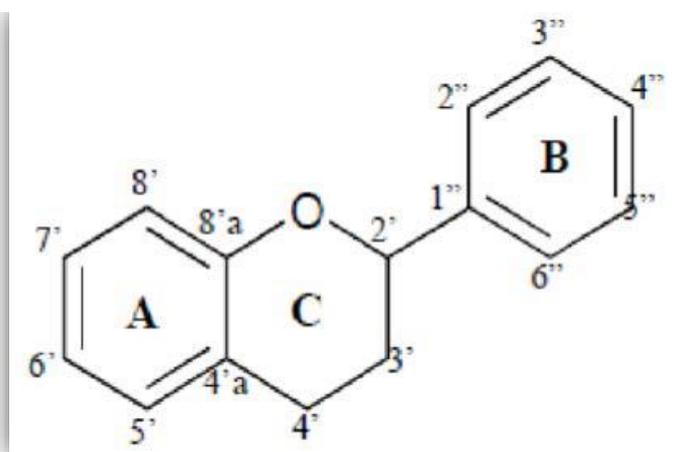


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes (**Zahalka, 2005**).

5.1.3. Les tanins

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

Les tanins sont des polymères polyphénoliques hydrosolubles de différentes structures, et de saveur astringente, ayant une propriété commune de tanner la peau d'où proviennent leurs noms (**Hopkins, 2003**). Ils sont très répandus dans le règne des végétaux, et se trouvent dans divers organes : racines, écorces, bois- feuilles, fleurs et graines (**Hagerman, 2002**).

Les tanins sont classés généralement selon leurs structures en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

➤ Tanins hydrolysables

C'est un groupe principalement responsable des effets toxiques. Ce sont des esters d'acide phénol et de glucose (**Ghestem et al., 2001**). Ils sont facilement hydrolysables (d'où proviennent leurs noms), donnant :

- L'acide gallique ; donne par hydrolyse des oses et l'acide gallique (**Figure 03**).
- L'acide ellagique ; est scindé par les acides ou les enzymes en oses et en acide ellagique (**Figure 04**).

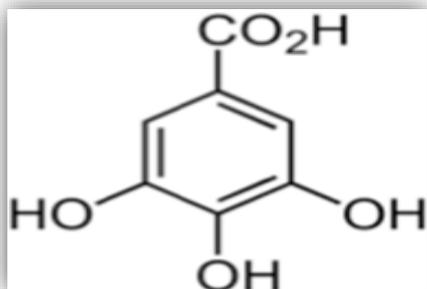


Figure 03 : Structure de l'acide gallique (**Bruneton, 2008**)

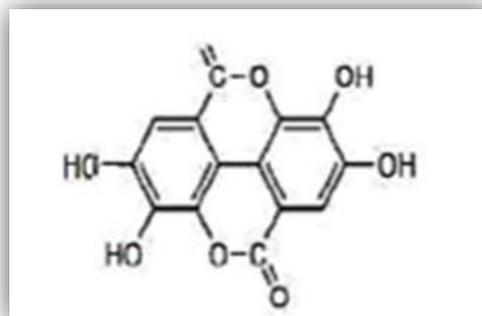


Figure 04 : Structure de l'acide ellagique (**Peronny, 2005**)

➤ Tanins condensés

Sont des dérivées non hétérosidiques, beaucoup moins toxiques, résultant de la polymérisation des unités (Flavanes) (**Bruneton, 2009**), Ils sont appelés aussi "*Proanthocyanidine*".

Sous l'action d'acides ou d'enzymes, les polymères de tanins condensés se forment. Ils sont formés généralement à partir de 2 à plus de 50 sous-unités monomériques (**Figure 05**) (**Vermerius et Nicholson, 2006**).

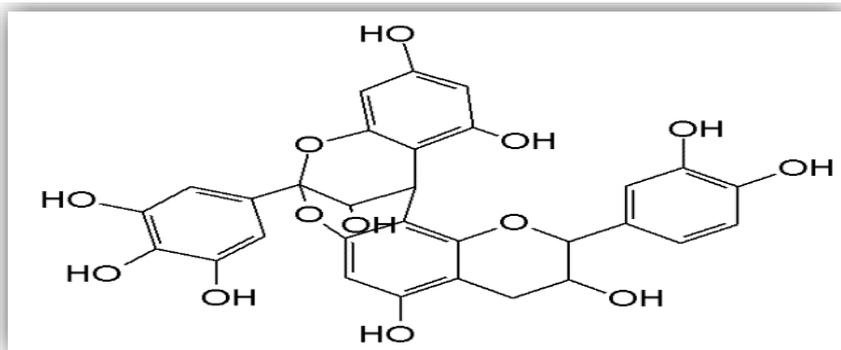


Figure 05 : Structure des tanins condensés (Zahalka, 2005).

5.1.4. Les quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation des dérivés aromatiques avec des substitutions. Ils sont présents dans la nature sous forme de pigments naturels, dont la plupart sont jaunes pâles, rouges et bruns (Harborne, 1998).

5.1.5. Les coumarines

Les coumarines regroupent une classe de métabolites secondaires des végétaux. Elles sont dérivées de l'acide cinnamique par cyclisation de la chaîne latérale de l'acide o-coumarique, et on les retrouve généralement sous forme de glycosides dans la nature (Figure 06) (Giada, 2013).

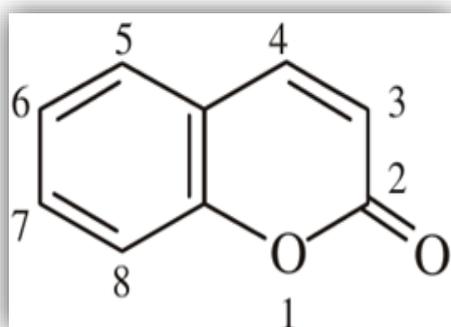


Figure 06 : Structure de base des coumarines (Bruneton, 2008).

5.2. Les composés azotés (Alcaloïdes)

Les alcaloïdes sont des composés cycliques organiques qui contiennent de l'azote, à caractère alcalin, présentent une structure complexe et possèdent des propriétés pharmacologiques significatives (**Badiaga, 2012**).

La teneur des plantes en alcaloïdes diffère d'une espèce à une autre (**Badiaga, 2012**), et peut se trouver dans toutes les parties de la plante (**Gravot, 2009**).

Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et jouent un rôle dans la protection des végétaux contre les agressions des prédateurs (**Bruneton, 1999 ; Bhat et al., 2005 ; Badiaga, 2012**).

5.3. Les composés terpéniques

Ce sont des constituants, d'origine végétale qui possèdent une structure moléculaire constituée à partir d'un monomère à 5 carbones appelés " *isoprène*" (C_5H_8) (**Figure 07**) (**Malecky, 2006**).

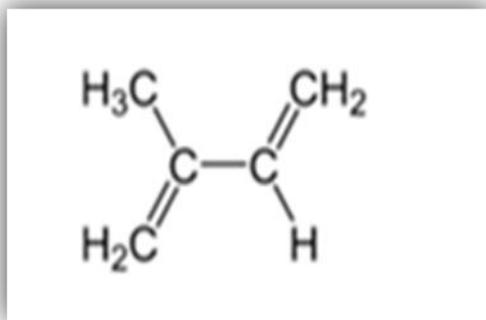


Figure 07 : La structure d'isoprène (**Khenaka, 2011**)

Les terpènes sont classés, selon le nombre de l'isoprène (n) en :

- Les terpènes vrais ; $C_{10}H_{16}$ (n=2) : monoterpènes ; terpènes acycliques (3 doubles liaisons) ; terpènes monocycliques (2 doubles liaisons) ; terpènes bicycliques (1 double liaison).
- Les sesquiterpènes ; $C_{15}H_{24}$ (n=3).
- Les terpènes supérieurs (n>3) : diterpènes : $C_{20}H_{32}$ (n=4) ; triterpènes : $C_{30}H_{48}$ (n=6) ; caroténoïdes : $C_{40}H_{64}$ (n=8) (**Kabouche, 2005**).

6. La toxicité des plantes médicinales

6.1. Notion de toxicité

La toxicité regroupe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant cependant, l'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type de la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion. Par ailleurs, il s'agit de la capacité d'une substance chimique de causer des effets délétères chez l'être vivant (**Lapointe et al., 2004**).

6.2. Notion de poison / toxique

Un poison ou toxique, est une substance capable de perturber le fonctionnement normal d'un organisme vivant ou entraîner leur décès. Il peut être de source naturelle (poussière), artificielle (formaldéhyde), de nature chimique (acétone) ou biologique (aflatoxine) (**Lapointe et al., 2004**).

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose, de la durée d'exposition, des facteurs environnementaux et des facteurs liés à l'individu (âge, sexe, comportement nutritionnel et hormonal) (**Tron et al., 2002**).

6.3. Toxicité des plantes médicinales

La plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux (**Lévy et al., 2008**).

Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie, montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés non pas à la plante elle-même mais à une erreur d'identification (**Zeggwagh et al., 2013**).

La toxicité des plantes médicinales dépend aussi, de la partie de la plante utilisée et des quantités prises (**Soumyanath, 2006**).

De plus, les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques (**Trevoux et al., 2000 ; Saad et al., 2006**).

6.4. Relation Dose-effet/Dose-réponse

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

Toutes les substances chimiques peuvent être toxiques, la relation dose-effet est la relation entre la dose et l'effet à l'échelle individuel. Cependant l'augmentation de la dose peut accroître l'intensité des effets toxiques (**Lapointe et al., 2004**).

La relation dose-réponse signifie la relation entre la dose et le nombre d'individus d'une population présentant un effet toxique, dont les effets toxiques peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'une substance toxique (**Lapointe et al., 2004**).

6.5. Évaluation d'un effet toxique

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates.

Il existe plusieurs types d'études, que l'on classe en 4 catégories :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas ;
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex : Lapin, rat et souris).
- Les études expérimentales *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules.
- Les études théoriques par modélisation (**Lapointe et al., 2004**).

6.6. Types de toxicité

Il existe plusieurs types de toxicité des individus exposés, qui se diffère selon la durée, la dose et la fréquence du produit toxique (**Alain, 2002**).

L'homme est habituellement exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou chronique (**Bismuth et al., 1987**).

➤ Toxicité aiguë

Elle se manifeste rapidement voire immédiatement lors d'une prise unique élevée, ou à court terme. C'est une étude qualitative et quantitative des altérations irréversibles des fonctions vitales (**Agbor et al., 2005**).

Le terme " toxicité aiguë " est plus souvent utilisé en relation avec les déterminations de la létalité de la DL50.

Chapitre 01 : Généralités sur les plantes médicinales

La DL50 est la dose létale moyenne qui est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée. Lorsqu'il s'agit d'un toxique volatil qui est inhalé, on parle de la CL50 ; la concentration létale moyenne (**Lapointe et al., 2004**).

➤ Toxicité subaiguë

Elle concerne les effets nocifs dus à des expositions fréquentes et répétées de doses qui ne produisent pas des effets toxiques immédiats, mais des effets tardifs qui peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit, pendant une durée de 90 jours en général (**Montgomery, 1990 ; Laroche, 2001**).

➤ Toxicité chronique

Elle concerne des effets nocifs dus à des expositions prolongées et répétées de doses progressives, généralement pendant 12 mois. La manifestation des symptômes d'intoxication dépend du poison qui s'accumule, et des effets engendrés qui s'additionnent (**Lapointe et al., 2004**).

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxications selon la fréquence et la durée de l'exposition (**tableau 01**) (**Lapointe et al., 2004**).

Tableau 01 : Les formes d'intoxication (Lapointe et al., 2004).

FORME D'INTOXICATION	FRÉQUENCE D'ADMINISTRATION	DURÉE DE L'EXPOSITION
AIGUË	Unique	< 24 heures
SUBAIGUË	Répétée	≤ 1 mois
SUBCHRONIQUE	Répétée	de 1 à 3 mois
CHRONIQUE	Répétée	> 3 mois

Chapitre 02 :

Hémolyse

Pour évaluer la toxicité *in vitro*, divers modèles cellulaires peuvent être utilisés. Le test d'hémolyse peut être étudié comme indicateur de cytotoxicité en vue de la disponibilité des érythrocytes et la facilité de contrôler leur lyse en mesurant la libération d'hémoglobine (Sébahoun, 2006). De plus, la membrane érythrocytaire est un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires (Wajeman, 1992).

1. Les globules rouges

Les érythrocytes, appelés aussi globules rouges ou hématies sont des cellules anucléées. Ils ont une forme de disque biconcave, un diamètre moyen de 7,5 μm et une épaisseur de 2 μm (Menche et al., 2014). Cette forme particulière du globule rouge lui fournit une grande surface, ce qui favorise les échanges d'oxygène. La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours (Aguilar-Martinez, 2007).

L'hémoglobine (Hb), un pigment rouge qui donne la couleur rouge aux érythrocytes. Elle occupe environ le tiers de la masse totale des globules rouges. C'est le composant principal du globule rouge qui assure le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone (Menche et al., 2014)

La membrane plasmique des érythrocytes est connue par sa perméabilité sélective, sa résistante et sa flexibilité (Tortora et al., 2014).

2. Définition de l'hémolyse

Le phénomène d'hémolyse, signifie la destruction des érythrocytes avec la libération de leur contenu intracellulaire dans le liquide extracellulaire (Thomas, 2013).

3. Types d'hémolyse

3.1. L'hémolyse physiologique

Le globule rouge naît et vit son enfance dans la moelle osseuse. Lorsque les globules rouges sont parvenus à l'âge de 120 jours, sont phagocytés dans le système réticulo-endothéliale. A l'état normal 50% des globules rouges sont détruits par les phagocytes mononuclés et le reste est détruit dans le foie et la rate. Il s'agit de l'hémolyse extravasculaire, ce qui désigne que l'hémoglobine n'est pas libérée dans les vaisseaux (Aguilar-Martinez, 2007).

3.2. L'hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique peut être liée à des anomalies particulières du globule rouge, qui correspond à :

- Une anomalie de l'hémoglobine, comme les anomalies quantitatives de la synthèse des chaînes de globines (thalassémie) et qualitatives où la protéine codée a une structure anormale ;
- Une polyglobulie qui se caractérise par l'augmentation de la masse d'hémoglobine, liée à une augmentation de l'érythropoïèse ce qui entraîne l'accroissement du nombre de globules rouges ;
- Un déficit enzymatique du glucose 6-phosphate Déshydrogénase(G6PD), et pyruvate kinase ;
- Les anomalies des protéines du cytosquelette membranaire qui sont responsables d'anomalies de forme de globules rouges telles que la sphérocytose ou elliptocytose héréditaire (Aguilar-Martinez, 2007).

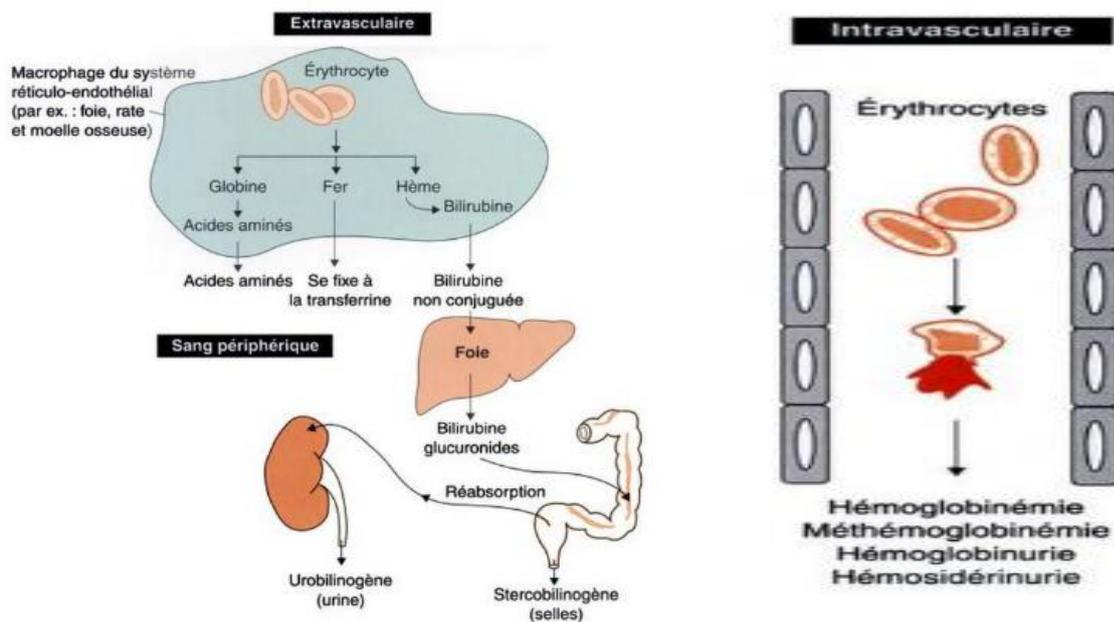
4. Mécanisme d'hémolyse

4.1. En cas d'hémolyse physiologique

La destruction des érythrocytes est essentiellement extravasculaire, dépend d'une phagocytose des globules rouges par les macrophages du système réticulo- endothélial. Cependant, la globine est dégradée en acide aminé. L'hème est dégradé en protoporphyrine et en fer. La protoporphyrine est métabolisée en bilirubine, conjuguée dans le foie avec un glucuronide, excrétée dans les selles (sous forme de stercobilinogène) et après réabsorption dans l'urine sous forme d'urobilinogène. Le fer est recyclé en fer plasmatique et combiné à la transferrine. Une partie du fer reste dans les macrophages sous forme de ferritine ou d'hémosidérine (Mehta et al., 2003).

4.2. En cas d'hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique intravasculaire, survient lorsque les globules rouges sont lysés directement dans les vaisseaux en causant des anomalies telles que : l'hémoglobinurie (présence d'hémoglobines dans les urines), l'hémoglobinémie plasmatique (le plasma est rosé après centrifugation) et effondrement du taux de l'haptoglobine sérique (**Figure 08**) (Aguilar-Martinez, 2007).



A : Hémolyse extravasculaire

B : Hémolyse intra vasculaire

Figure 08 : Mécanisme de décomposition des érythrocytes (Mehta et al., 2003).

5. Plantes à effets hémolytiques et anti-hémolytiques

De nombreuses études ont été réalisées *in vitro*, afin de déterminer l'effet hémolytique (Tableau 2) ou anti-hémolytique (Tableau 3) de certaines plantes médicinales sur les globules rouges.

Tableau 2 : Plantes à effet hémolytique

Plantes (parties étudiées)	Dose et type d'extraction	Taux d'hémolyse (%)	Références
<i>Livistona chinensis</i> (fruit)	Extrait aqueux des alcaloïdes totaux (5 mg/ml)	50%	(Singh et Kaur, 2008)
<i>Berberis vulgaris</i> (racine)	Extrait des alcaloïdes totaux (5 mg/ml)	54,21%	(El Alaoui, 2015)
<i>Auja - iva</i> (tiges et feuilles)	Extrait hydro-méthanolique (2 mg/ml)	71,31%	(Abbou, 2016)
<i>Ammoides verticillata</i> (Partie aérienne)	Extrait acétate d'éthyle (3,33 mg/ml)	74,71%	(Benaissa, 2015)

Tableau 3 : Plantes à effet anti-hémolytique

Plantes (parties étudiées)	Dose et type d'extraction	Taux d'effet anti-hémolytique (%)	Références
<i>Uvaria chamae</i> (Racine)	Extrait brut (5mg/ml)	27%	(Avaligbe et al., 2012)
<i>Citrus maxima</i> (Pépin)	Extrait éthanolique (20mg/ml)	56,37%	(Amrane et Babahani, 2017)
<i>Croton zambesicus</i> (Feuilles)	Extrait brut (5 mg/ml)	50%	(Avaligbe et al., 2012)
<i>Xylopi aethiopica</i> (Fruit)	Extrait brut (5 mg/ml)	30%	(Avaligbe et al., 2012)
<i>Lonchocarpus cyanescens</i> (Racine)	Extrait brut (1mg/ml)	16,8%	(Avaligbe et al., 2012)

Chapitre 03 : Plante étudiée

Chapitre 03 : La plante étudiée

Prunus amygdalus var. *amara*, appelées aussi les amandes amères sont les fruits de l'amandier, un arbre de la famille des rosacées, au genre *Prunus* (Yada et al., 2011). Sa culture était reconnue depuis l'antiquité dans toute l'Asie occidentale. Leur plantation est majeure dans le bassin méditerranéen, dans le Proche-Orient, et en Californie. Elles ont une valeur nutritionnelle importante, et des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques remarquables (Evreinoff, 1952).

Les amandes amères se différencient de celles dites douces par leur teneur en amygdaline, responsable de leur amertume. La concentration de cette substance dans les graines peut atteindre en moyenne 3 à 9% (Yada et al., 2011).

1. Noms vernaculaires

Arabe : Louz El Mor ;

Français : Amandier amer ;

Anglais : Bitter Almond (Hammiche et al., 2013).

2. Taxonomie (APG III, 2009).

Règne : Plantae

Sous règne : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Dicotyledones

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Sous famille : Amygdaloideae

Genre : *Prunus*

Espèces : *amygdalus*

Nom binomial : *Prunus amygdalus* var. *amara*

3. Description botanique

L'amandier est un arbre fruitier mesurant 10 à 12 mètres de haut, qui peut vivre en moyenne jusqu'à une centaine d'années (Hammiche et al., 2013).

Chapitre 03 : La plante étudiée

- **Fleurs** : blanches, apparaissent avant les feuilles dès la fin de l'hiver (**Hammiche et al., 2013**). Le calice est formé de 5 sépales verts, 5 pétales blancs et libres. Les pétales sont insérés sur le bord du réceptacle. Ce dernier, a une forme d'une coupe au fond de laquelle est attaché l'ovaire velu formé d'un seul carpelle libre, (**Figure 09**) (**Reille, 2015**).
- **Feuilles** : d'une dizaine de centimètres, sont étroites, lancéolées, à bord finement dentelé, portées par un court pétiole (**Figure 10**) (**Hammiche et al., 2013**).
- **Fruit** : Le fruit est une drupe ovale, verte et veloutée. Elle encercle une coque criblée de trous, contenant une à deux graines comestibles (**Figure 11, 12**) (**Hammiche et al., 2013**).



Figure 09 : Fleur d'amandier
(Reille, 2015).



Figure10 : Feuilles d'amandier
(Reille, 2015).



Figure11 : Fruit d'amandier
(Reille, 2015).



Figure12 : Graines d'amandier
(Photo prise au laboratoire).

4. Morphologie de l'amande

L'amande amère est constituée de 4 éléments : le noyau, la coquille, la coque extérieure verte et une fine couche coriace (Esfahlan et al., 2010).

5. Répartition géographique

L'amande amère est le fruit de l'amandier, un arbre originaire des pays chauds et secs avec hivers doux. Il est cultivé dans toute l'Asie occidentale depuis l'antiquité, et sa plantation est reconnue tout le long de côtes de la méditerranée, le Proche-Orient et en Californie. (Evreinoff, 1952).

6. Composition chimique

Les amandes amères, sont des aliments riches en éléments nutritifs. Elles sont une bonne source de vitamines (vitamines D (1,40mg/kg), vitamine K (42,25 mg/kg), en particulier la vitamine E, de minéraux tels que le Zn, le Mg, le Fe, le Ca, le K et d'acide gras (acide oléiques 70,61 %, acide linoléiques 20,68%) (Moradi et al., 2017).

Les amandes amères contiennent les flavonoïdes, les polyphénols et les phytostérols (stigmastérol (242,65 mg/Kg), β sitostérol (366,95 mg/kg), ergostérol (0,65 mg/kg), α -tocopérol (104,15mg/Kg), δ -tocophérol (4,95mg/Kg) et rétinol(0,05mg/Kg)) (Keser et al., 2013). Elles contiennent aussi 48% de matière grasses, 30% de protéines, 60% glucides, et 3% d'amygdaline (Moradi et al., 2017).

7. Utilisation traditionnelle

Les amandes sont considérées comme un aliment précieux dans le monde. Elles sont appliquées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, et cosmétique. Elles sont utilisées aussi pour diminuer le risque des maladies cardiovasculaires (Moayedi et al., 2011).

Les amandes amères sont utilisées essentiellement dans la production des extraits de saveurs (Moayedi et al., 2011).

- D'autre part, en médecine traditionnelle, l'huile d'amande amère est utilisée en parfumerie et en cosmétologie comme soins capillaires, pour réduire les taches de rousseur et l'eczéma.

-L'huile est employée aussi pour l'élimination des calculs rénaux.

-L'indication majeure de l'amande amère est le diabète sucré (Hammiche et al., 2013).

8. Toxicité

Les amandes amères sont des aliments riches en éléments nutritifs, mais leur utilisation en quantités importantes, en fonction de l'âge et de l'indice de masse corporelle peut causer des complications induites par le cyanure chez l'homme (**Moradi et al., 2017**).

L'amande amère est une plante à hétérosides cyanogènes, leur toxicité est liée au cyanure qui inhibe le cytochrome C oxydase mitochondrial et diminue la consommation de dioxygène par la cellule. Ainsi, Il est responsable de plusieurs altérations, neurologiques, cardiaques, et respiratoires. Les intoxications aux hétérosides cyanogènes recensées au Centre Antipoison d'Alger sont importantes (6%) (**Zebbiche et al., 2013**).

8.1. Doses toxiques

*chez l'animal

- **Cyanure** : DL50 per os/souris : 6mg/kg
- **Amygdaline**: DL50 IP souris : 45,7mg/kg (**Hamliche et al ., 2013**).

*chez l'homme

Les doses létales (DL) per os de cyanure et d'amygdaline signalées chez l'homme sont :

- **Cyanure** : DL50 per os /homme : 0,5 à 3,5 mg/kg.
- **Amygdaline** : DL50 per os /homme : 9 à 59,8 mg/kg. (**Hamliche et al., 2013**).

8.2. Symptomatologie

- Après l'empoisonnement par le cyanure présent dans l'amande amère, se manifestent des symptômes cliniques tels que, maux de tête, vertige, vomissement, bradycardie, acidose, hypotension, lésions hépatiques et fièvre (**Moradi et al ., 2017**).
- Lorsqu'il s'agit d'intoxication sévère, on remarque une dyspnée suivie d'une perte de connaissance, convulsion et coma (**Hamliche et al ., 2013**).

Partie Expérimentale

Matériel Et Méthodes

Cette étude a été effectuée au sein du laboratoire de biochimie N°04, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.

Ce travail a pour but d'extraire les substances bioactives de l'amande amère, de rechercher la présence des métabolites secondaires (flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, coumarines, quinone libre, terpénoïdes), déterminer la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) et d'évaluer l'activité hémolytique des extraits hydro-méthanoliques de l'amande amère.

1. Matériel végétal

Les amandes amères (*Prunus amygdalus var. amara*) sont récoltées à maturité durant le mois de septembre dans la région de Ghazaouet wilaya de Tlemcen.

Les amandes amères ont été séchées à une température ambiante à l'abri de la lumière et ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique, la poudre obtenue a été tamisée et conservée à l'abri de la lumière.

Afin d'éliminer les graisses, nous avons procédé à une délipidation (dégraissage) des amandes amères broyées, à l'aide d'un soxhlet.

Le soxhlet est composé d'un siphon, dans lequel est placée une cartouche contenant 40g de la poudre d'amande amère. Ce siphon est monté sur un ballon rempli par 200 ml de chloroforme et est surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à une température d'ébullition, durant 2h, dans une chauffe ballon.

Nous avons récupéré la cartouche, contenant les amandes amères broyées et dégraissées et l'huile dissoute dans le solvant.

L'huile d'amande amère a été récupérée par évaporation du solvant à l'aide d'un Rotavapor.

2. Préparation des extraits

Dans le but d'extraire les substances bioactives de l'amande amère, nous avons préparé deux extraits bruts hydro-méthanoliques par l'infusion suivie d'une macération et une décoction.

2.1. Extrait brut préparé par infusion suivie d'une macération

- Dans un bécher, verser 200 ml du mélange « méthanol-eau » (70/30 v/v) bouillant sur 20g de la poudre d'amande amère ;
- Agiter et laisser le mélange refroidir (infusion) ;
- Laisser le mélange macéré durant 48 h (macération) ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat ;
- Evaporer le méthanol à l'aide d'un Rotavapor ;
- Sécher complètement l'extrait dans une étuve à 37°C ;
- Conserver l'extrait obtenu préparé par infusion suivie d'une macération (EIM) à l'abri de la lumière et à 4°C.

2.2. Extrait brut préparé par décoction

- Dans un ballon rodé surmonté d'un réfrigérant, 20g de la poudre d'amande a été mise en contact avec 200ml du mélange « méthanol /eau » (70/30 v/v)) ;
- Chauffer à une température d'ébullition stable pendant 1h, à l'aide d'une chauffe ballon.
- Filtrer et récupérer le filtrat ;
- Evaporer le méthanol à l'aide d'un Rotavapor,
- Sécher complètement l'extrait dans une étuve à 37°C
- Conserver l'extrait obtenu préparé par décoction (ED) à l'abri de la lumière et à 4°C.

2.3. Calcul des rendements

Les rendements obtenus à partir des extraits bruts hydrométhanoliques de la poudre d'amande amère réalisés par infusion suivie d'une macération ou décoction sont calculés à partir de l'équation suivante :

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

R (%) : rendement exprimé en pourcentage.

M1 : masse en gramme « g » de l'extrait sec obtenu.

M0 : masse en gramme « g » du matériel végétal.

3. Tests phytochimiques

Des tests phytochimiques qualitatifs ont été réalisés, pour détecter les principaux groupes chimiques (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, saponines, coumarines, quinones anthraquinones terpénoïdes). Ils sont basés sur des réactions de coloration, de précipitation et d'observation sous lumière ultra-violette.

Dans notre étude qualitative, nous avons utilisé les techniques standards décrites par **(Harborne, 1998; Bruneton, 2009)**.

Les résultats ont été évalués comme suit : +++ fortement positif, ++ moyennement positif, + faiblement positif, - négatif.

❖ Les composés azotés (les alcaloïdes)

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner.

Dans deux tubes à essai, mettre 1 ml de l'extrait à analyser, acidifier le milieu par quelque goutte de HCl (1%) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactifs de Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

❖ Les composés phénoliques

➤ Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à une température ambiante. L'apparition d'une couleur verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence des tanins.

➤ Les flavonoïdes

A 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

➤ Les quinones libres

Introduire dans un tube à essai, 1 ml d'extrait et ajouter 0,1ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). En présence des quinones libres, une couleur qui vire au jaunes, rouge ou violet apparaitre.

➤ **Anthraquinones**

Dans un tube à essai, mettre 1ml d'extrait ensuite ajouter 1ml de NH_4OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

➤ **Les coumarines : Fluorescence UV**

Dans 2 tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait, prendre le premier comme témoin et ajouter à l'autre 0,1ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

❖ **Les composés terpéniques**

➤ **Les saponines : tests de mousse**

Dans un tube à essai introduire 10ml de l'extrait, agiter pendant 15 secondes. Laisser reposer 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm désigne la présence de saponine.

➤ **Terpénoïdes (Test de slakowski)**

A 1 ml de l'extrait ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

❖ **Les composés réducteurs**

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1ml d'extrait et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique signifie la présence des composés réducteurs.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux contenus dans chaque extrait est effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**.

Le principe de cette méthode est basé sur une réaction de coloration par le réactif « Folin-Ciocalteu », de couleur jaune. Ce réactif est constitué d'un mélange, d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_2\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_4$). La réduction de ces acides en présence des polyphénols donne naissance à l'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de

molybdène (MO_8O_{23}) colorés en bleu. Cette coloration dont l'absorbance mesurée à 700 nm est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

➤ **Mode opératoire**

- Mélanger 0,1 ml d'extrait (1mg/ml) avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ;
- Agiter et incuber pendant 5 minutes ;
- Ajouter 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- Lire l'absorbance à 700nm contre un blanc.

En parallèle, une gamme d'étalonnage est préparée, dans les mêmes conditions, à partir d'acide gallique à différentes concentrations de 25 à 500 $\mu\text{g/ml}$ (**Tableau 04**).

Tableau 04 : Méthode de dosage des polyphénols totaux.

	La gamme d'étalon (acide gallique)								Extraits (1mg/ml)	
									EIM	ED
[AC. gallique] $\mu\text{g/ml}$	Blanc	25	50	100	200	300	400	500	-	-
Acide gallique (ml)	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Eau distillée (ml)	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Na_2CO_3 (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agitation et incubation, pendant 5 minutes										
Folin-Ciocalteu (1N) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 minutes										
Mesure de l'absorbance à 700nm										

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de matière végétale sèche ($\mu\text{g EAG/mg ES}$).

4.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des taux de flavonoïdes est estimée par la méthode colorimétrique décrite par (Zhishen et al., 1999).

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes en milieu alcalin, en utilisant le réactif de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et le nitrite de sodium (NaNO_2), en formant un complexe de couleur rose qui absorbe à 510 nm.

➤ Mode opératoire

- Mélanger 250 μl de l'extrait (1mg/ml) avec 1000 μl d'eau distillée et 75 μl du réactif NaNO_2 (15%) ;
- Incuber pendant 6 min à température ambiante ;
- Ajouter 75 μl du chlorure d'aluminium AlCl_3 (10%) ;
- Après 6 min d'incubation, ajouter 1000 μl d'hydroxyde de sodium NaOH (4%) et 100 μl d'eau distillée ;
- Incuber le mélange à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min ;
- Mesurer l'absorbance contre un blanc à 510 nm.

En parallèle, Une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions avec la catéchine à différentes concentrations de (2,5 à 500 $\mu\text{g/ml}$) (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Méthode de dosage des flavonoïdes totaux.

	La gamme d'étalon (catéchine)									Extrait (1mg/ml)	
										EIM	ED
Catéchine µg/ml	Blanc	2,5	25	50	100	200	300	400	500	-	-
Catéchine (µl)	-	250	250	250	250	250	250	250	250	-	-
Extrait (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250
Eau distillée (µl)	1250	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NaNO ₂ (15%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1 ^{ère} incubation pendant 6 minutes à température ambiante											
AlCl ₃ (10%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
2 ^{ème} incubation pendant 6 minutes à température ambiante											
NaOH (4%) (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Eau distillée (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3 ^{ème} incubation à l'obscurité pendant 30 minutes											
Mesure de l'absorbance à 510nm											

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme de matière végétale sèche (µg EC /mg ES).

5. Analyse biologique (Recherche d'effet hémolytique des extraits étudiés)

Afin d'évaluer l'effet hémolytique des amandes amères sur une suspension érythrocytaire du sang humain dans le PBS, deux types d'extraits ont été testés :

- Extrait brut hydro-méthanolique préparé par décoction (ED).

- Extrait brut hydro-méthanolique préparé par infusion suivie d'une macération (EIM).

5.1. Préparation du phosphate buffer saline (PBS)

Afin de préparer une solution tampon de PBS à pH=7.4, nous avons utilisé les composés suivant :

PBS (10mM ; pH=7.4) : composé d'un couple ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans un sérum salé.

5.2. Préparation de la suspension érythrocytaire

- Le sang est prélevé dans un tube hépariné à partir d'un donneur sain ;
- Centrifuger à 4000 tours/ min durant 5 min ;
- Eliminer le plasma (surnageant) et laver le culot deux fois par du PBS (même volume de plasma éliminé) ;
- La suspension érythrocytaire, obtenu est diluée 20 fois par du PBS (10 mM, pH 7,4±0,2).

5.3. Préparation des extraits

Différentes concentrations d'extraits ont été préparées 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml et 400 mg/ml, à partir d'une solution mère d'extrait brut hydrométhanolique de l'amande amère (ED ou EIM) solubilisé dans le PBS.

5.4. L'effet hémolytique des extraits de la plante étudiée

Le test d'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode décrite par **Guo-Xiang et Zai-Qun (2008), OMS (2011)**.

- Mettre dans des tubes 8910 μ l de la suspension érythrocytaire (diluée 20 fois) avec 90 μ l des extraits préparés précédemment en raison d'une concentration par tube ; les concentrations finales des extraits dans le milieu sera 1mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml et 4 mg/ml ;
- Mélanger les tubes délicatement ;
- Incuber les tubes dans l'incubateur agitateur à 37°C durant 60 min ;
- Prélever 500 μ l à T0 (0min) et à 60 min ;
- Ajouter 1500 μ l de PBS ;
- Mélanger les tubes délicatement ;

➤ Centrifuger les tubes à 4000 tours/ min durant 5 min ;

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc.

En parallèle, un tube témoin négatif est préparé. Il est composé de 8910µl de la suspension érythrocytaire et 90µl de la solution tampon du PBS, en absence d'extrait ;

Dans les mêmes démarches expérimentales, un tube dit tube d'hémolyse totale est préparé. Il contient 250µl de culot (non dilué) et 4750µl d'eau distillée, en absence d'extrait.

5.5. Exploitation des résultats

Les résultats sont présentés sous forme des histogrammes de l'évolution d'hémolyse (absorbance à 548nm) durant 60 min dans des tubes contenant de la suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations des extraits.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 min d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{A(\text{extrait 60 min}) - A(\text{Témoin négatif 60 min})}{A(\text{Hémolyse totale 60 min}) - A(\text{Témoin négatif 60 min})} \times 100$$

6. Analyse statistique

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou des valeurs de références plus exactement. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

6.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

6.2. L'écart-type

$$\sigma(x) = \sqrt{V(x)}$$

Résultats Et Interprétations

1. Caractéristiques des extraits préparés

Les rendements d'extraction, l'aspect physique et le solvant de solubilisation des extraits hydro-méthanoliques d'amande amère *Prunus amygdalus* var. *amara* préparés par infusion suivie d'une macération (**EIM**) ou une décoction (**ED**) sont présentés dans le (**Tableau 06**).

Tableau 06 : Rendement, aspect physique et solvant de solubilisation des extraits préparés à partir d'amande amère *Prunus amygdalus* var. *amara*.

Extrait	Aspect physique	Solvant de solubilisation	Rendement (%)
EIM	Cristallisé de couleur jaune	Méthanol-Eau	1,477%
ED	Pate couleur marron	Méthanol-Eau	1,470%

EIM : extrait brut -infusion suivie d'une macération ; **ED** : extrait brut – décoction

Selon les résultats obtenus, nous avons observé que l'extrait préparé par infusion suivie d'une macération a présenté un aspect cristallisé de couleur jaune avec un rendement de 1,477%. Par contre, l'extrait préparé par décoction a présenté un aspect pâteux de couleur marron avec un rendement de 1,470%.

2. Etude photochimique

2.1. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques, réalisés sur les extraits bruts hydro-méthanoliques préparés par infusion suivie d'une macération ou par décoction, nous ont permis de mettre en évidence la présence des différentes familles des métabolites secondaires dans notre plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques ou par UV). Les résultats sont exprimés dans le (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Résultats des tests phytochimiques des extraits hydrométhanoliques d'amande amère *Prunus amygdalus* var. *amara*

Tests phytochimiques		Réactifs	Extraits Eau-méthanol	
			EIM	ED
Alcaloïdes	Réactif de Mayer	Mayer	+++	+++
	Réactif de Wagner	Wagner	+++	+++
Tanins		FeCl ₃	-	-
Flavonoïdes		HCl+Mg ₂	+++	+
Quinones libres		NaOH (1%)	+++	+
Anthraquinones		NH ₄ OH	-	-
Coumarines		Fluorescence UV	-	-
Saponines		Indice de mousse	+++	-
Terpénoïdes		Test de Slakowski	+++	++
Composés réducteurs		Liqueur de Fehling	++	+++

EIM : extrait brut - infusion suivie d'une macération ; **ED** : extrait brut - décoction.

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif.

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous avons noté que *Prunus amygdalus* var. *amara* est riche en flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres, saponines, terpénoïdes et en composés réducteurs.

Les alcaloïdes sont fortement positifs dans les deux extraits préparés.

Les flavonoïdes et les quinones libres sont fortement positifs dans l'extrait **EIM** et faiblement positifs dans l'extrait **ED**.

Les saponines sont fortement présents dans l'extrait **EIM** et absents dans l'extrait **ED**.

Les terpénoïdes sont fortement positifs dans l'extrait **EIM** et moyennement positifs dans l'extrait **ED**. Contrairement, les composés réducteurs sont moyennement positifs dans l'extrait **EIM** et fortement positifs dans l'extrait **ED**.

Par contre, les tanins, les anthraquinones et les coumarines sont absents dans tous les extraits préparés de *Prunus amygdalus* var. *amara*.

2.2. Dosage des composés phénoliques

2.2.1. Dosage des polyphénols Totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits préparés de *Prunus amygdalus* var. *amara* a été réalisé par la méthode de coloration de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait sec (μg EAG/mg ES), en utilisant la formule de la régression linéaire $Y=0,002x$ de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,996 (Figure 13).

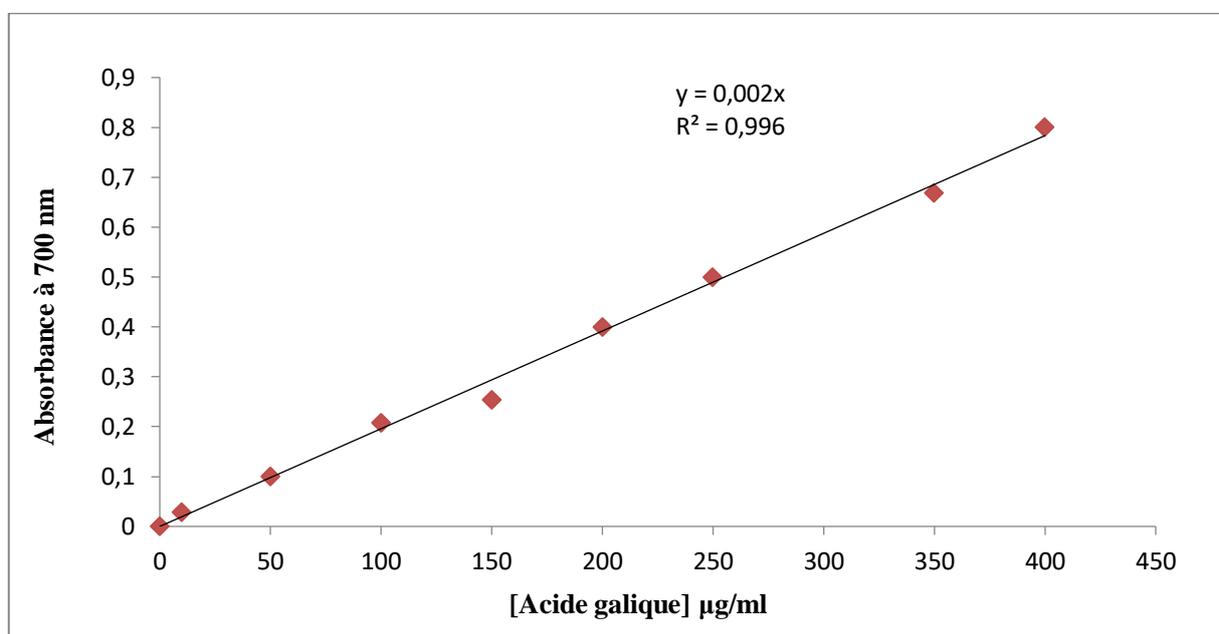
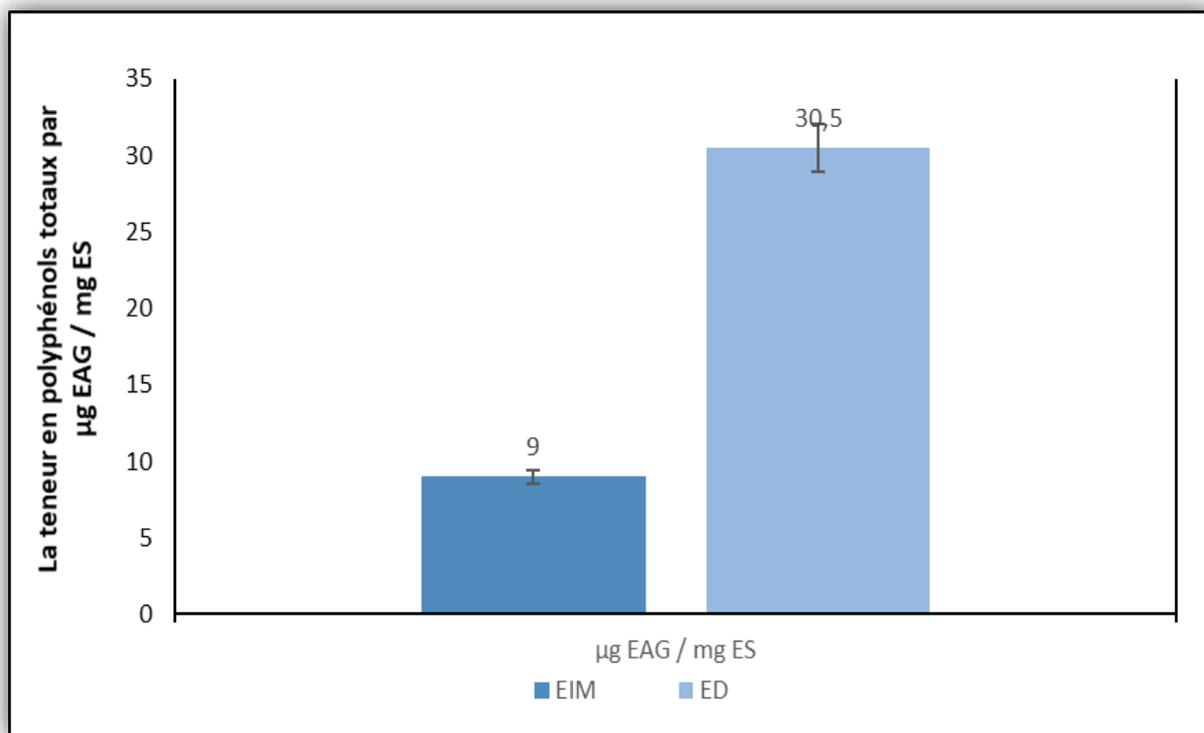


Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

La figure 14 présente les teneurs en polyphénols totaux (μg EAG/mg ES) des extraits préparés de *Prunus amygdalus* var. *amara*.



EIM : Extrait brut- Infusion suivie d'une macération ; **ED** : Extrait brut- Décoction

Figure 14 : la teneur en polyphénols totaux (µg EAG/mg ES) des extraits préparés de *Prunus amygdalus var. amara*

D'après les résultats obtenus, nous avons signalé que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction est la plus élevée par rapport à celle de l'extrait préparé par infusion suivie d'une macération. Elles sont respectivement d'ordre de $30,50 \pm 22,18$ µg EAG/mg ES ; $9 \pm 5,5$ µg EAG/mg ES.

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits préparés de *Prunus amygdalus var. amara* a été réalisé selon la méthode de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ en utilisant comme standard la catéchine. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait sec (µg EC/mg ES), en utilisant la formule de la régression linéaire $Y=0,0026x$ de la courbe d'étalonnage tracée de la catéchine avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,9925.

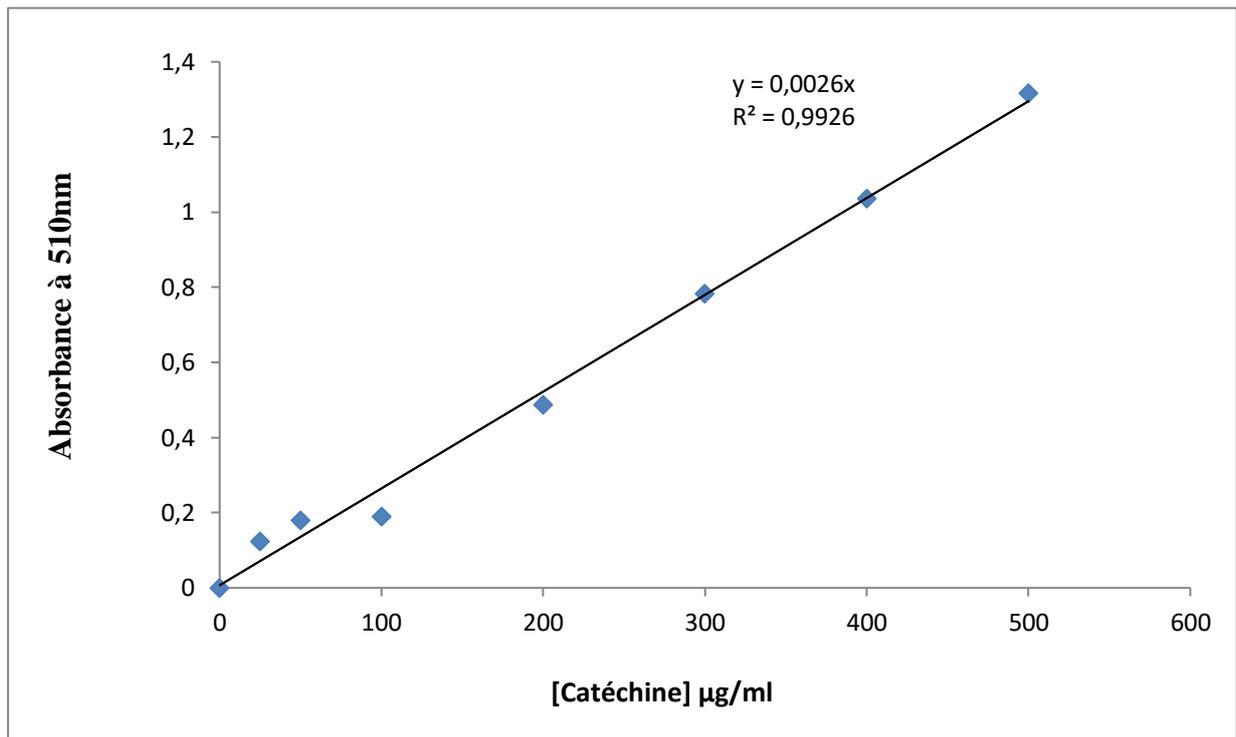
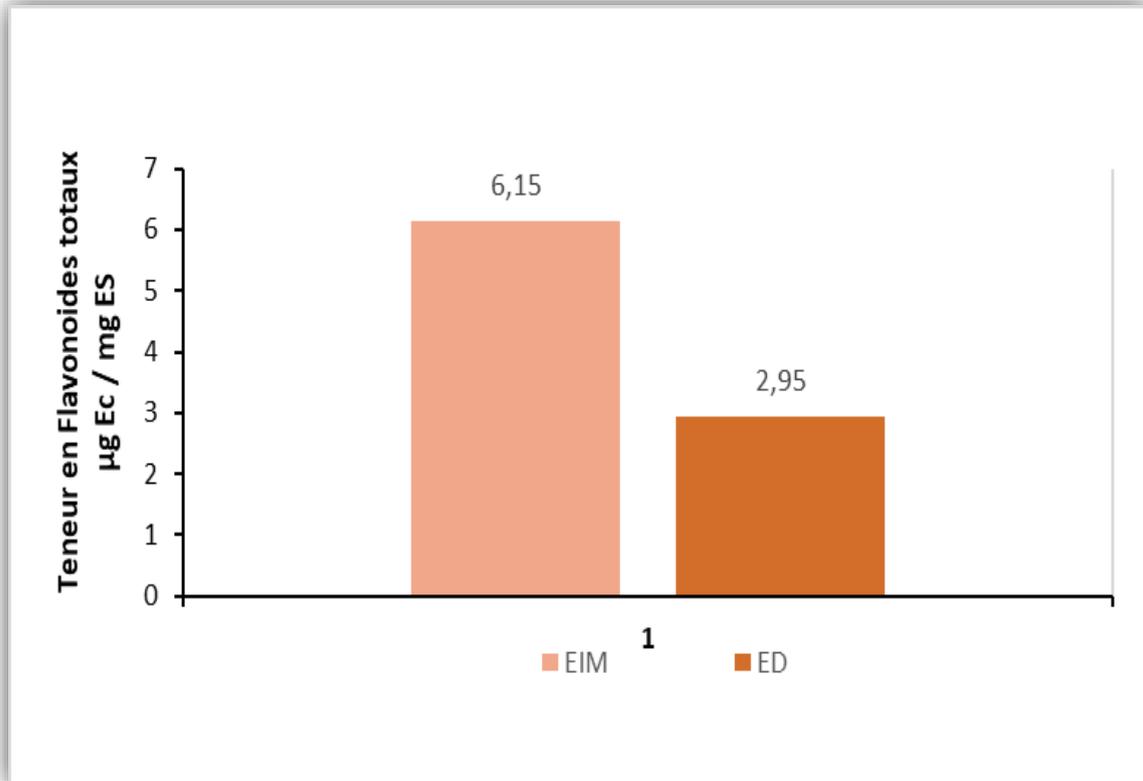


Figure 15 : La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

La figure 16 présente les teneurs en flavonoïdes (μg EAG/mg ES) des extraits préparés de *Prunus amygdalus* var. *amara*.



EIM : Extrait brut- Infusion suivie d'une macération

ED : Extrait brut- Décoction

Figure 16 : la teneur en flavonoïdes (μg EC/mg ES) des extraits préparés de *Prunus Amygdalus* var. *amara*.

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que la teneur en flavonoïdes de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par infusion suivie d'une macération est élevée par rapport à celle de l'extrait préparé par décoction. Elles sont respectivement d'ordre de $6,15 \pm 3,35 \mu\text{g}$ EC/mg ES ; $2,95 \pm 1,73 \mu\text{g}$ EC/ mg ES.

3. Analyse biologique

3.1. L'évaluation de l'effet hémolytique de l'amande amère

Les tests d'effet hémolytique ont été réalisés durant 60 min, dans un milieu tampon PBS ($\text{pH}=7,4 \pm 0,2$) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C et en présence des différentes concentrations des extraits hydro-méthanoliques de *Prunus amygdalus* var. *amara*

(100 mg/ml ; 200 mg/ml ; 300 mg/ml ; 400 mg /ml), préparés par décoction ou infusion suivie d'une macération (**Figure 17 et 18**).

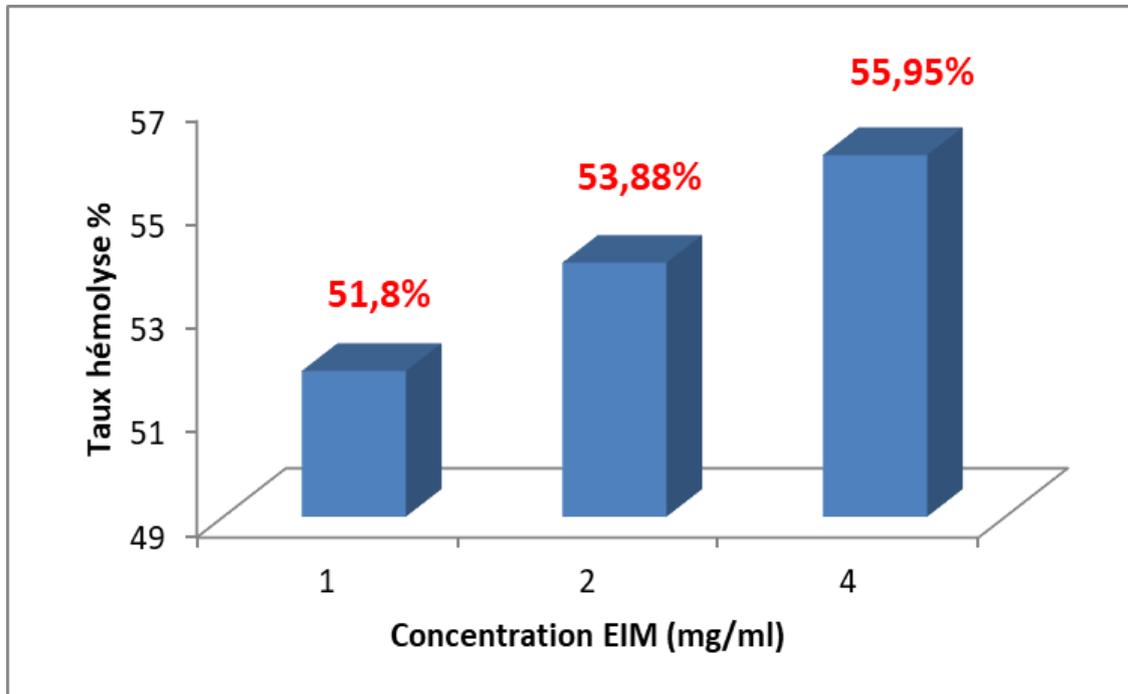


Figure 17 : Taux d'hémolyse (%), des érythrocytes incubés 60 min, à 37°C en présence des différentes concentrations d'amandes amères préparés par infusion suivie d'une macération (EIM)

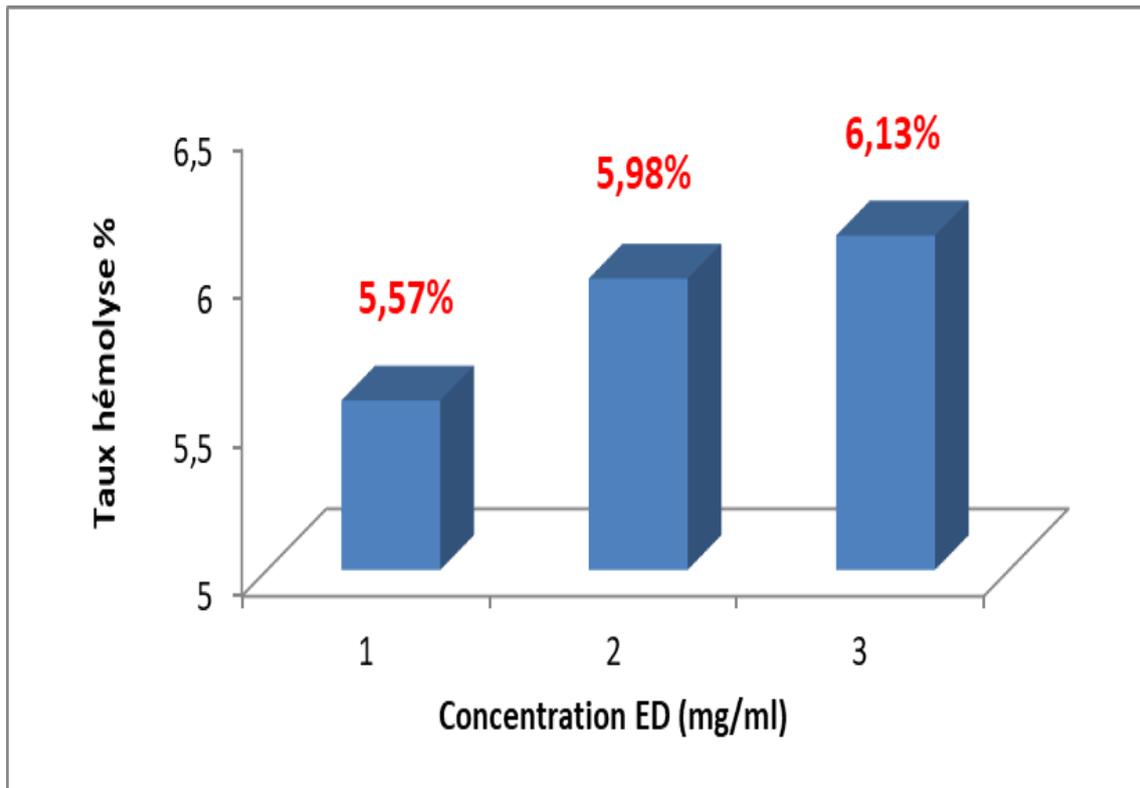


Figure 18 : Taux d'hémolyse (%), des érythrocytes incubés 60 min, à 37°C en présence des différentes concentrations d'amandes amères préparés par Décoction (ED)

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que le taux d'hémolyse augmente en fonction des concentrations des extraits hydrométhanoliques de *Prunus amygdalus* var. *amara* (1 mg/ml ; 2 mg/ml ; 3 mg/ml ; 4 mg/ml), préparés par décoction ou infusion suivie d'une macération.

De même, nous avons noté que l'extrait brut hydro-méthanolique préparé par infusion suivie d'une macération de l'amande amère a enregistré les taux d'hémolyses les plus élevés d'ordre 51,8 ; 53,88 et 55,95 % pour les concentrations 1 mg/ml ; 3 mg/ml et 4 mg/ml respectivement. Ces Taux sont largement supérieurs par rapport à ceux présentés par l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction et qui a enregistré des taux d'ordre de 5,57 ; 5,98 et 6,13% pour les concentrations 1 mg/ml, 2 mg/ml et 3 mg/ml, respectivement.

Discussion

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps et elles sont encore utilisées dans le monde entier, pour traiter diverses maladies. Elles représentent la base de la médecine moderne d'aujourd'hui, et participent amplement aux préparations médicamenteuses commerciales dont 25% des médicaments prescrits dans le monde proviennent des plantes (**Wachtel-Galor et Benzie, 2011**).

A cet effet, nous nous sommes intéressées à une plante à caractère médicinale. Il s'agit de *Prunus amygdalus* var. *amara*. C'est une plante originaire de la région méditerranéenne d'Asie, appartient à la famille des rosacées (**Moradi et al., 2017**).

La présente étude a pour objectif de déterminer les substances bioactives présentes dans l'amande amère, par le biais d'un screening phytochimique sur des extraits hydrométhanoliques, un dosage des composés phénoliques et une évaluation de l'activité hémolytique des extraits bruts hydrométhanoliques de l'amande amère.

Les tests phytochimiques, que nous avons effectués sur les extraits hydrométhanoliques préparés par infusion suivie d'une macération ou par décoction de l'amande amère, ont révélé la richesse de cette plante en flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres, terpénoïdes, et composés réducteurs dans les deux préparations et la présence des saponines seulement dans l'extrait préparé par infusion suivie d'une macération. Par contre, nous avons signalé l'absence des tanins, anthraquinones et coumarines dans les deux extraits. Par ailleurs, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature vu le manque d'études sur les propriétés phytochimiques de l'amande amère.

Une étude faite par **Al-Deen et al., (2019)** sur *Prunus Dulcis* a noté la présence de flavonoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes, saponines en plus les tanins, glycosides, phénols et les acides aminés.

En parallèle des tests qualitatifs, nous avons réalisé le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Les résultats obtenus, ont montré que l'extrait préparé par décoction présente une teneur en polyphénols totaux supérieure à celle de l'extrait préparé par infusion suivie d'une macération d'ordre de $30,50 \pm 22,18$ μg EAG/ mg ES et $9 \pm 5,5$ μg EAG/mg ES, respectivement.

Alors que l'extrait préparé par infusion suivie d'une macération est le plus riche en flavonoïdes ($6,15 \pm 3,35$ μg EC/ mg ES) par rapport à l'extrait préparé par décoction ($2,95 \pm 1,73$ μg EC/ mg ES).

Ces résultats obtenus sont supérieurs par rapport à ceux présentés par **Amanzougarene, (2019)** qui a marqué une teneur d'ordre de $4,937 \pm 4,515$ mg/100g en polyphénols totaux et $1,534 \pm 0,107$ mg/100g en flavonoïdes pour l'extrait de la même plante mais de la région de Sétif.

D'autre part, **Barreira et al., (2008)** ont enregistré une teneur des polyphénols et des flavonoïdes dans la gamme de $(9,22 \pm 1,04$ à $163,71 \pm 3,04$ mg EAG/g) et $(6,24 \pm 1,36$ à $25,02 \pm 8,43$ mg EC/g), respectivement dans les extraits de dix amandes cultivés.

Une autre étude a été faite par **Esfahlan et Jamei ,(2012)** sur dix espèces d'amandes sauvages a marqué une teneur de polyphénols dans la gamme de $(184,1 \pm 2,32$ mg EAG/ g à $482,3 \pm 1,22$ mg EAG/g) et une teneur de flavonoïdes dans la gamme de $(11,3 \pm 1,16$ mg EC/g à $35,6 \pm 1,11$ mg EC/g).

Depuis longtemps, les plantes médicinales sont reconnues par leurs effets thérapeutiques. Par ailleurs, elles n'ont pas que des effets bénéfiques, elles peuvent avoir des effets toxiques.

De ce fait, nous avons choisi les globules rouges comme modèle de la biologie cellulaire pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro*, à cause de leur facilité d'isolement, leur disponibilité et leur caractère d'hémolyse (**Wajeman et al., 1992**).

Les résultats de l'effet hémolytique d'extrait brut hydrométhanolique de l'amande amère préparé par infusion suivie de macération ont montré que cette plante à un effet toxique très élevé face aux érythrocytes isolés, avec un taux d'hémolyse de 55,95% à une concentration de 4 mg/ml par rapport à l'hémolyse totale.

Par contre, l'extrait hydrométhanolique préparé par décoction a présenté un taux d'hémolyse d'ordre de 6,13% à une concentration de 3 mg/ml.

En définitive, il est difficile de comparer nos résultats par rapport à la littérature, Notons qu'on n'a pas trouvé des études faites sur l'activité hémolytique des extraits d'amande amère.

En outre, des études ont été effectuées sur d'autres plantes récoltées dans la région de Tlemcen et qui ont subi le même protocole.

Chabane, (2016) a marqué un taux d'hémolyse d'ordre 7,1% à une concentration de 2mg/ml par rapport à l'hémolyse totale d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne d'*Artemisia absinthium L* préparé par infusion et un taux élevé d'ordre 85,9% pour la même concentration pour l'extrait préparé par macération.

Ainsi, **Bekkar et Zerrad , (2019)** ont enregistré un taux faible d'ordre de 1,58% ; 1,76% ; 2,51% par rapport à l'hémolyse total à une concentration de 2 mg/ml d'extraits hydrométhanoliques bruts des feuilles de *Nerium oleandre* préparés respectivement par infusion, décoction et macération.

De nombreuses études ont démontré la toxicité de l'amande amère. Cependant, la consommation de 60 amandes est mortelle chez l'adulte. Chez le jeune enfant 5 à 10 amandes est suffisante pour entraîner la mort (**Hammiche et al., 2013**)

Malgré sa toxicité, l'amande amère est très précieuse en médecine traditionnelle et moderne (**Moradi et al., 2017**), elle a un nombre important de propriétés médicinales et thérapeutiques.

Conclusion
Et
Perspectives

Les plantes médicinales sont connues depuis longtemps par leurs propriétés thérapeutiques. Elles sont caractérisées par la présence de nombreux composés bioactifs. Dans ce travail nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et la recherche d'un éventuel effet hémolytique des extraits bruts hydrométhanoliques de l'amande amère (*Prunus amygdalus* var. *amara*) récoltée de la région de Ghazaouet, Wilaya de Tlemcen.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que :

- Les extraits hydrométhanoliques de l'amande amère sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, terpénoïdes, quinones libres et composés réducteurs.
- Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la plante a révélé que l'extrait préparé par décoction est le plus riche en polyphénols avec une teneur de l'ordre de $30,50 \pm 22,18 \mu\text{g EAG/ mg ES}$.
- L'extrait préparé par infusion suivie d'une macération est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur d'ordre de $6,15 \pm 3,35 \mu\text{g EC/ mg ES}$.
- Les tests d'effet hémolytique ont montré que l'extrait hydrométhanolique préparé par infusion suivie d'une macération de l'amande amère a les taux d'hémolyses les plus élevés d'ordre 51,8 ; 53,88 et 55,95 % pour les concentrations (1 mg/ml ; 3 mg/ml ; et 4mg/ml) respectivement.

En perspective, ce travail reste préliminaire. Il serait intéressant d'effectuer d'autres techniques et méthodes :

- L'étude de la pompe Na^+/K^+ de la membrane érythrocytaire pour mieux comprendre le mécanisme de cytotoxicité de la plante.
- Evaluer la toxicité de cette plante *in vivo*, sur un modèle animal, en raison de déterminer les doses létales aiguës et chroniques.
- L'identification des principes actifs responsables de la toxicité de la plante.
- Déterminer d'autre activité comme : l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne etc.

Références Bibliographiques

- APG III (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105-121.
- Agbor G.A., Oben J.E., Ngogang J.Y., Xinging C., Vinson, J.A., (2005).** Antioxidant capacity of some herbs/spices from Cameroon: A comparative study of two methods J. Agric. Food. Chem. 53 : 6819-6824.
- Alain D., (2002).** Guide du traitement des déchets. 3^{ème} Edition. Dunod. Paris.
- Amrane H., Babahani M., (2017).** Recherche des extraits végétaux à activité anti hémolytique. Mémoire de master en biochimie appliquée, Université Bejaia (Algérie).
- Abbou F., (2016).** Etude phytochimique, évaluation de l'activité antiradicalaire et recherche d'effet hémolytique d'extraits isolés de la partie aérienne d'*Ajuga Iva* L. Schreb. (Chendgora). Mémoire de master en biochimie appliquée, Université Tlemcen (Algérie).
- Azzi R., (2013).** Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse doctorat en biochimie, université Tlemcen (Algérie).
- Aguilar–Martinez P., 2007 :** H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- Al-Deen A.M.T., ALhaidari S.A., Al-Kaf A.G., Al-Hadi. F., et Al Mahbashi A., (2019).** Phytochemical screening and thin layer chromatographic of *Prunus dulcis* (Almond) medicinal plant leaves used in folk medicine for treatment of wounds and burns in hufash district al mahweet Governorate-Yemen. Universal Journal of Pharmaceutical Research 4(2) : 19-23.
- Amanzougarene M., (2019).** Caractérisation physico-chimique des deux variétés de l'amandier algérien (Bejaia, Bouira et Sétif) : *prunus amygdalus amarus* et *prunus amygdalus dulcis* ». Mémoire de master en biotechnologie alimentaire, Université Mostaganem (Algérie).
- Avaligbe C .T., Moudachirou M., Salomé Kpoviessi D.S., Accrombessi G.C., et Gbeassor M., (2012).** Antihemolytic Properties of Extracts of Six Plants Used in the Traditional Treatment of Sickle Cell Disease in Benin. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6.
- Badiaga M., (2012).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, Français.
- Barreira João C.M., Ferreira Isabel C.F.R., Oliveira M. Beatriz P.P., et Pereira J.A., (2008).** Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Ten Portuguese Regional and Commercial Almond Cultivars. Food and Chemical Toxicology 46 (6): 2230-2235.

Références bibliographiques

- Bekkar R., Zerrad F., (2019).** Etude phytochimique et recherche de l'effet hémolytique des extraits des feuilles de *Nerium oleander L* (Defla) de la région de Tlemcen. Mémoire de master en toxicologie industrielle et environnementale, Université Tlemcen (Algérie).
- Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} Ed Technique et Documentation Lavoisier. Paris : 945.
- Bruneton J., (2008) :** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 5^{ème} Ed Paris, Lavoisier Tech & Doc.
- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition Technique et Documentation. Paris : 370-401.
- Bismuth C., Baud F., Conse F., Fréjaville P.P et Garnier R., (1987).** Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris : 956.
- Bhat S.V., Ngasampagi B.A., Sivakumar M., (2005).** Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India. Ch. 4 : 237.
- Benaissa M., (2015).** Tests phytochimiques, dosage et recherche d'effet hémolytique des flavonoïdes extrait de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*. Mémoire de master en biochimie appliquée, Université Tlemcen (Algérie).
- Chevallier A., (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Paris : Larousse.
- Chabane S., (2016).** Etude phytochimique et recherche d'effet hémolytique des extraits isolés de la partie aérienne d'*Artemisia absinthium L* (chiba). Mémoire de master en biochimie appliqué, Université Tlemcen (Algérie).
- Dillemann G., (1961).** Plantes médicinales et principes actifs. La notion de race chimique. Bulletin de la Société Botanique de France 108 (sup1) : 30-38.
- Debaisieux F., Poles J-M., (2009).** Plantes médicinales : Secret et remède d'autrefois Edition Debaisieux : 118.
- Esfahlan A.J. et Jamei R., (2012).** Properties of Biological Activity of Ten Wild Almond (*Prunus Amygdalus L.*) Species. Turkish Journal of Biology 36(2):201-209.
- Esfahlan A. J., Jamei R., Esfahlan R.J., (2010).** The Importance of Almond (*Prunus Amygdalus L.*) and Its By-Products. Food Chemistry 120 (2): 349-360.
- Evreinoff V. A., (1952).** Quelques observations biologiques sur l'Amandier. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée 32 (359) : 442- 459.
- Elqaj M., Ahami A., Belghyti D., (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques", (Maroc): 22
- El Alaoui R., (2015).** Contribution à la recherche d'effet hémolytique à partir d'extraits de *Berberis vulgaris L*. Mémoire de master en biochimie appliquée, Université Tlemcen (Algérie).

Références bibliographiques

- Gomaa E.Z., (2013).** In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antitumor Activities of Bitter Almond and Sweet Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) Kernels. Food Science and Biotechnology 22 (2):455-463.
- Gurib-Fakim A., (2006).** Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27 (1): 1-93.
- Grosmond G.,(2001).** La phytothérapie Bulletin des GTV, HS : Elevage et agriculture biologique, Métabolites des plantes :143-145.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., (2001).** Le préparateur en pharmacie. Ed. Médicales Internationales. Paris : 108-119.
- Gravot A., (2009).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire d'Antoine Gravot, Equipe pédagogique Physiologie Végétale. Université de Rennes.
- Guo-Xiang L et Zai- Qun L.,(2008).** The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. Food and chemical Toxicology 46: 886-892.
- Giada R.,(2013).** Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidants power, in book: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A role for antioxidants.Chapter: 4.Publisher: Intech Publisher.Editors: José A. Moralez-González: 93-95.
- Ghasemzadeh A., (2011).**Flavonoids and Phenolic Acids: Role and Biochemical Activity in Plants and Human. Journal of Medicinal Plants Research 5 (31): 6697- 6703.
- Hammiche V., Merad R., et Azzouz M. (2013).** Amandier amer. In Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen, Paris : Springer Paris : 29-37.
- Harborne J.B., (1998).** Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall Thomson Science (UK); 3^{ème} ed.: 203-234.
- Hopkins., (2003).** Physiologie végétale.2^{ème} édition. Boeck: 276-280.
- Harborne J.B., Williams C.A., (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.
- Hagerman A.E., (2002).** Tannin Handbook. 2nd Edition. Miami University. Oxford. USA:116.
- Keser S., Demir E., et Yilmaz O., (2014).** Some Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of the Bitter Almond Kernel (*Prunus Dulcis* Var. Amara). Journal-Chemical Society of Pakistan 36(5) :922-930.
- Krief S., (2003) :** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat, muséum national d'histoire naturelle (France).
- Kabouche A., (2005).** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiacées. Thèse de doctorat en chimie. Université Mentouri-Constantine (Algérie).

Références bibliographiques

- Khenaka K., (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogène seruminale chez l'ovine, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine : 19-24.
- Lapointe G., (2004).** Notions de toxicologie. Montréal : Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec.
- Loukkas A.,(2006).** Atlas des parcs nationaux algériens. Edition Diwane : 87-88.
- Laroche L.H.,2001 :** Toxicologie générale : 25.
- Lévy J.P., Varet B., Clauvel J.P., Lefrère F., Bezeaud A., Guillin M.C., (2008).** Hématologie et transfusion. 2^{ème}Ed Elsevier Masson : 24-29.
- Macheix., Jean-Jacques., (1996).** Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ? . Acta Botanica Gallica 143 (6) : 473-479.
- Menche N., Raichl G., Prudhomme C., d'Ivernois J.F., (2014).** Biologie, anatomie, physiologie. Ed. Maloine. Paris.
- Moayedi A., Rezaei K., Moini S., Keshavarz B., (2011).** Chemical Compositions of Oils from Several Wild Almond Species. Journal of the American Oil Chemists' Society 88 (4): 503- 508.
- Mehta A. B., Hoffbrand A. V., (2003).**Hématologie, Paris : De Boeck : 66-67
- Moradi B., Heidari-Soureshjani S., Asadi-Samani M., Yang Q., (2017).** A Systematic Review of Phytochemical and Phytotherapeutic Characteristics of Bitter Almond. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research 7 (2):1-9.
- Malecky M.,(2006).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat de l'institut des sciences et des industries du vivant de l'environnement (Agro Paris Tech), spécialité physiologie de la nutrition animal (biotechnologie), France.
- Montgomery C.A.,(1990).** Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé), (2000).** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relative à la médecine traditionnelle. WOH/TRM/2000.1 ; annexe II : 31-35.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), (2011).**Quality control methods for herbal materials: 43-44.
- Peronny S.,(2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta). Thèse de doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris : 12.
- Reille M., Maurice J.,(2015).** Dictionnaire visuel des arbres et arbustes communs. Paris : Ulmer.
- Sébahoun G.,(2006).** Hématologie clinique et biologique. Ed. Rueil-Malmaison : Arnette.
- SchauEenberg P., Paris F., (2013).** Le guide du Naturaliste : guide des plantes médicinales. 2^{ème} Ed.Delachaux en Niestlé : 1977-2006.

Références bibliographiques

- Schauenberg P., Paris F., (1997).** Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris : 396.
- Serve L., Piovetti L., Longuemard N., (2008).** Dosage des acides et aldéhydes phénoliques par chromatographie liquide haute-performance. *Journal of chromatography* 259 (1983): 319-328.
- Soumyanath A., (2006).** Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic plants. CRC Press (Taylor Francis Group) 6: 19-82.
- Saad B., Azaizeh H., Abu-Hijleh G., Said O., (2006).** Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-Based Complement. *Alternat. Med.* 3(4): 433-439.
- Singh R. P., et G. Kaur., (2008).** Hemolytic Activity of Aqueous Extract of *Livistona Chinensis* Fruits . *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 553-556.
- Tortora G. J., Derrickson B.H., Martin L., (2014).** Manuel d'anatomie et de physiologie humaines. Ed. De Boeck. Bruxelles.
- Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillon S.S.,(2003).**Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration *J. Ethnopharmacol.* 88: 19-44.
- Tron I., Piquet O., Beart A., (2002).** Toxon : manuel de toxicologie, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie : 26-34.
- Trevoux R., Arnal-Schnebelen B., Schnebelen J.,(2000).** Interactions médicamenteuses Interactions entre les plantes médicinales et la médication traditionnelle. *Actualités reproduction humaine; VIII (1) : 28-32.*
- Thomas L.,2013:** Haemolysis as influence and interference factor. *JIFCC* 13:4.
- Vermerius W., Nicholson R., (2006).** Phenolic compounds biochemistry. Ed. Springer. Gainesville. USA: 285.
- Wachtel-Galor S., Benzie I.F.F, (2011).** Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2^{ème} Ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Wajeman H., Lantz B., Girot R., (1992) :** Les maladies des globules rouges. *Méd. Sci. Flammarion* : 471-475.
- Wichtl M., Anton R., (1999) :** Plantes thérapeutiques : traditions, pratiques officinales, science et thérapeutique. Paris : Tec&Doc: 636.
- Yada S., Lapsley k., Huang G., (2011).** A Review of Composition Studies of Cultivated Almonds: Macronutrients and Micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (4-5): 469-480.
- Zahalka., Jean-Philippe., (2005).** Les plantes en pharmacie: propriétés et utilisations. Guide pratique. Paris : Dauphin.
- Zebbiche Y., Rebai I., Azzouz M., Abtroun R., Reggabi M., et Alamir B., (2013).** Dosage des cyanures dans les amandes amères et les noyaux d'abricot par chromatographie en phase

Références bibliographiques

gazeuse à détecteur ionisation de flamme en mode Head Space (HS-CPG-FID). *Annales de Toxicologie Analytique* 25 (2) : 41-45.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry* 64 (4): 555-559.

Zeggwagh A. A., Lahlou Y., et Bousliman Y., (2013). Survey of Toxicological aspects of herbal medicine used by a herbalist in Fes, Morocco. *The Pan African Medical Journal* 14: 125.