



République Algérienne Démocratique et populaire  
Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers  
Département de Biologie  
Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

**Mémoire**  
**En vue de l'obtention du diplôme**  
**Master en biologie**  
**Option : Biochimie appliquée**

**Thème :**

Tests phytochimiques, dosage et recherche  
d'effet hémolytique des polyphénols totaux  
extraits de la partie aérienne d'*Ammonoïdes*  
*verticillata*.

Présenté Par : **Haoulia Amina**

Soutenu le : **01/07/2015**

Devant le jury composé de :

**M. LAHFA Boucif Farid**

**M.C.A**

**Président**

**M.RAHMOUN Mohammed Nadjib**

**M.C.B**

**Examineur**

**M.AZZI Rachid**

**M.C.B**

**Promoteur**

Année Universitaire : 2014- 2015

## ***Remerciements***

*Avant toute, je tiens à remercier Dieu pour m'avoir donnée la force et la patience*

*En premier lieu, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur **Azzi R.**, Maitre de conférences au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) pour sa confiance, son attention, ses qualités humaines pour cela je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.*

*Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissances et en espérant être à la hauteur de votre confiance.*

*Que Monsieur **Lahfa F.**, Maitre de conférence classe A au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), de m'avoir fait l'honneur de présider cette jury.*

*J'exprime également mes sincères remerciements à Monsieur **Rahmoun M.N.**, Maitre de conférence au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.*

*Je tiens à remercier Madame **Boucherit Z.**, Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) directrice du laboratoire Antibiotique Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique, pour ces conseils et ses encouragements.*

*Mes remerciements s'adressent également au dirigeant et aux personnels du laboratoire Antibiotique Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.*

# *Dédicaces*

*Je dédié ce travail à :*

*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 mon marie pour le patiences, encouragements tout au long de mon parcours.*

*A mon bébé Rayane la bonheur de ma vie qui ma donné la joie et force pour réaliser ce travail.*

*A mes chère frères et sœurs, Abdessamad, Hakim et Zineb.*

*A mes grands-pères et mes grands-mères .*

*Mes oncles, tantes, a toutes la famille Haoulia, Maasri et Benkhalfoune.*

*A toutes mes amis, surtout mes meilleur Mounia, Soumia et Ibtissem.*

## ***Résumé***

Notre travail porte sur une plante médicinale (*Ammoides verticillata*) qui est très utilisée comme médicament en thérapie traditionnelle dans diverses pathologies.

L'intérêt de notre étude est de contribuer à l'analyse phytochimique, dosage et la recherche d'effet hémolytique des polyphénols totaux de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* récoltée dans la région de Zelboune Wilaya de Tlemcen.

L'analyse phytochimique de la plante a révélé la présence d'alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes, coumarines et les composés réducteurs.

Les résultats ont montré un effet hémolytique important d'extrait brut de polyphénols qui dépasse 65% par rapport d'un témoin positif représenté par l'hémolyse totale.

Par contre, cet effet est non significative à des concentrations faibles (0,42 ; 0,82 ; 1,67 mg/ml) avec un taux d'hémolyse enregistré d'ordre 4,78% ; 10,17 % ; 21,11% respectivement.

Mots clés : *Ammoides verticillata*, analyse phytochimique, effet hémolytique, polyphénols totaux.

## ***Abstract***

The work is about a medicinal plant (*Ammoides verticillata*) which is widely used as a traditional medicine therapy in various pathology.

The interest of this study is to contribute to the phytochemical analysis, dosage and finding hemolytic effect of total polyphenols of the aerial part of *Ammoides verticillata* harvested area Zelboune Wilaya of Tlemcen.

The results showed a significant hemolytic effect of crude extract of polyphenols which affects 65% compared to a positive control represented by the total hemolysis.

By against, this effect is not significant at low concentrations (0.42; 0.82; 1.67 mg / ml) with hemolysis rate recorded of order 4.78%; 10.17%; 21.11% respectively.

Keywords: *Ammoides verticillata*, phytochemical analysis, hemolytic effect, total polyphenols.

## ملخص

يركز هذا العمل على نبتة النونخة المستعملة كدواء لعدة امراض في العلاج التقليدي، وتكمن أهمية هذه الدراسة في مقارنة التحليلات الكيميائية النباتية لمستخلص البوليفينول للجزء العلوي لنبتة النونخة جمعت من منطقة زلبون ولاية تلمسان.

كشفت التحليل الكيميائي النباتي وجود الالكلويدات الفلافونويد ومركبات التاربيينويد والكومارين بالإضافة الى السكريات المرجعة.

فيما أظهرت نتائج الفحص البيولوجي تأثير مستخلص للبوليفينول على كريات الدم الحمراء الذي فاق 65% مقارنة مع الانحلال الكلي. بالمقابل يعد هذا التأثير منخفض بالنسبة للتركيز الأخرى (0,42 , 0,82 , 1,67 مع/مل) فيما يتعلق بانحلال كريات الدم الحمراء ل 4,78% 10,17% 21,11% على التوالي.

الكلمات المفتاحية: نبتة النونخة، التحليل الكيميائي النباتي، تأثير انحلال الدم، إجمالي البوليفينول.

## Liste des figures

### Partie : Synthèse bibliographique.

<b>Figure 1:</b> Structure des dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.....	06
<b>Figure 2 :</b> Structure de base des coumarines.....	07
<b>Figure 3 :</b> Structure de base des quinones.....	07
<b>Figure 4:</b> Structure des tanins condensés.....	08
<b>Figure 5 :</b> Structure des tanins hydrolysables.....	09
<b>Figure 6 :</b> Structure des flavonoïdes.....	10
<b>Figure 7 :</b> Structure des anthocyanes.....	10
<b>Figure 8 :</b> Structure de quelque alcaloïde.....	11
<b>Figure 9:</b> Structure de base des isoprénoides.....	11
<b>Figure 10:</b> structure de la membrane du globule rouge.....	15
<b>Figure 11 :</b> Ammoides verticillata (partie aérienne).....	17

### Partie : Expérimentale

<b>Figure 12 :</b> protocole d'extraction des polyphénols totaux.....	26
<b>Figure 13:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	3
<b>Figure 14 :</b> L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extrait brut de polyphénols de la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> , incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.....	32
<b>Figure 15:</b> L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extrait brut de polyphénols de la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> , incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.....	33
<b>Figure 16 :</b> Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> , après 60 min d'incubation par	

rapport à l'hémolyse

total.....34

## Liste des tableaux

### *Partie : Synthèse bibliographique*

<b>Tableau 01</b> : Rôles et activités des composées phénoliques.....	<b>12</b>
<b>Tableau 02</b> : Classification botanique d' <i>Ammoides verticillata</i> selon APG III.....	<b>18</b>
<b>Tableau 03</b> : l'étude phytochimique d' <i>Ammoides verticillata</i> .....	<b>19</b>
<b>Tableau 04</b> : Utilisation thérapeutique d' <i>Ammoides verticillata</i> .....	<b>20</b>

### *Partie : Expérimentale*

<b>Tableau 05</b> : aspect, rendement en extrait sec et solvant de solubilité des différentes modes d'extraction.....	<b>30</b>
<b>Tableau 06</b> : Résultats des tests phytochimique sur la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> selon différentes modes de préparations.....	<b>31</b>



## *Liste d'Abbreviations*

**APG III** : Groupe Phylogénie Angiospermes.

**DL 50** : Dose Létale 50.

**DL 100** : Dose létale 100.

**H.T** : Hémolyse Totale.

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**PBS** : Phosphate Bufferes Saline.

**Susp** : Suspension.

# *Table des matières*

*Remerciement*

*Résumé*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

## *Partie Synthèse bibliographique*

<i>1.Introduction.....</i>	<i>1</i>
<i>2. Phytothérapie.....</i>	<i>3</i>
<i>3. Avantage de la phytothérapie.....</i>	<i>4</i>
<i>4. Les métabolites secondaires.....</i>	<i>4</i>
<i>4.1.Les composés phénoliques.....</i>	<i>5</i>
<i>4.1.1.Classification des composés phénoliques.....</i>	<i>6</i>
<i>4.1.1.1. Acides phénoliques.....</i>	<i>6</i>
<i>4.1.1.2.Coumarines.....</i>	<i>7</i>
<i>4.1.1.3. Quinones.....</i>	<i>7</i>
<i>4.1.1.4.Tanins.....</i>	<i>8</i>
<i>4.1.1.5. Tanins condensés.....</i>	<i>8</i>
<i>4.1.1.6.Tanins hydrolysables.....</i>	<i>9</i>
<i>4.1.1.7.Flavonoides.....</i>	<i>9</i>
<i>4.1.1.8.Anthocyanes.....</i>	<i>10</i>
<i>4.2.Alcaloides.....</i>	<i>10</i>
<i>4.3.Isoprénoides.....</i>	<i>11</i>
<i>5.Role et intérêt des composés phénoliques.....</i>	<i>12</i>
<i>6.Notion sur la toxicité.....</i>	<i>13</i>
<i>7.Le globules rouges.....</i>	<i>14</i>
<i>8.La plante étudiée.....</i>	<i>17</i>
<i>9.Utilisations thérapeutiques.....</i>	<i>19</i>

## ***Partie Matériel et Méthodes***

<b><i>I. Préparation du matériel végétal</i></b> .....	22
<b><i>II. Tests phytochimiques</i></b> .....	22
<i>1/Préparation des extraits</i> .....	22
1.1 . <i>Infusion</i> .....	22
1.2	
<i>Macération</i> .....	22
1.3. <i>Décoction</i> .....	23
2. <i>Calcul du rendement des extraits</i> .....	23
3. <i>Tests phytochimiques</i> .....	23
4. <i>Dosage des Polyphénols totaux</i> .....	25
5. <i>Extraction des polyphénols totaux</i> .....	25
<b><i>III. Analyse biologique</i></b> .....	27
1. <i>Préparation du phosphate buffered saline (PBS)</i> .....	27
2. <i>Préparation de la suspension érythrocytaire</i> .....	27
3. <i>Préparation des extraits</i> .....	27
4. <i>L'effet hémolytique</i> .....	27

<b>IV. Analyses</b>	
<b>statistiques</b> .....	28

***Partie Résultats et interprétation***

<b>I. Etude</b>	
<b>phytochimique</b> .....	30
1. Rendement	
<i>d'extraction</i> .....	30
2. Test	
<i>phytochimique</i> .....	30
<b>II. Dosage</b>	<b>des polyphénols</b>
<b>totaux</b> .....	31
<b>III. Analyse</b>	
<b>biologique</b> .....	33
1. Evaluation de l'effet	
hémolytique .....	33
<b>Discussion</b> .....	3
6	
<b>Conclusion</b> .....	3
8	

## **1. Introduction :**

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se parfumer . . . , mais également pour se soigner [Beloued, 1998 ; Valnet, 2001]. Le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde sous le nom de médecine complémentaire ou parallèle [OMS, 2002].

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issus de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations. La valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme [Thomas, 2011].

En effet elles sont douées non seulement de qualités performantes et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponosides. Elle constitue un réservoir inépuisable de remèdes populaire des plus efficaces et une source naturelle de médicaments les plus usités actuellement [Beloued, 1998].

Les plantes sont reconnues comme une merveilleuse source de médicament, des milliers des espèces de plantes sont utilisées comme médicament dans la thérapeutique traditionnelle. Ainsi, sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 50% sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales [Rates, 2010].

Les plantes donc sont capables de produire une grande diversité de produits qui ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire [Akroum, 2010].

Ces plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent avoir un risque de toxicité [Fouché et al, 2000]. Le fait que n'utilise que des plantes ne signifie pas que cela est sans danger, L'Algérie, un pays du nord d'Afrique, connu par son climat (méditerranéen, semi-aride) et par la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes médicinales et alimentaires [Veesenmeyer et al., 2009], traditionnellement utilisées pour traiter plusieurs maladies, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires, les pathologies de système digestive et autre pathologies [Kambouche et al., 2000].

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. Cette richesse se doit aujourd'hui d'être exploitée [Graham et al. 2000, Gonzalez-Tejero et al. 2008].

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale très connue dans la pharmacopée arabo-musulmane et d'une grande utilisation dans la médecine traditionnelle algérienne connue sous le nom de Nounkha « *Ammoides verticillata* » Cette plante poussée à l'état spontané possédant principalement des propriétés antalgiques, anti-infectieuses et antispasmodiques et peut servir comme condiment culinaire [Filidj et al., 2010].

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à effectuer des tests phytochimiques, dosage des polyphénols totaux de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* de la région de Tlemcen (Ouest d'Algérie) et recherche d'effet hémolytique d'extrait hydro alcoolique de la plante. **2. Phytothérapie :**

La phytothérapie est le traitement par des plantes dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou sur un ou plusieurs symptômes, les préparations sont à base de plantes ou d'extraits naturels à des doses pondérales [Goetz,

**2013].** Ce traitement est transformée depuis le XIX<sup>ème</sup> par l'emploi des extraits de plantes, puis par celui des substances actives isolées de celles-ci [**Domar, Bourneuf, 1990**].

La phytothérapie contemporaine est devenue une véritable science. L'exploration de flore du globe étant loin d'être complète et de nouvelles découvertes étant faites chaque jour sur les propriétés de certaines plantes. L'étude des vertus médicinales des plantes connues ou inconnus nous réserve encore, assurément beaucoup de surprises [**Beidjord A, 2013**].

Les médicaments à base de plantes, élément essentiel des soins de santé partout dans le monde depuis les premiers jours de l'espèce humaine, sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays [**OMS, 1998**].

Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes [**OMS, 1998**].

Les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins [**Hans, 2007**]. Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé [**Farnsworth et al, 1986**]. En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales [**Millogo et al, 2005**].

### **3. Les avantages de la phytothérapie :**

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité de certains médicaments décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus [**Zeghad, 2008**].

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques, elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite [**Iserin et al, 2001**].

Les médicaments à base de plantes comprennent des plantes, des matières végétales, des préparations à base de plantes et des produits finis qui contiennent comme principes actifs des parties de plantes, d'autres matières végétales ou des associations de plantes. Par utilisation traditionnelle, on entend une utilisation de fort longue date de ces médicaments à base de plantes dont l'innocuité et l'efficacité ont été bien établies et qui sont même agréés par certaines autorités nationales. Par activité thérapeutique, on entend la prévention, le diagnostic et le traitement de maladies physiques et psychiques, l'amélioration d'états pathologiques, ainsi que le changement bénéfique d'un état physique ou mental [**OMS, 2000**].

### **4. Les métabolites secondaires :**

La vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisable par l'homme en particulier illustrés dans le domaine thérapeutique [**Marin et al., 2002**].

Ces composés sont synthétisés dans les différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles...). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles sont métabolisées, ces substances sont extrêmement complexes du point de vue structure et composition chimique. On trouve ces métabolites dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs

rôles et cette distribution varie d'une plante à l'autre [Chaouche, 2014]. Tout fois, leur métabolisme produit des milliers de constituants différents, dont quelque –uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique [Hogan et kolter, 2002].

Il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement la dose dépendant ou structure [Makkar et al, 2007].

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, ils sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, [Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006]. Les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les alcaloïdes .chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine, [Bruneton, 1993 ; Vermerris et al. 2006].

#### **4.1. Les composés phénoliques :**

Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi-universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique (ex.: acide gallique) à des composés polymériques complexes comme les tanins. Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit [Sarni et al.,2006].

In vitro, les polyphénols présentent des activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que le radical hydroxyle (HO·) et superoxyde (O<sub>2</sub>·) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière

.On peut distinguer **Synthèse bibliographique**

6

les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base [Sarni et al.,2006].

#### **4.1.1 Classification des composés phénoliques :**

##### **4.1.1.1 / Les acides phénoliques :**

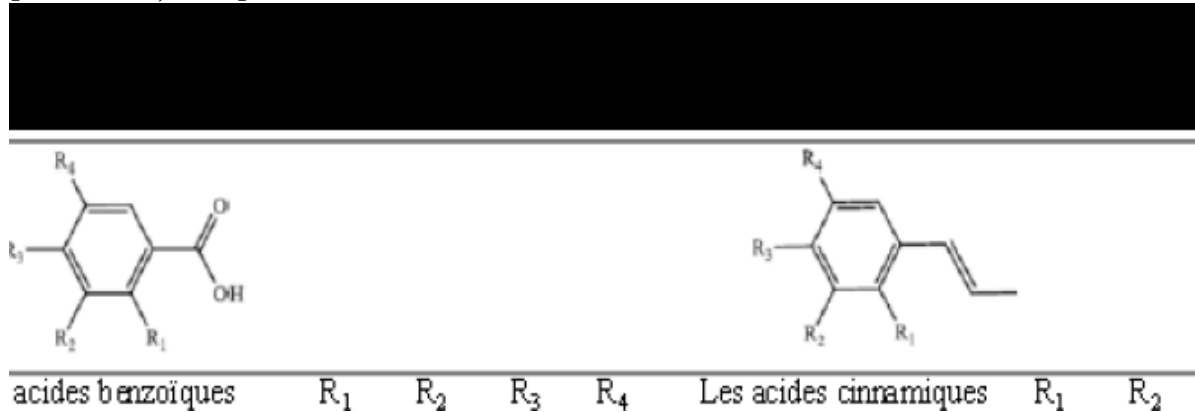
Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille et insoluble dans l'alcool .Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti radicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants [Bruneton, 2009]. On distingue :

- Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones).
- Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3).
- **Acides hydroxybenzoïques :**

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C1), dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.

• **Acides hydroxycinnamiques :**

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C3), dont les plus abondants sont les acides caféique et coumarique. Ils sont à l'origine des voies de biosynthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes et les stilbènes [Chaouche, 2014].



**Figure1 : Structure des dérivés de l'acide benzoïque et cinnamique [Chaouche, 2014].**

la dose létale **50 (DL50)** [Rolland, 1988]. C'est la dose létale médiane, une valeur statistique d'une substance chimique qui provoque la mort de 50% d'une population d'animaux d'essai donnée dans des conditions expérimentales définies [Laigneau, 2000]. La dose létale **DL100** : C'est la dose qui entraîne la mort de la population des animaux d'essais. La **DL100** est un indice de létalité qui mène à mentionner le degré de toxicité d'un produit chimique donné [Bonvalot, 2002].

De point de vue générale, la toxicité est une notion relative et varie en fonction de la partie de la plante étant extraite ou mangée et les quantités prises, (dont l'effet toxique des plantes médicinales varie selon leurs effets pharmacologiques). Cependant, il est essentiel que les composés de l'extrait brut soient testés pour leur toxicité. Ces tests ne fournissent pas d'informations sur les réactions indésirables qui pourraient résulter de l'exposition à long terme de ces espèces [Soumyanath, 2006].

Plusieurs produits à base de plantes médicinales autrefois utilisés ont été déclarés toxiques à la suite d'étude toxicologique et leurs doses ont été modifiées afin de diminuer leur toxicité [Elalaoui, 2013].

De ce fait, le globule rouge a été choisi comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire, en vue de sa facilité d'isolement, sa relative simplicité, de plus la membrane érythrocytaire est un outil précieux pour l'étude des transports ionique transmembranaire et la présence de cette système de transport similaire à ceux dans certains tissu justifier cette choix [Waâl, 2013].

**7. Le globule rouge :**

Le globule rouge, cellule mature de la lignée érythrocytaire, a la forme d'une lentille biconcave. Son diamètre est de 7µm. La forme particulière du globule rouge lui permet d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui



favorise les échanges d'oxygène. La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours [Aguilar-Martinez, 2007].

La particularité des globules rouges est l'absence de noyau et ceci implique 2 notions :

- Absence d'ADN ou d'ARN (incapacité de synthèse protéique).
- Un stock enzymatique et énergétique limité et prédéterminé [Elalaoui, 2013].

La membrane permet l'intégrité du milieu intérieur qui contient les principales enzymes des métabolismes permettant de lutter contre l'inflation hydro-sodée continue en assurant le fonctionnement des pompes à sodium potassium.

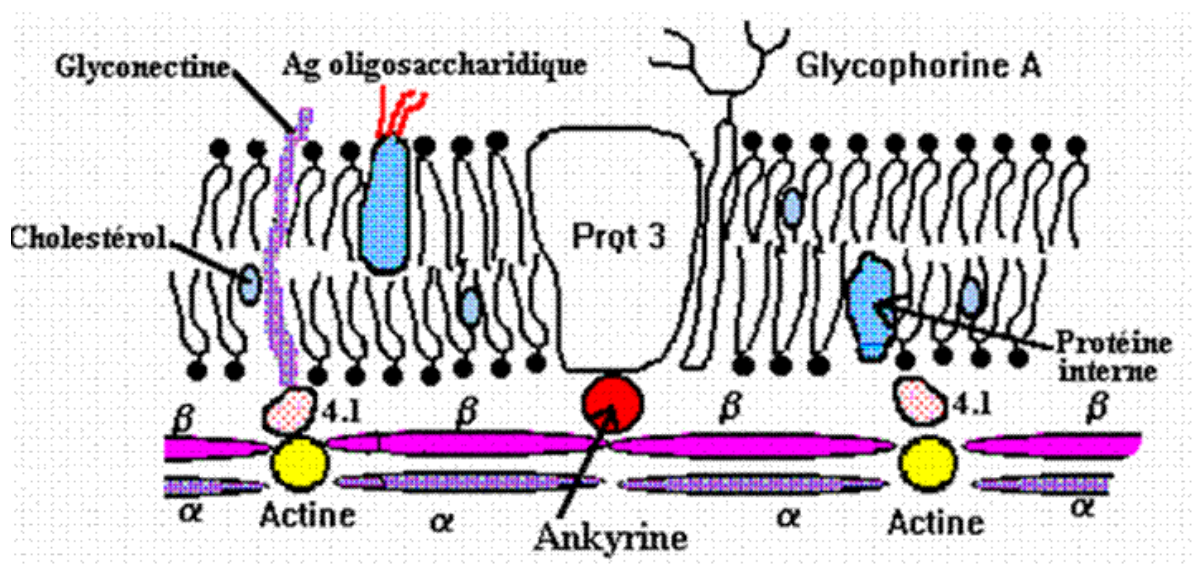
Elle comporte des protéines et des lipides intriqués dans une structure complexe. Les lipides (65 % de phospholipides, 25 % de cholestérol non estérifié, 10 % de glycolipides) sont répartis en double couche de 40 Å d'épaisseur avec des groupements non polaires hydrophobes se faisant face tandis que les groupements polaires hydrophiles sont rejetés vers l'extérieur. Dans cette bicouche phospholipidique baignent de volumineuses m

olécules protéiques enchâssées plus ou moins profondément dans les deux feuillets lipidiques [Julie et Rouviere, 2008].

Les protéines transmembranaires jouent un rôle essentiel dans les échanges des globules rouges avec le milieu extérieur. Les plus importantes sont les ATPases  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dépendantes qui permettent le transport actif des cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , les ATPases  $\text{Ca}^{++}$  dépendantes et les protéines permettant le transport des anions, de l'eau et du glucose [Bichis et Huber, 2000].

Trois protéines transmembranaires permettent la stabilité de forme du globule rouge en se fixant sur les protéines intrinsèques du cytosquelette : ce sont la protéine 3, la Glycophorine A et la Glycophorine C (figure 10) [Gerard, 2006].

- La Protéine 3 se fixe à la  $\beta$  spectrine grâce à l'Ankyrine .
- Les Glycophorines A et C se fixent à la protéine 4.1



**Figure 10: structure de la membrane du globule rouge [Zandecki, 2006].**

Ces globules rouges ou hématies peuvent soumettre à une destruction ou hémolyse dite physiologique après 120 jours [Aguilar-Martinez, 2007], elle doit être différenciée de

l'hyper hémolyse qui est liée à une anomalie de la membrane érythrocytaire, à une anomalie du contenu enzymatique de l'hématie ou à une anomalie hémoglobinique ou une origine extra corpusculaire acquise liée à un agent infectieux, à un facteur toxique ou un facteur mécanique [Aguilar-Martínez, 2007].

Les principaux facteurs qui déterminent la flexibilité d'un érythrocyte normal sont :

- sa forme de disque biconcave, caractérisée par un rapport surface/volume favorable.
- la flexibilité de sa membrane.
- la fluidité de son contenu en Hémoglobines.

L'intégrité de ces facteurs dépend essentiellement de celle du métabolisme énergétique de la cellule et de son rôle dans diverses fonctions comme la perméabilité membranaire, le pouvoir de réduction et le maintien d'un rapport ATP/Ca<sup>++</sup> favorable à la flexibilité du réseau de protéines contractiles qui constitue le squelette sous-membranaire [Levy et al., 2008].

La voie de destruction des globules rouges dépend de différents facteurs parmi lesquels le degré de l'activation du système phagocytaire ou' on peut déterminer :

• **Hémolyse intravasculaire :**

Elle résulte de l'activation complète du complément à la surface des hématies ce qui aboutit à la formation du « complexe d'attaque membranaire » d'où une hémolyse intravasculaire aiguë [Barker, 2000] et la libération des divers constituants de l'hématie notamment l'hémoglobine dans la circulation sanguine [Festus et al, 2006].

• **Hémolyse extravasculaire :**

Elle est induite par la fixation de l'anticorps sur l'hématie sans activation (ou activation limitée) du complément. Les immunoglobines G, fixées sur les antigènes de groupes sanguins présents sur la membrane des hématies, interagissent avec les récepteurs de leur fragment présents sur les cellules du système des phagocytes, entraînant ainsi la phagocytose des hématies et leur lyse [Festus et al. 2006].

• **L'Hémolyse pathologique ou hyper-hémolyse :**

C'est la destruction précoce et exagérée des globules rouges circulants. Elle sera responsable d'une anémie hémolytique.

**Les hémolyses toxiques :**

Plusieurs métaux peuvent être à l'origine d'une hémolyse, on cite hydrogène arsénié, le cuivre et le Plomb responsable du saturnisme, maladie professionnelle la plus fréquente dans le monde [Dreyfus et al.,1992]. Dans ce dernier cas, l'anémie résulte des effets inhibiteurs du plomb sur la biosynthèse de l'hème et ses interférences dans le métabolisme du fer [Lee,1998].

## **8. La plante étudiée :**

*Ammoïdes verticillata* est une plante qui appartient à la famille des Apiacées. Son appellation dans l'Algérie est Nounkha ou Nûnkha tirée du nom Perse « Nankhah ». En effet, « Nan » et « Khah » signifient respectivement pain et goût [Baytop & Sütülpinar, 1986]. La saveur de cette plante est fortement aromatique et piquante, son odeur agréable, diffusible, intense et balsamique et persistante même après dessiccation [Bekhechi, 2008].

### **8.1. Noms vernaculaires :**

Cette plante est connue sous les noms vulgaires Nounkha, Nûnkha et Nanoukha [Trabut, 1935 ; Merad, 1973 ; Sijelmassi, 1991]. Mais elle est surtout connue dans le monde sous les noms vernaculaires suivants :

- En français : Ajowan [Wehmer, 1931].
- En arabe : Taleb El Koubs [(Narayana et al. 1967)].

Le nom scientifique est :

*Ammoïdes* ou *Ptychotis verticillata* [Quezel et Santa, 1963].

*Trachyspermum ammi* [Wehmer, 1931 ; Quezel et Santa, 1963 ; Narayana et al., 1967].

*Trachyspermum copticum* [Schirner, 2004].

Le genre *Ammoïdes* appartient à la famille des Apiacées. Elle pousse spontanément en Egypte

Et en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Iran et Pakistan) [Quezel et Santa, 1963 ; Khajeh et al. 2004].

Selon [Quezel et Santa, 1963], cette espèce végétale qui pousse spontanément est annuelle, à souche filiforme, à tige ramifiée de 10 – 40 cm, On la rencontre généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes et les forêts [Bekhechi, 2008].

### 8.2. Position systématique :

D'après [APG III], la systématique d'*Ammoïdes verticillata* est la suivante :

**Tableau 2** : Classification botanique d'*Ammoïdes verticillata* selon APG III.

### 8.3. Composition chimique :

La plante étudiée est riche en polyphénols et plus particulièrement dans la partie aérienne (tige et fleurs). Ceci est présenté dans le tableau 3.

## 9. Utilisation thérapeutique d'*Ammoïdes verticillata*:

Les qualités thérapeutiques d'*Ammoïdes verticillata* sont connues depuis les plus anciens dans la médecine populaire locale. Cette espèce possède des qualités précieuses et jouit d'une grande faveur populaire [Sijelmassi, 1991]. Par ailleurs, [Merad, 1973] avance que l'infusion d'*Ammoïdes verticillata* est utilisée comme antipyrétique, rafraîchissante et antispasmodique (surtout conseillée dans les spasmes gastro-intestinaux).

En outre, [Ziyyat et al. 1997] avancent que *Ammoïdes verticillata* est une plante aromatique utilisée comme fébrifuge conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension et /ou diabète selon le tableau

## *Synthèse bibliographique*

21

### **Feuilles**

Condiment culinaire

Irritations dermiques

Abcès-furoncle

Ajouter les feuilles broyer dans des soupes (Ex : d'escargot) ; conserve plus longtemps les aliments et empêche la formation de moisissures

Faire bouillir dans très peu d'eau, une poignée de feuilles fraîches d'*Ammoïdes*, Lorsque le liquide est presque complètement évaporé mettre les feuilles cuites sur une serviette, et écraser pour supprimer le suc, laisser refroidir le cataplasme, puis l'appliquer sur la partie atteinte.

### **Racines**

Diarrhée

Faire bouillir pendant 20 min dans un litre d'eau des racines d'*Ammoides* séché au soleil .Filtrer la décoction,la sucrer avec un peu de miel et la boire en 3 fois au cours de la journée.  
Diurétique

Mettre dans un litre d'eau bouillante des racines d'*Ammoides* .Filtrer quand l'infusion est devenue tiède, sucrer avec un peu de miel.Consommer le tout dans la journée.

Ce travail a été réalisée au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique », département de biologie, Faculté SNV STU, université de Tlemcen.

## **V. Préparation du matériel végétal :**

Le matériel végétal est utilisé au cours de notre étude est la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, récolté en mois de Mai 2014 dans la région de Zelboune wilaya de Tlemcen. Après la récolte, les parties utilisées de la plante (feuilles et tiges) ont été séchées dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter toute modification ou dégradation des constituants présents.

Après séchage, ces parties ont été découpées en petits morceaux, puis soumises à des extractions afin d'extraire les différentes classes de composés chimiques contenues dans notre plante pour des tests phytochimiques et biologiques.

## **VI. Tests phytochimiques :**

Notre études ont porté sur la recherche des principaux groupes chimiques (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, saponines, coumarines, terpènes, composés réducteurs,...) par des réactions en tubes.

### **1. Préparation des extraits :**

Les extractions solide /liquide de la plante ont été réalisées dans un milieu hydroalcoolique (méthanol /eau : 70/30) en impliquant trois modes de préparations : infusion, macération, décoction pendant 1h et 2h respectivement.

#### **1.1. Infusion :**

- Verser 100ml de mélange méthanol-eau (70/30) bouillant sur 10g du matériel végétal.
- Agiter et laisser le mélange refroidir.
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

#### **1.2. Macération :**

- Macération sous agitation, à température ambiante, pendant 24 heures, de 10 g du matériel végétal dans 100ml de mélange méthanol-eau (70/30).
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

### 1.3. Décoction :

- Mélanger 10g du matériel végétal avec 100ml de mélange méthanol-eau (70/30) dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant.
- Chauffer à une température d'ébullition stable pendant 1h, à l'aide d'une chauffe ballon.
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat

Pour la préparation de la décoction durant 2h, on a suivi les mêmes étapes préparées dans la décoction durant 1h.

Les filtrats ont été soumis à une évaporation à sec à l'aide d'un rotavapeur, pour faire le dosage des polyphénols totaux.

### 2. Calcul du rendement des extraits :

Le rendement en pourcentage de la plante en extrait sec a été calculé par la formule :

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

**R(%)** : rendement en pourcentage.

**M** : masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>** : masse en gramme du matériel végétal de départ.

### 3. Tests phytochimiques :

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette [**Hagerman et al., 2000**].

Dans notre étude expérimental nous avons utilisé les techniques standards décrites par **Terease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**.

Les résultats ont été évalué comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif.

### **3.3. Les composés polyphénoliques :**

#### **➤ Les flavonoïdes :**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

#### **➤ Les tanins :**

A 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

#### **➤ Les coumarines :**

Introduire 5ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5ml de NH<sub>4</sub>OH à 10%, mélanger et observer sous UV à 366 nm .Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

### **3.4. Alcaloïdes**

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

1ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux .Un volume est traité par 0,5ml de réactif de Mayer, l'autre par 0,5ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

### **3.5. Terpénoïdes :**

5ml d'extrait est ajouté à 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

#### **➤ Les saponines : Test de mousse**

Dans un tube à essai, introduire 10ml d'extrait à tester et agité pendant quelque secondes puis laissé au repos pendant 15min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

### **3.6. Les composés réducteurs :**

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 2ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), incubé l'ensemble pendant 8 min dans un bain marie bouillants. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

#### **4 .Dosage des Polyphénols totaux :**

Une prise de 125 µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 500µl d'eau distillée et de 125 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 6 mn, 1250 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7% sont ajoutés et le mélange est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée. Le tube est placé au repos pendant 90 mn à température ambiante et à l'obscurité, ensuite l'absorbance est mesurée à 760 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à des concentrations de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg /ml.

Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS) [**Dewanto et al., 2002**].

#### **5 . Extraction des polyphénols totaux :**

Il existe différentes méthodes d'extraction qui sont particulièrement adaptées à l'extraction des polyphénols parmi lesquels on a choisi la méthode qui a été réalisée par [**Chaouche, 2014**].

25 g de la partie aérienne de plante est soumis à des macérations, respectivement, par de l'hexane et de dichlorométhane afin d'éliminer tous les pigments et les lipides.

Le marc ainsi obtenu, est soumis à une macération durant 24h en présence d'un mélange (Méthanol/Eau/Acétone (60/10/30)).

L'extrait brut des polyphénols totaux est obtenu après une évaporation à sec du filtrat dans un rotavapor à une température de 60° (**figure 12**).

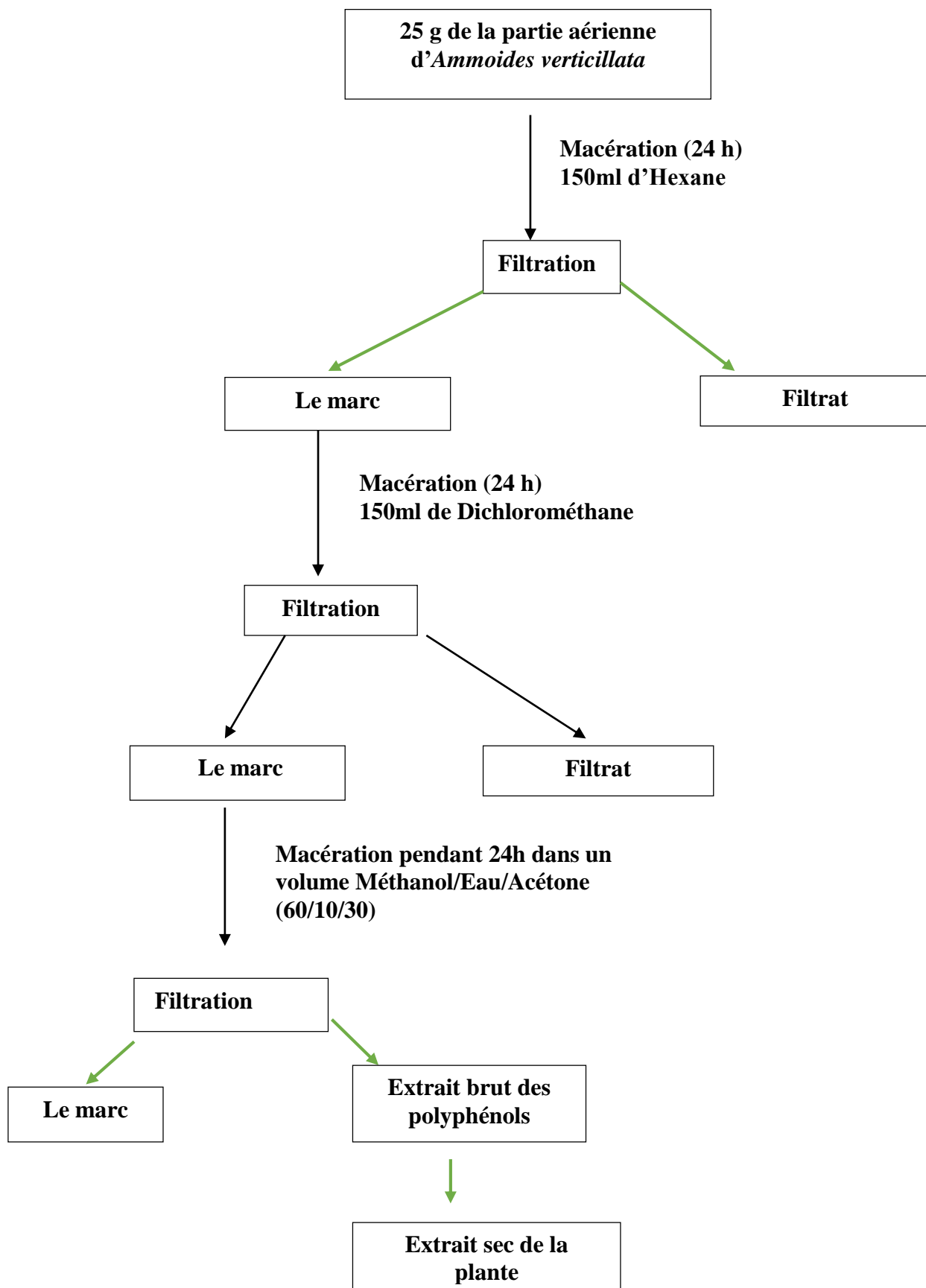


Figure 12 : Méthodes d'extraction des polyphénols à partir de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* [Chaouche, 2014].

## VII. Analyse biologique :



Les tests de l'effet hémolytique de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* ont été réalisés sur une suspension érythrocytaire du sang humain, incubée dans un tampon phosphate salin à PH=7,4 .

### **1. Préparation du phosphate buffered saline (PBS) :**

Pour préparer une solution tampon de PBS à PH=7,4, on a utilisé les composés suivants avec les concentrations qui correspondent : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8Mm) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2Mm) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137mM) [Mohan, 2006].

### **2. Préparation de la suspension érythrocytaire :**

En vue de sa facilité d'isolement, sa relative de simplicité, le globule rouge a été choisi comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire.

Le sang utilisé, provenant d'un donneur unique sain, a été prélevé sur un tube hépariné et centrifugé à 2400 tours /minutes durant 10 min .Le surnageant résultant (plasma) a été éliminé et le culot été lavé 2 fois par PBS, puis resuspendu le culot à nouveau par ce dernier avec le même volume de plasma éliminé.

La suspension érythrocytaire ainsi obtenue été diluée 20 fois par PBS.

### **3. Préparation des extraits :**

Différentes concentrations d'extraits des polyphénols totaux (25mg/ml, 50mg/ml ,100mg/ml, 200mg/ml) ont été solubilisé dans le PBS.

### **4. Test d'effet hémolytique :**

Le test d'effet hémolytique de la plante étudié a été réalisé selon la méthode décrit par [Singh et kaur, 2007 ; Kumar et al., 2011].

Mettre dans des tubes à hémolyse 2950µl de la suspension érythrocytaire préparer avec 50µl de l'extrait à différentes concentrations initiales (25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml).Les concentrations finales après ajout du PBS sont (0,42mg/ml, 0,84mg/ml, 1,67mg/ml et 3,33mg/ml).

- Incuber les tubes dans un incubateur agitateur à 37°C durant une heure.
  - Prélever 500µl chaque 15min (15min, 30min, 60min).
  - Ajouter 1,5 ml de PBS
  - Mélanger les tubes délicatement.
  - Centrifuger les tubes à 2400 tours/ min durant 10 min;

- Lire l'absorbance de chaque tube (la fuite d'hémoglobines) à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes conditions expérimentales. Il est composé de 2950µl de suspension érythrocytaire et 50µl de solution tampon de PBS, en absence d'extrait

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250µl de la suspension érythrocytaire et 4750µl d'eau distillé en absence d'extrait.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse total après une heure d'incubation, selon la formule suivant :

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

Les tests d'hémolyse sont répétés 4 fois dans le but de réaliser une analyse statistique (Moyenne, écart type et le test de Student).

### VIII. Analyses statistiques :

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

#### 1. La moyenne :

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

#### 2. L'écart type :

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

#### 3. Test de Student :

Dans ce test les moyennes d'absorbances des tubes à différentes concentrations d'extraits, incubées à 60 min, sont comparées au temps 15 min.

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

$$v = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

La valeur de «  $t$  » nous donne le degré de signification «  $p$  » lu sur la table de Student.

La différence entre deux moyennes est:

Peu significative :  $p < 0,05$ (\*) ;

Significative :  $p < 0,01$  (\*\*) ;

Très significative :  $p < 0,001$ (\*\*\*) ;

Hautement significative :  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) [Schwartz, 1992].

## I. Etude phytochimique :

### 1. Rendement d'extraction :

Le rendement en extrait sec, l'aspect et le solvant de solubilité des différentes modes d'extraction ont été présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 05** : aspect, rendement en extrait sec et solvant de solubilité des différentes modes d'extraction.

	<b>Aspect</b>	<b>Rendement (%)</b>	<b>Solvant de solubilisation</b>
<b>Décoction 1 h</b>	Patte	<b>14,63</b>	Eau distillé
<b>Décoction 2 h</b>	Cristallisé	<b>7</b>	Eau distillé
<b>Macération</b>	Cristallisé	<b>14,11</b>	Eau distillé
<b>Infusion</b>	Cristallisé	<b>4</b>	Eau distillé

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré que l'extrait préparé par décoction durant 1h présente un aspect de patte avec un rendement de 14,63%, par contre les extraits

préparés par décoction durant 2h, macération et infusion ont un aspect cristallisé avec un rendement d'ordre 7% ,14,11% ,4% respectivement .

## **2 .Test phytochimique :**

Les tests phytochimiques réalisé sur les différentes modes de préparations nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelque métabolites secondaires présent dans notre plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques, ou par un examen sous la lumière UV). Les résultats sont résumés dans le **tableau 6**.

**Tableau 6:** Résultats des tests phytochimique sur la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* selon différentes modes de préparations

Métabolites secondaires	Réactions	Milieu hydroalcoolique			
		Infusion	Macération	Décoction 1h	Décoction 2 h
Flavonoides	Mg <sup>++</sup>	+++	+++	++	++
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++	+++	+++
Coumarines	Fluorescence UV	+	++	++	+
Alcaloïdes	Wagner	++	+++	+++	++
Saponines	Test de mousse	-	-	-	-
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	+	+	+	+
Terpénoïdes	Chloroforme +H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	+++	+++	++

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennent positif ; + : Faiblement positif ; - : négatif

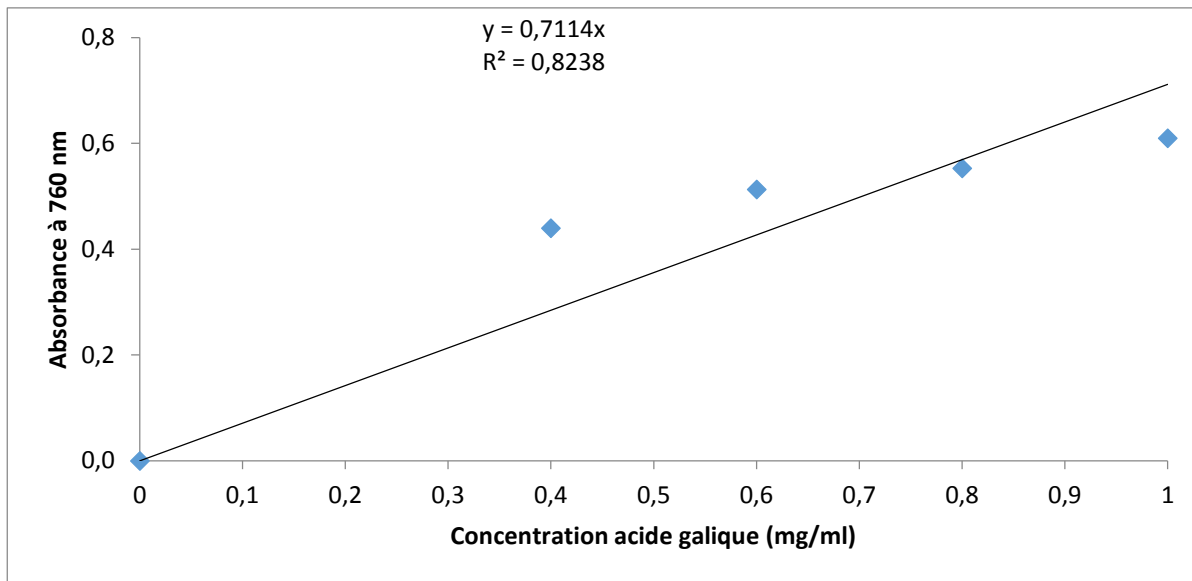
Les tests phytochimiques réalisés sur les différentes préparations (macération, décoction et infusion) de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* ont révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires.

Ces tests ont montré la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins, terpénoïdes et alcaloïdes, avec la présence des coumarines et des composés réducteurs et l'absence des saponines.

## II. Dosage des polyphénols totaux :

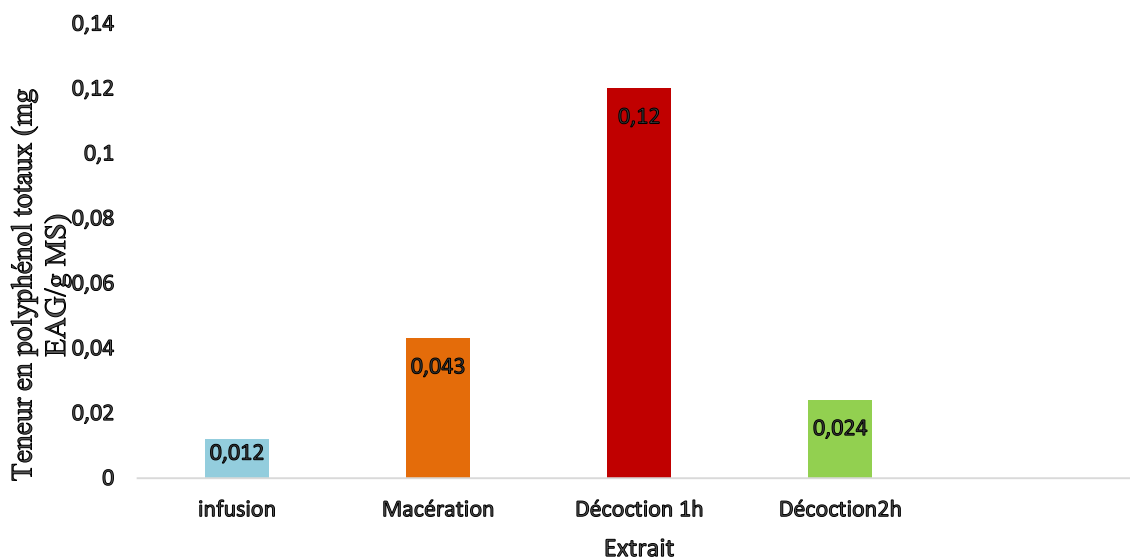
### 1. Courbes d'étalonnages :

La courbe d'étalonnage est élaborée par une solution standard de l'acide gallique à des concentrations différentes. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de  $y = 0,711x$  avec un coefficient de corrélation  $R^2$  égal à 0,823 (**Figure 13**).



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

Les extraits hydroalcooliques ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre, pour leurs teneurs des polyphénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique (mg EAG) par g de matière sèche, en utilisant les équations de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (**Figure14**).



**Figure 14:** Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g MS) dans les différentes préparations de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*.

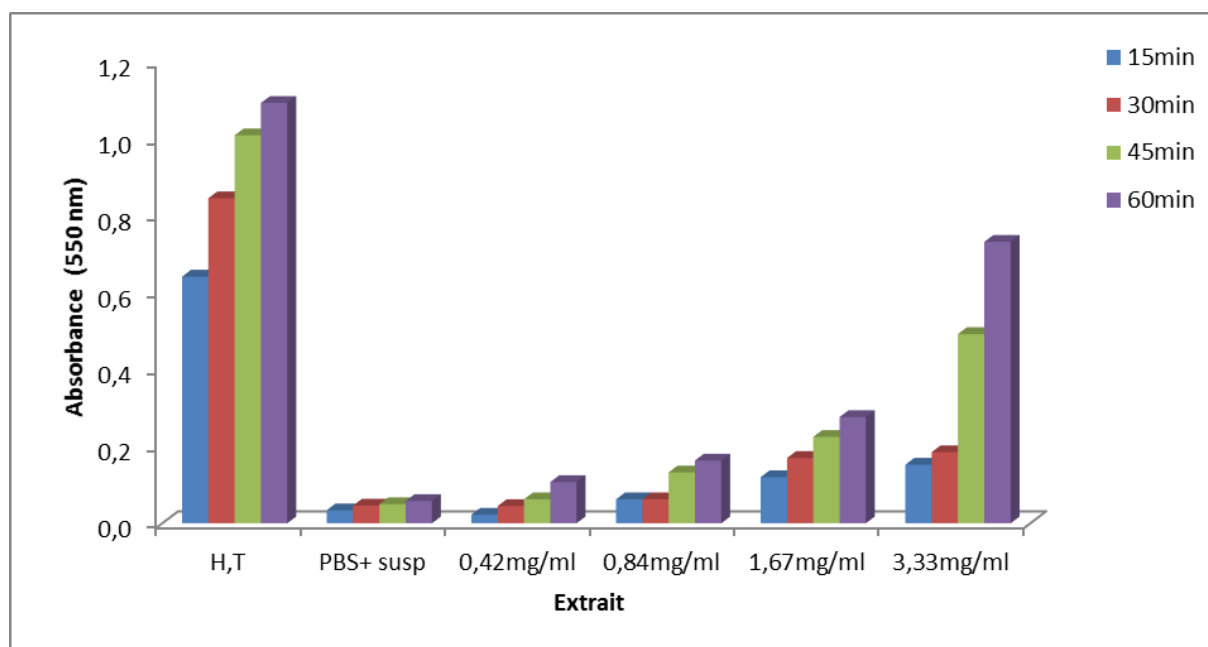
D'après les résultats suivants, nous avons constaté que tous les extraits préparés contiennent des composés phénoliques mais à des concentrations très variables. L'extrait préparé par décoction 1 h a présenté la concentration la plus élevée) des phénols totaux (0,12 mg EAG/g MS. Par contre, l'extrait préparé par infusion a présenté le taux le plus faible dont la concentration n'a pas dépassé 0,012 mg EAG/g MS.

\*  
\*  
\*  
\*

### III. Analyse biologique :

#### 1. Evaluation de l'effet hémolytique de la plante en fonction du temps :

La figure 15 présente l'évolution de la fuite de HB par absorbance, durant 60min, dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations de l'extrait brut des polyphénols de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* (0,42mg/ml, 0,84mg/ml, 1,67m/ml et 3,33mg/ml), comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée.



PBS+ susp : témoin négatif ; HT : hémolyse total, \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) signification par rapport temps 15min.

**Figure 15:** L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extrait brut de polyphénols de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.

D'après les résultats enregistrés, nous avons estimé une augmentation des absorbances durant le temps (15, 30, 45, 60 min), plus la concentration d'extrait augmente, l'absorbance convenable marque une augmentation considérable.

A des concentrations de 0,42 et 0,84 mg/ml, nous avons enregistré un taux faible d'absorbance qui ne dépasse pas 0,2. De même nous n'avons pas marqué une différence significative après une heure d'incubation par rapport aux temps 15 min.

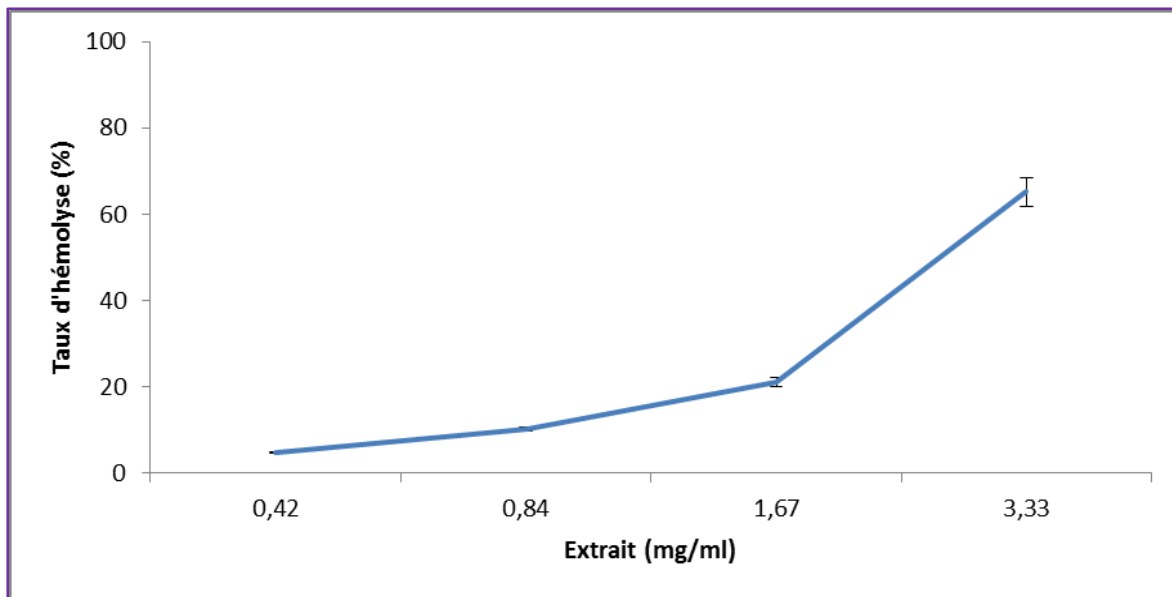
L'absorbance est passé de 0,06 à 15 min à 0,16 durant 60 min en présence d'une concentration de 0,84 mg/ml et de 0,12 à 15 min jusqu'au 0,28 pendant 60 min en présence d'une concentration de 1,67 mg/ml.

A une concentration de 1,67 mg/ml, l'absorbance arrive jusqu'au 0,28 à 60 min, cette augmentation d'absorbance est non significative par rapport à temps 15 min.

Par contre, à une concentration de 3,33 mg/ml, nous avons observé un effet hémolytique important de l'extrait brut des polyphénols, nous avons enregistré aussi une augmentation hautement significative ( $p < 0.0001$ ) d'absorbance de 0,15 à 15 min jusqu'aux 0,73 à 60 min. Cette augmentation d'absorbance reste inférieure par rapport au tube d'hémolyse total.

**La figure 16**, présente les taux d'hémolyse, par pourcentage (%) après 60 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations de l'extrait brut des polysphénols de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* par rapport au tube d'hémolyse total.





**Figure 16** : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait hydroalcoolique brut de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

pour les concentrations 0,42 ; 0,84 et 1,67 mg/ml, respectivement. Ce taux est moyennement élevé (d'ordre de 65,11%) à une concentration de 3,33mg/ml d'extrait étudié, par rapport à l'hémolyse total.

Il été bien admis que la vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes qui ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. Ces substances biochimiques sont déterminées par une étude phytochimique qui consiste à détecter, extraire et doser certains principes actifs existants dans la plantes. Le choix de ces dernières rend compte des soucis de rapprocher les vertus thérapeutiques de ces composés aux usages populaires de ces plantes [Marin et al., 2002].

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale très connu dans la pharmacopée arabo-musulmanes et d'une grande utilisation dans la médecine traditionnelle algérienne connue sous le nom d'*Ammoides verticillata* (Nounkha).

La plante d'*Ammoides verticillata*, famille des Apiécées, est une plante annuelle, spontanée répondue dans toute l'Algérie, utilisée traditionnellement comme plante médicinale pour traiter certains maladies, et peut aussi servir comme condiment culinaire [Quezel et Santa, 1963 ; Baytop et Siltliipinar, 1986 ; Filidj et al.,2010].

Notre travail avait pour but de réaliser une étude phytochimique, le dosage et la recherche d'effet hémolytique des polyphénols totaux extraits de la partie aérienne de la plante.

Dans ce contexte, les tests phytochimiques effectués sur les différents extraits préparés par infusion, macération et décoction ont révélé la richesse de cette plante en alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de **Felidj et al. (2010) et de Benaïssa(2012), qui** confirme la présence des tanins, flavonoïdes et terpénoïdes. Ces résultats confirment aussi ceux rapportés dans les travaux de **Bourek (2013)** qui en plus de ces composés a révélé la présence des composés réducteurs.

Pour les résultats de rendement, il est difficile de comparer les résultats d'extraction avec ceux de la bibliographie car le rendement d'un extrait n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

Concernant l'étude biologique, nous avons souligné un taux d'hémolyse faible d'ordre de 4,78% après une heure d'incubation des érythrocytes isolées en présence d'une concentration de 0,42mg/ml d'extrait brut des polyphénols de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*.

Par contre, nous avons constaté un taux d'hémolyse élevée d'ordre de 65 % en présence de 3,33 mg/ml d'extrait testé par rapport à l'hémolyse totale.

On peut considérer ce taux (65%) est plus important par rapport à d'autres plantes citons *Marrubium vulgare*, *Haloxylon scoparium pomel*, présentent des taux d'hémolyse 6% ,7% respectivement à une concentration de 20mg/ml [**Moussaoui et Harkati ,2013**].

Ces résultats sont confirmés par l'étude de **Bourek (2013)** qui a enregistré un taux d'hémolyse d'ordre de 2,98 %, 45min après incubation de 2 mg/ml d'extrait hydroalcoolique d'*Ammoides verticillata*, récoltée de la région de Beni-Snousse, Wilaya de Tlemcen, par rapport à l'hémolyse totale.

Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes doses ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. La cytotoxicité de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* à une concentration très élevée sur les globules rouges est probablement due à la richesse de cette plante des flavonoïdes et des tanins.

Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses. Il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.). De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait est nécessaire pour situer les limites de tolérance de la plante et éviter l'hémolyse [Nacoulma et al.,2001].

Parmi Les propriétés hémolytiques d'un agent sont attribuables à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ce qui induit a une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions: entrée de  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , sortie de  $\text{K}^+$ , la membrane éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine [Majester-Savornin, 1991].

A la lumière des résultats obtenus on peut mettre en évidence la richesse en principes actifs de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* récoltée de la région de Zelboune Willaya de Tlemcen en alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, terpénoïdes et coumarines qui sont doués de propriétés pharmacologiques intéressantes. Cette abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie.

L'analyse biologique sur l'influence de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* réalisé in vitro sur des érythrocytes isolés du sang humain incubés dans un milieu tampon PBS à  $\text{pH}=7,4$  a montré un taux faible d'hémolyse à des concentrations de (0,42 ; 0,84 ; 1,67 mg/ml) qui ne dépasse pas 22% .

Cette toxicité est considérée comme importante à une concentration élevée de 3,33 mg/ml avec un taux d'hémolyse qui touche 65,11% par rapport à l'hémolyse totale provoquée par l'eau distillée.

En générale, on peut conclure que notre plante est riche en métabolites secondaires ce qui leur confère une valeur thérapeutique et médicinale importante, mais cette étude reste préliminaire et pas indicatif sur les mécanismes réels par lesquels agit cette plante sur les érythrocytes isolés du sang humain.

C'est pour cela il est intéressant d'approfondir cette étude par :

- ✓ Savoir quelle molécule qui a le principe actif parmi ces polyphénols et essayer l'isoler.
- ✓ identification et caractérisation de la molécule par les méthodes d'analyse (RMN, Spectrophotomètre de masse).
- ✓ Evaluer les expérimentations in vivo, sur un modèle animal.

- ✓ élargir les domaines de recherche, comme les le diabète, et pourquoi pas sur les cellules tumorales.
- **Alain D, (2002 )** :Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris.
- **Aguilar-Martinez, (2007)** : H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier- Nimes.
- **APG III , (2009)** :An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII .Bot. J. Linn. Soc.; 161:105-121.
- **Andersen M, Markham KR, (2006)** ;FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.
- **Baytop T, Sütlüpinar N. (1986)**: Characteristics of «Nanahan» cultivated in Anatolia and its volatile . J Fac. Pharm. Istanbul, 22: 73 - 76.
- **Bekhchi C ,(2008)** : Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par et étude de leur pouvoir antimicrobienne.;Mémoire de Magister, option Biologie Moléculaire et Cellulaire ; université Abou Bah Belkaïd.
- **Beloud A .,(1998)** ;« Plantes médicinales d’Algerie »,OPU,Alger.
  - **Benaïssa M (2015)** : Tests phytochimique, dosage et recherche d’effet hémolytique des polyphénols totaux extrait de la partie aérienne d’*Ammoides verticillata*. Mémoire Master biochimie appliquée, département biologie, faculté SNV STU, université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.
- **Ben Youssef S ., Belguith J .,(2013)** :Introduction à l’enseignement de toxicologie, Ecole nationale de médecine vétérinaire Sidi Thabet .
- **Bichis M.,Huber AR.,(2000)** :Les maladies héréditaires de la membrane érythrocytaire: du tableau clinique aux mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents. Annales de biologie clinique, 58 : 277 – 289.

- **Bismuth C., Baud F.; Fréjaville PP.,Garnier R., (1987)** :Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris : 956.
- **Bonvalot N., (2002)** ;Analyse des méthodes d'élaboration des valeurs toxicologiques de référence (VTR) : une aide à la sélection ? Méthode d'élaboration : 14.Département santé-environnement-travail et génie sanitaire (DSETGS), UMR 1085 Institut de recherche sur la santé l'environnement et le travail (IRSET).
- **Bouazza M., Henchiri C., Djahoudi A., Toubal O., (2012)** ;Phytochemical screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoides verticillata*, an Endemic Species.
- **Bourek Z.,(2013)**:contribution à l'étude phytochimique et effet hémolytique de trois plantes antidiabétiques :*citrullus colocynthis*, *Nerium oleander* et *Ammoides verticillata*.Mémoire master en biochimie,département biologie,Faculté SNV STU,Université Tlemcen(Algérie).
- **Bruneton J (1993 ; 1999)** : Pharmacognosie : Phytochimie& Plantes médicinales. 2<sup>e</sup> ; 3<sup>e</sup>éd. Editions techniques et documentation & éditions médicales internationales, Lavoisier, Paris, France.
- **Bruneton J, (2009)** : Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4<sup>ème</sup> Edition. Paris.
- **Chaouche T.M ;(2014)** ;Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales.présenté pour obtenir le grade de Doctorat en biologie,Option :Biochimie ; université Abou Bah Belkaïd Tlemcen .
- **Cowan M M., (1999)** : Plants product as antimicrobial agents.*Clin.Micobial .Rev.* ;12 (4) 564-582.
- **Cuendet M ; (1999)** : Recherche de nouveau composés capteurs de radicaux libre et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie :*fagraeablumel*\_et de trois plantes d'altitude :*Bartsiaalпина* ,*Loiseleuriaprocumbens*et*Campanulabarbata*.Thèse de doctorat ,Faculté des sciences de l'Université de Lausanne,p.24.

- **Dashti-Rahmatabadi ;(2007)** ;Journal of Ethnopharmacology ,109 :226.
- **Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH, (2002):** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(10): 3010-3014.
- **DREYFUS B., CORDONNIER C., VERNANT JP (1992)** :Anémies hémolytiques extracorporelles non immunologiques. In : Breton-gorius J, Reyes F, Rochant H, Rosa J, Vernant JP éd. L'hématologie de Bernard Dreyfus. Paris : Flammarion :509-523.
- **Elalaoui MD , (2014)** : Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique des grains de *Nigella sativa* L. Mémoire Master biochimie appliquée, département biologie, faculté SNV STU, université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.
- **Felidj M., Bouazza M. & Ferouani T ., (2010)** : Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila (verticillata)* dans le parc national des Mont de Tlemcen (Algérie occidentale) , 34 : 147 -154 .
- **Festus ., Bertin Aguiah Vianou ., (2006)** :Contribution à l'étude de l'allo-immunisation post- transfusionnelle chez les patients transfusés à Cotonou Bénin Université d'Abomey- Calavi (Bénin ) - Ingénieur des travaux en analyses biomédicales .
- **Fouché J. G. ; Marquet A. et Hambuckers A., (2000)** :Les plantes médicinales de la plante au médicament .observatoire du monde des plantes sart- tilman.
- **Julie-Anne .,Do-Rouviere ;(2008)** :Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux. Mémoire pour diplôme d'études spécialisées de biologie médicale.
- **Hagerman AE, Muller-Harvey I, Makkar HPS (2000):** Quantification of tanins in tree foliage. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture. Vienna, 26p.
- **Harborne J.B.,(1998):**Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN:0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).

- **Heller W . & Forkmann G., (1993):** The flavonoids .Advanceces in research since 1986.In Harborne J.B.Secondrary Plant Products.Encyclopedia of plant physiology.Ed.Chapman & Hall,London :399-425.
- **Hogan D, Koler R., (2002) ;**Why are bacteria referactory to antimicrobials. Current opinion in Microbiology 5: 272-4.
- **Hostettmann, K., et al (1998):**The potental of higher plants as a source of new drugs. Chemie, 52: 10-17.
- **Igor Passi L.B.,(2002) :**Etude des activités biologique de Fagaraz anthoxyloides, Lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako,p 133.
- **Gonzalez-Tejero MR.,Casares-Porcel.,M.,Sanchez-RojasCP,etal.(2008) :**Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the project Rubia. J. Ethnopharmacol.; 116: 341-57.
- **Graham JG., QuinnML., FabricantDS., Farnsworth NR et al., (2000) :**Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. J Ethnopharmacol.; 73:347-77.
- **Guignard J.L., Cosson L.et Henry H., (1995 ) :**Abrégé de phytochimie;Hasson. 224p.
- **Guy M.,(2000) :**UniversitéLiège-GemblouxAgro-Bio Tech.Département phytotechnie tropicale et Horticulture.Passage des Déportés,2.B-5030 Gembloux Belgique .
- **Kansole M.R (2009) :**Etude ethnobotanique,phytochimique et activités biologiques de quelque lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucasmartinicansis (Jacquin) R.*
- **Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F., Bahramifar N. (2004) :**Comparison of essential oil composition of *Carumcopticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 86: 587 - 591.

- **Laigneau J. (2000)** :Mort annoncée du pire des tests spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. Collection du Centenaire de l'Algérie, Alger.
- **Lee RG ,(1998)** : Acquired hemolytic anemias resulting from direct effects of infections,chemical,or physical agents,1289-1304.
- **Levy et al., (2008)** ;Hématologie et transfusion.2<sup>ème</sup> édition. Elsevier Masson S.A .S.
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay Allemand C. (2005)** :Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques : 192-1.
- **MAJESTER-SAVORNIN, B et al. (1991)**: Saponines of the ivy plant. Hedera helix and their leishmanicidic activity. Planta Med. 57,260-262.
- **Makkar H.P.S., Siddhuraju P.et Becker K.,(2007)** :Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393; Ed: Humana Press: 67-111.
- **MARC ZANDECKI., (2006)** : Physiologie du globule rouge. Faculté de médecine-CHU 49000 Angers France.
- **Marin FR, Frutos MJ, Perez-Alvarez JA., (2002)**: Flavonoids as nutraceuticals :Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation Studies in Natural products Chemistry . Elsevier Science BV 26,p . 741-78.
- **Merad R.,(1973)** :Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne: Les inventaires du grand Alger. Thèse d'Etat, Institut des Sciences Médicales, université d'Alger, tome II, pp 312.
- **Mohan C., (2006)** :Buffers. A guide for the preparation and use of bufferd in biological systems .EMD,San Diego,California,Calbiochem:22.
- **Moussaoui S ., Harkati Z ., (2013)** :Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de trois plantes antidiabétiques : *Eucalyptus globulus*, *Haloxylon scaparium pomel* , *Marrbium vulgare* ;Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Master en biologie ,Option :Biochimie ;Université Abou Bekr Belkaid.



- **Nacoulma O., Ouedrago Y., Guissou I., Guede G., (2001)** :Evaluation in vivo et in vitro de la Toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racine de *Mitragyna inermis* (Willd).O. (Rubiaceae) ;Faculté des sciences et technique, Université de Ouagadougou.
- **Narayana C., Somayajulu B. A. R., Thirumala S. D., (1967)** :Recovery of fatty oil from spent seeds ofAjowan (*Trachyspermumammi* Linn.). *Indian J of Technology*, 5: 268 - 269.
- **Odile M., (2004)**: Biosynthèse des isoprénoides:synthèse d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-Phosphate,inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate ;Thèse de Doctorat ;Univ.Louis Pasteur :17-22.
  - **OMS (Organisation mondiale de la santé) ,(1998)** :Réglementation des médicaments à base de plantes ,la situation dans monde pour 1998 . WHO/TRM/98.1 . Genève.
  - **OMS (Organisation mondiale de la santé) ,(2002)** :rapport de médecine traditionnelle EB 111/9. Genève.
- **Paris M., Hurabielle M., (1981)** :Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. Edition Masson, Paris. p.182.
- **Quezel P., Santa S ., (1963)** :Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris.
  - **Ramawat KG., Dass S., Meeta M.,(2002)**:Chemistry diversity of bioactive m drugs molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In *herbal ethnomedicine modern medicine*,Ed Springer verlag Berlin Heidelberg,University Udaipur India;7-34.
  - **Rate SMK, (2001)** :Plants as source of drugs. *Toxicon* 39:603-13.
- **Rolland A., (1988)** :Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'*Eschscholtziacalifornia*, Doctorat de l'université de M et z, mention pharmacognosie, p441.

- **Saad B., Azaizeh H., Abu-Hijleh G.; Said O., (2006)** :Safty of traditional Arab herbal medecine. Evidence- Based Complement. Alternat.Med.; 3(4) : 433-439.
- **Sarni-Manchado, V. Cheynier, (2006)** :Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 398.
- **Schirner M., (2004)** : Huiles essentielles: Description de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. Guy Trédaniel, pp 23.
- **Singh R.P & Kaur G., (2008)**:hemolytic activity of aqueous of *Livistona chinensis* fruits.*Food and chemical Toxicology* ;46:553-556.
- **Soumyanath A ., (2006 )**:Traditional Herbal Medicines for Modern Times : Antidiabetic plants.CRC Press (Taylor Francis Group);6:19-82.
- **Thomas Michel .,(2011)** : Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification :application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaerhamnoides). Food and Nutrition. Université d'Orléans, French.
- **Trabut L., (1935)** : Flore du Nord de l'Afrique: Répertoire des noms indigènes des plantes.
- **Trease G.E. & Evans W.C., (1989)** :A text book of pharmacognosy (13 th Edition ) Bacilluere Tinal Ltd,London.
- **Trevoux R.;Arnal-Schnebelen B.,Schnebelen J.,(2000 )** :Interaction médicamenteuses, Interaction entre les plantes médecinales et la midication traditionnelle. Actualités reproduction humaine ; VIII (1) : 28- 32.
- **Tron I.,Piquet O.&Baert A., (2002)** : Toxon :manuel de toxicologie ,Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie :32-34 ;26-27.
- **Valnet,J .,(2001)** :« Aromathérapie »,Traitement des maladies par les essences de plantes.ED,vigot.
- **Veesenmeyer et al., (2009)** ;Pseudomonas aeruginosa virulence and therapy :evolving translational strategies. Crit Care Med ; 37 :1826-182 .
- **Vermerris W.,Nicholson R., (2006)** : phenolic compound biochemistry, Springer ,Dordrecht.ISBN-10 1-4020-5163-8.

- **Waâl N., (2013) :**Les Hyper –hémolyses ;Thèse présenté pour obtenir le diplôme de Doctorat en pharmacie ;Université Mohammed V – SOUISSI, Faculté de Médecine et de Pharmacie –Rabat .
- **Wehiner C.,(1931) :**Die planzenstoffe: Botanisch-systematischbearbeitet. Verlag Von Gustav Fisher, pp 879 - 880.
- **Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H. Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997):**Phytotherapy of hypertension and diabetes in orientai Morocco. J. of Ethnopharmacology, 58: 45-54.

## Méthode de préparation des réactifs pour tests phytochimiques

### Réactif de Mayer

- **Solution A** : 1,358 g de chlorure de mercure HgCl<sub>2</sub> sont dissous dans 60 ml d'eau distillé.
- **Solution B** : 5 g d'iode de potassium KI sont dissous dans 10 ml d'eau distillé ; les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

### Réactif de Wagner

- 2 g de KI et 1,27 g de I sont dissous dans 75 ml d'eau distillée, puis ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

### Liqueur de Fehling

- **Solution A** : solution sulfate de cuivre à 40 g/l.
- **Solution B** : 200 g de tartrate de potassium-sodium et 150 g de NaOH pour 1 litre d'eau distillé. Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

### PBS

Phosphate buffered saline PBS est une solution tampon très utilisé dans la recherche biologique moderne. Contient le chlorure sodium, sodium phosphate, la chlorure de potassium et le potassium phosphate. Utilisé pour la maintenance de pH constant, l'osmolarité et les concentrations d'ions de solution toujours utilisé ceux d'être humain (milieu isotonique), le PBS a beaucoup des utilisations parce qu'il considère comme isotonique et non toxique pour la cellule.

**Tableau 01:** L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique d'*Ammoides verticillata* à 37°C durant 1 heure à 548nm

	0 min	15min	30min	45min	60min
H,T	0,50	0,64	0,85	1,01	1,09
PBS+ susp	0,02	0,03	0,05	0,05	0,06
0,42mg/ml	0,04	0,02	0,05	0,06	0,11
0,84mg/ml	0,04	0,06	0,06	0,13	0,16
1,67mg/ml	0,08	0,12	0,17	0,23	0,28
3,33mg/ml	0,08	0,1525	0,185	0,4925	0,7325

**Tableau 02 :** L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique d'*Ammoides verticillata* préparé par décoction durant 1 h après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

<b>[d'extrait] mg/ml</b>	<b>0,42</b>	<b>0,84</b>	<b>1,67</b>	<b>3,33</b>
<b>H .T (%)</b>	<b>4,78</b>	<b>10,17</b>	<b>21,11</b>	<b>65,11</b>

