

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie



**Laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie,
Synthèse et Activité Biologique »**

*Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie, Option
« Biochimie appliquée »*

Thème

Contribution à la Recherche d'effet
hémolytique à partir d'extraits de *Berberis
vulgaris* L.

Présenté par : M^{elle} ELALAOUI Rachida

Soutenu devant le jury :

Soutenu le:1/07/2015

M ^r RAHMOUN N.	Maître de conférences	Président	Université de Tlemcen
M ^r AZZI R.	Maître de conférences	Examineur	Université de Tlemcen
M ^r LAHFA F.	Maître de conférences	Promoteur	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2014-2015

DEDICACE

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné,

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes sœurs : Moulaty, Aïcha, Malika.

*A mes frères: Mouhamed , moulay allï cherif, moulay omar, moulay abed
elkader.*

A mon fiancé : Moulay Zeydane.

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon
cursus à l'université: Leïla, Halima, Wahiba, Zahra, Rokia , Houda, fatima.*

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Lala Rachida

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier 'Dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur, LAHFA Farid Boucif, Maître de conférences classe au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la Vie et sciences de la Terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, ses qualités humaines. Pour tout 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 reconnaissante et en espérant être à l' hauteur de votre confiance.

Que Dr. RAHMOUN Mohammed Nadjib, Maître de conférences classe B au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen trouve ici l'expression de mes respectueuses gratitudes et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider cette jury.

Je remercie également Dr. AZZI Rachid Maître de conférence classe B au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen je vous adresse mes sincères remerciements et de mon profond respect d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier la directrice de laboratoire Madame BOUCHERIT .Z, Professeure à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen de m'avoir accueilli et mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à Mlle MEZOUAR Dounia, doctorante au département de Biologie, faculté des Sciences de la nature et de la vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université Abou bekr Belkaid-Tlemcen ; qui a fait preuve d'une grande disponibilité et de sa gentillesse a mon égard, et surtout de son aide et ses conseils sans faille.

Enfin, je tiens également à remercier toute les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et à évaluer l'activité hémolytique des extraits aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux des différentes concentrations vis-à-vis des globules rouge humain.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les écorces de racines de *Berberis vulgaris* a montré la présence des alcaloïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes et des composés réducteurs en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de mucilages.

La détection de ces familles chimiques est suivie de l'extraction des écorces de racines de *Berberis vulgaris* par des solvants de polarité croissante et une extraction des alcaloïdes totaux. L'analyse quantitative de l'extrait aqueux et hydrométhanolique sous reflux, est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une concentration de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et 2.05 mg CEQ/g en flavonoïdes.

Les tests d'hémolyse réalisée par la méthode spectrophotométrique on montré que les extraits des alcaloïdes totaux présentent un effet hémolytique très élevé à 5 mg/ml avec un taux d'hémolyse de 54,21% ,cet extrait est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouge. En revanche, les extraits aqueux et hydrométhanolique de *Berberis vulgaris* de concentration 5 mg/ml ont montré une activité hémolytique faible.

Mots clés: *Berberis vulgaris*, extraits brut, étude phytochimique, alcaloïdes totaux , activité hémolytique.

ملخص

يهدف عملنا لإجراء الدراسة الكيميائية النباتية وتقييم النشاط الانحلالي لتراكيز مختلفة للمستخلص المائي، الميثانولي المائي والقلويدات الكلية على خلايا الدم الحمراء .

الفحص الكيميائي النباتي النوعي الذي اجري على لحاء جذر الغريس أظهرت وجود القلويدات، العفص، الستيروول، التربينات الثلاثية والسكريات المختزلة بكميات كبيرة، كما كشفت وجود الكومارين، التربينويد، الصابونين والمواد المخاطية بكمية اقل. ويتبع الكشف عن هذه المجموعات الكيميائية استخلاص لحاء جذر الغريس مع مذيبات متزايدة الأقطاب واستخراج القلويدات الكلية. كما تم التحليل الكمي للبوليفينول والفلافونويد لمستخلص الهيدروميثاتول، مما يدل على محتوى 48.10 ملغ معادل حمض الغاليك/غ من البوليفينول و2.05ملغ معادل الكاتشين /غ من الفلافونويد.

وقد أظهرت اختبارات انحلال الدم التي أجريت بالطريقة الطيفية أن مستخلصات القلويدات الكلية لها تأثير انحلالي عالي عند تركيز 5 ملغ / مل بنسبة 54.21، يعتبر هذا المستخلص الأكثر سمية على للكريات الدموية الحمراء. ومع ذلك فإن المستخلصات المائية والمثانولية من الغريس أظهرت عند التركيز 5 ملغ / مل انخفاض النشاط الانحلالي.

الكلمات المفتاحية: الغريس ، المستخلصات الخام، الدراسة الكيميائية النباتية، قلويدات الكلية، النشاط الانحلالي الدموي.

Table des matières

Table des matières	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations	
Introduction générales.....	1
1ère partie: synthèse bibliographique	
Synthèse Bibliographique.....	4
I. Plantes médicinales.....	5
1. Introduction	5
2. Métabolites secondaire.....	5
2.1. Les composés phénoliques.....	6
➤ Les acides phénoliques simples.....	6
➤ Les flavonoïdes.....	6
➤ Les tanins.....	7
➤ Les quinones.....	7
➤ Les coumarines.....	8
2.2. Les isoprénoïdes (Terpénoïdes).....	8
2.3. Les alcaloïdes.....	8
II. Etude de la toxicité des plantes	9
III. Berberis Vulgaris	12
1. Classification	12
1.1. Classification classique	12
1.2. Classification phylogénétique.....	12

2. Description botanique	12
3. Répartition géographique.....	13
4. Composition chimique.....	13
5. Usage et propriété	14

2ème partie: étude expérimentales

Matérielles et Méthodes.....15

I. Etudes phytochimiques.....	16
1. Matériel végétal.....	16
2.Extraction.....	16
3. Extraction des alcaloïdes totaux.....	16
4. Tests phytochimiques.....	17
a. Alcaloïdes.....	17
b. Substances polyphénoliques.....	17
➤ Flavonoïdes.....	17
➤ Anthocyanines (Leucoanthocyanes).....	17
➤ Tanins.....	18
c. Coumarines.....	18
d. Anthraquinones.....	18
e. Stérols et triterpènes : Lieberman – Burchardt	18
f. Terpénoïdes : Test de Slakowski.....	18
g. Saponosides.....	18
h. Composés réducteurs.....	19
i. Mucilages.....	19

j. Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani.....	19
5. Dosage des polyphénols totaux.....	19
6. Dosage des flavonoïdes.....	20
II. Activité biologique.....	20
1. Test d'hémolyse.....	20
1.1 Préparation de la suspension érythrocytaire.....	20
1.2 Mesure de la fuite de l'hémoglobine.....	20
III. Analyses statistiques.....	21
<i>Résultats et interprétations</i>	22
I. Etude phytochimique.....	23
1. Extraction.....	23
2. Tests phytochimiques.....	23
3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	25
II. Activité biologique.....	26
1. L'évolution de l'effet hémolytique de plante étudié.....	26
Discussion	34
Conclusion	38
Références bibliographiques	40
Annexe	50

Liste des Tableaux

Tableau 1: Résultats de l'examen phytochimique.....	24
Tableau 2 : Rendements obtenus pour les extraits bruts sous reflux de Berberis vulgaris	51
Tableau3 : Densités optiques et l'écarte type obtenues pour l'extrait aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux respectivement de Berberis vulgaris.....	52
Tableau 4: Effet hémolytique des extraits eau/MeOH sous reflux	53
Tableau 5 : Effet hémolytique des alcaloïdes totaux.....	54
Tableau 6 : Effet hémolytique des extraits aqueux sous reflux.....	55
Tableau 7: Densités optiques obtenues pour un témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée	56

Liste des figures

Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes	7
Figure 2 : Exemple de structures alcaloïdiques.....	9
Figure 3 : Photo de <i>Berberis vulgaris</i>	14
Figure 4 : Rendements des extraits sous-reflux de <i>Berberis vulgaris</i>	23
Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	25
Figure 6 : Courbe d'étalonnage de catéchine.....	25
Figure7: L'évolution de l'absorbance en fonction du temps des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations des extraits brut aqueux, hydrométhanlique et alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i> incubé à 37°C.....	26
Figure 8: L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des extraits brut aqueux, hydrométhanologique et alcaloïdes totaux de <i>Berberis Vulgaris</i> incubé à 37 °c durant 1 heure à 548nm.....	28
Figure 9: Evolution de taux d'hémolyse (%) en fonction de temps en présence des différentes concentrations d'extrait brut aqueux ,hydrométhanologique et alcaloïdes totaux de <i>Berberis vulgaris</i>	31

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

CH₃OH : Méthanol

CHCl₃: Chloroforme

DO : Densité Optique

FeCl₃: Chlorure de fer

M : Molaire

MeOH : Méthanol

mg CEQ/g : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

mg GAE/g : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mg : Miligramme

mm : Millimètre

NH₄OH : Ammoniaque

v/v : Rapport volume par volume

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Les laboratoires de chimie et de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action.

Est-il nécessaire de rappeler que des « remèdes » aussi efficaces que la quinine, chef de file des antimalariques, la morphine, analgésique majeur, l'ergot de seigle aux vertus antimigraineuses ou le curare aux propriétés myorelaxantes sont d'origine végétale (Celément, 2005). Trouver un traitement pour certaines maladies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires ou le VIH /SIDA constituent un challenge important pour les scientifiques.

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent. (Marc, 2001).

Aujourd'hui, et malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants et à moindre effets secondaires remarqués lors de leur utilisation, soit parce qu'elles sont moins agressives et moins nocives pour l'organisme (Arrif et Benkhaled, 2009).

La recherche de nouvelles molécules pharmacologiques actives via le screening de sources naturelles a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacologie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun, 1997).

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est en croissance partout dans le monde, mais une majorité des personnes ne connaît certainement pas les effets secondaires éventuels des plantes, ni comment et quand elles peuvent être utilisées en toute sécurité (Zakariya et coll., 2012).

La notion de dose est déterminante. Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'Homme (Fourasté, 2000), Il est donc nécessaire d'identifier la partie de la plante utilisable.

En effet, le principe actif d'une plante toxique peut être réparti sur toute la plante ou dans une ou plusieurs de ses parties : la racine, les baies ou les feuilles (Soulaymani, 2010).

Dans le cadre de la recherche de molécules à activités biologique nouvelles d'origine végétale, il est préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales (Ghourri et coll., 2013).

L'Algérie, de part sa situation géographique, bénéficie d'un climat très diversifié, les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes [(Mahmoudi, 1987) ; (Belouad, 1998)].

L'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité puisse être entreprise en vue de son adaptation en tradithérapie (Ouedraogo et coll., 2001).

Des travaux réalisés au sein du laboratoire antibiotiques, antifongiques : Physico-chimique, synthèse et activité biologique sur *Berberis vulgaris* L. ont montré que cette plante présentent des activités antioxydantes et antimicrobiennes très intéressantes .

Pour notre part, nous souhaitons apporter notre contribution à ces travaux. Pour cela, nous avons entrepris un travail qui consiste à évaluer l'effet hémolytique de cette plante médicinale vis-à-vis des globules rouges humains.

I. Plantes médicinales

1. Introduction

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Lhuillier, 2007). Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé -Gagnon, 2006).

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth et al, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et al, 2007).

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (Kansole, 2009).

2. Métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés

selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (Cuendet, 1999; Vermerris, 2006). On distingue trois classes principales:

2.1. Les composés phénoliques

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti inflammatoires, antioxydants (Bahorun, 1997). Selon Diallo, (2005), les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié des groupements hydroxyles, ces molécules représentent une famille de plus 8000 composés (Dacosta, 2003). Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King and Young, 1999 ; Tapiero et al. 2002).

➤ **Les acides phénoliques simples**

Le terme d'acide -phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, la pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques , certains auteurs sont cependant plus restrictif :ils n'utilisent le terme d'acide -phénolique pour dérivés en C6-C1incluent les dérivés cinnamique dans le groupe plus large, des phényl -propanoïdes .(Bruneton 2009).

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes) (Fiorucci, 2006). Tous les flavonoïdes (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Bruneton, 1999 ; Reynaud et Lussignol, 2005).

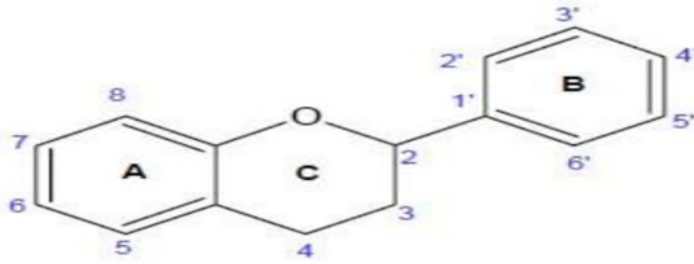


Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Ils comprennent les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes (Cseke, Kirakosyan et al., 2006).

Les flavonoïdes sont reconnus essentiellement pour leur action antioxydant [Bruneton, 1999], modulatrice de l'activité de certaines enzymes, vasculoprotectrice [Vitor et al., 2004] [Ghedira, 2005], anti-inflammatoire [Chen et al., 2008] et antidiabétique [Marfak, 2003].

➤ **Les tanins**

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique, ils sont localisés dans les vacuoles, quelquefois combiné aux protéines et aux alcaloïdes. (Catier et Roux, 2007). Ils sont divisés en deux groupes: les tanins condensés et les tanins hydrolysables dont les tanins galliques et ellagiques [Khanbabaee et Van Ree, 2001].

➤ **Les quinones**

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides (Kansole, 2009).

➤ Les coumarines

Pour la première fois, la coumarine fut isolée de la fève tonka (*Coumarouna odorata*) à la quelle elle confère son odeur caractéristique de foin coupé (Garnero, 2000). Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

2.2. Les isoprénoïdes (Terpénoïdes)

Ce sont des composés organiques lipidiques dérivant de la condensation de plusieurs molécules d'isoprène. On distingue les mono-terpènes (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅), les diterpènes (C₂₀), les triterpènes (C₃₀) et les tetraterpènes (C₄₀). Le caoutchouc est un polyterpène (C₅H₈)_n ou n est grand. Les terpènes constituent le principe odoriférant des végétaux (Limonène de citron). Beaucoup de molécules terpéniques possèdent des propriétés antiseptiques (Larousse, 2008).

2.3. Les alcaloïdes

La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910 : « Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose » (Zenk et Juenger, 2007). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts et Wink 1998 ; Stockigt et al. ; 2002) .

On distingue généralement :

- ✓ Les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle ;
- ✓ Les proto-alcaloïdes, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique ;
- ✓ Les pseudo-alcaloïdes, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine), souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agent antipaludéens (quinine, chloroquine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La figure ci-dessous présente quelques structures alcaloïdiques à usage thérapeutiques :

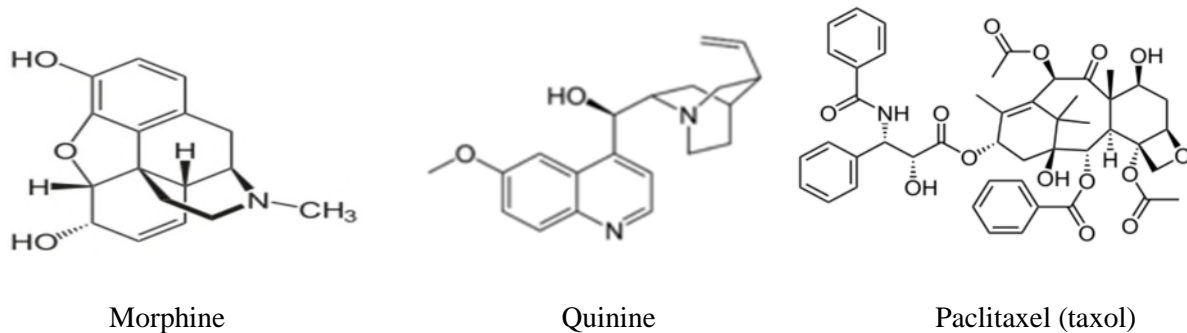


Figure 2 : Exemple de structures alcaloïdiques (Badiaga et al 2011)

La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, la phytothérapie n'a pas que des effets bénéfiques. Comme tout produit actif, elle peut avoir des effets indésirables, toxiques et allergiques.

II. Etude de la toxicité des plantes

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels. (Fournier, 2001).

Les plantes sont à l'origine de 5% des intoxications signalées au CAP (Centre Anti Poison) de Strasbourg et 3,2% des intoxications selon l'Association Américaine des Centres Anti Poison [Patrick, 2003 ; Flesch, 2005]. Parmi l'ensemble des plantes réputées toxiques, certaines présentent un danger réel en cas d'injection alors que d'autres ne provoquent que des troubles mineurs, principalement digestifs.

Tous les organes de la plante contiennent les principes toxiques, mais surtout les racines et les graines, renferment des alcaloïdes diterpéniques dont le principal est l'aconitine qui a une toxicité principalement neurologique et cardiaque (Flesch, 2005). Des études sur les propriétés

phytochimiques ou biologique de plusieurs produits végétaux ont démontré l'action et le potentiel toxique de ces produits sur les systèmes cellulaires des mammifères (Aline,2010) .

En effet , une toxine est une substance capable de perturber , immédiatement ou à long terme,de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener la mort (Viala et Botta, 2007).Cette toxicité dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition, des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques(Tron et coll .,2002).

Les toxines interviennent au niveau des sites cellulaires et agissent sur des cibles moléculaires dont la nature chimique est variable à savoir: les protéines de structure (membranes), les enzymes, les transporteurs comme l'hémoglobine, les coenzymes, les lipides, les acides nucléiques et les sucres ; Ces derniers étant en revanche rarement affectés par les molécules toxiques. Ainsi, les effets spécifiques des toxines résultent de la présence de récepteurs qui interviennent dans leurs mécanismes d'action (Tron et al., 2002).

Les effets toxiques peuvent être classés de diverses façons, selon, par exemple :

- la durée : aiguë, chronique;
- le type d'action : locale, systémique;
- le mécanisme d'action : stimulant, inhibiteur;
- la voie de pénétration : respiratoire, cutanée, digestive;
- le tissu ou l'organe affecté : sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique);
- la nature de l'effet: irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérigène;
- l'utilisation : pesticides, savons, solvants ; (Ababsa, 2009).

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités (Alain, 2002).L'Homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique (Bismuth et al., 1987).

Des travaux antérieur ont montré que *Chenopodium ambrosioides*, appartenant à la famille des chenopodiacées , utilisée comme vermifuge, antispasmodique, carminative peut

présenter une toxicité rénale .Cela constitue une limite à son utilisation malgré ses propriétés thérapeutiques (kaoubaia et coll.,2011).

L'utilisation de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) entraîne une hypokaliémie ,oligurie et les œdèmes semblables à une néphrite aiguë (Hammouda et coll.,2005) .

Nigella sativa L . est une plante indiquée contre les problèmes d'estomac. Elle est utilisées également comme un préventif contre l'asthme, le diabète et la diarrhée .Parmi les intoxications dues à l'utilisation de cette plante, une sécheresse de la bouche, une irritation bucco pharyngée, des inflammations de la langue, des amygdales et du rhinopharynx (Anyinam,1995).

D'après les études ethnobotaniques réalisées par Allali et al et Azzi et al, *Berberis vulgaris*, appelé communément Ghriss est utilisé par la population locale de Tlemcen, pour traiter le diabète sucré (Allali et al., 2008 ; Azzi et al.,2012).). La décoction et l'infusion des racines et feuilles de *Berberis vulgaris* sont utilisées pour traiter le diabète sucré (Meliani et al., 2011 ; Azzi et al., 2012). C'est pourquoi, nous avons jugé nécessaire d'évaluer l'effet hémolytique de cette plante vis –à vis d'un modèle de cellules animales à savoir les globules rouges humains.

De ce fait, le globule rouge à 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 ioniques transmembranaires et la présence de cette système de transport similaires à ceux dans certains tissu justifier cette choix (Wajeman et al., 1992).

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leur hémoglobinique (Aguilar-Martinez, 2007)

La lyse des globules rouges peut être simplement réalisée en plaçant des hématies dans une solution hypotonique (hémolyse osmotique) ou L'érythrocyte passe de sa forme de disque biconcave à une forme sphérique allongée caractérisée par le passage des ions K^+ vers le milieu extracellulaire et les ions Na^+ passent dans le milieu intracellulaire, par conséquence la membrane cellulaire est brisés, aboutissant à la libération du contenu dans le milieu extracellulaire [Seemant, 1974].

III. Berberis vulgaris (Berberidaceae)

Berberis, nom arabe du fruit de la plante ; il signifierait coquille car les pétales creuses sont en forme de coquille.

Nom scientifique : Berberis vulgaris. (L.)

Nom commun français : Epine vinette.

Nom commun arabe : Ghriss.

1. Classification

1.1 Classification classique :

Règne : plantae.

Division : magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Ranunculales.

Famille : Berberidaceae.

Genre : Berberis.

Espèce : Berberis vulgaris.

1.2. Classification phylogénétique :

Ordre : Ranunculales.

Famille : Berberidaceae.

2. Description botanique

Arbuste à feuilles caduques, pouvant atteindre 2 à 3 m de haut. Branches et rameaux armés d'épines. Feuilles ovales, finement dentelées. Fleurs jaunes, très petites, en grappe. Le fruit est une baie oblongue, rouge. (Schauenberg et Paris, 2005).



Figure 3 : Photo de *Berberis vulgaris* (Wikipédia, 2012).

3. Répartition géographique

Elle est commune à la plupart des régions d'Europe Centrale et d'Europe du Sud et dans les régions du Nord-Est des États-Unis. Elle est généralement répartie sur la plus grande partie de l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie tempérée (Chevallier, 2001 ; Saeed Arayne et al, 2007).

En Algérie, elle est fréquente dans les hautes montagnes, au-dessus de 1500 m, à Djurdjura-Babors, Atlas de Blida, Aurès, montagnes du Hodna et Atlas saharien (Quezel et Santa, 1962).

4. Composition chimique

L'écorce de la racine et la tige de *Berberis vulgaris* ont à la fois des propriétés médicinales et toxiques dues à la présence de berbérine, un alcaloïde isoquinoléine, présent la plupart du temps dans ces organes (Bruneton, 1999)

Berberine, est l'alcaloïde qui a reçu le plus de recherche et la plus large renommée comme le composant actif de *Berberis*. C'est un alcaloïde cristallin jaune et amer. Autres constituants sont l'oxyacanthine, et berbamine, un peu de tanin, de cire, de résine, de graisse, de l'albumine, de la gomme et de l'amidon

D'autres molécules sont isolées des fruits, dont le terpénoïde, l'acide oléanolique, le stigmastérol, le stigmastérol glucoside (Saied et Begum, 2004), l'acide ascorbique, l'acide malique et les tanins (Hanachi et Golkho, 2009).

5. Usage et propriété

Berberis vulgaris ont longtemps été utilisé comme un remède pour le traitement d'une variété de maladies. Le principal produit chimique berbérine constituant cette plante possède une large gamme d'activités biochimiques et pharmacologiques, à savoir anti-diarrhéique, anti-arythmique anti-inflammatoire, contre la fièvre, analgésique(anti-douleur) (Kupeli et al., 2002 et Yesilada et Kupeli, 2002) et activité antitumorale (Huangetal,1989; Takaseetal,1993;Fukudaetal.,1999a,1999b).

L'épine-vinette agit sur le fonctionnement de la vésicule biliaire en accroissant la production de bile et en soulageant les affections telles que douleurs et jaunisses. Grace à ses fortes propriétés antiseptiques, elle soigne les dysenteries amibiennes, le choléra et autres infections gastro-intestinales similaires. L'écorce est astringente, antidiarrhéique, et favorise la cicatrisation du tube digestif.(Iserin et al.,2001)

Toutes les parties de la plante *Berberis vulgaris* ont longtemps été utilisé comme un remède traditionnel pour le traitement de divers troubles de l'organisme, y compris dysfonctionnement du foie, la vésicule biliaire, la diarrhée, l'indigestion et les maladies des voies urinaires. (Fallah Huseini et al.,2010 ; Zovko Končić et al.,2010).

Ce travail est réalisée dans le laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activités Biologiques » du département de Biologie Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen.

I. Etude phytochimique

1. Matériel végétal

Berberis vulgaris (Berberidacée), a été obtenu auprès des herboristes de la région de Maghnia – Tlemcen en Mars 2015.

La partie utilisée dans cette étude est l'écorce des racines du Ghriss qui sont maintenues à l'abri de la lumière et à température ambiante.

2. Extraction

Les écorces de racines sont broyées finement le jour même de l'extraction. La matière végétale 20 g a été mise en contact avec 200 ml du solvant. Les solvants utilisés sont : eau/méthanol (30 :70) et eau. l'extraction a été réalisés sous reflux sous agitation pendant 3 h .

Les extraits obtenus sont filtrés sur papier filtre, et l'extraits hydrométhanolique est concentrés à sec par évaporation rotative dans un rotavapeur – Heidolph. Les extraits aqueux est évaporés dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C.

3. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux a été faite selon le protocole de Makkar et al, 2007 avec quelques modifications.

40 g de la matière végétale est extraite par 400 ml d'acide acétique à 10 % dans le méthanol. L'extrait est macéré pendant 72 h avec agitation et à l'abri de la lumière. Après filtration, l'extrait est concentré au rotavapeur à ¼ de son volume initial, puis précipité par l'addition d'hydroxyde d'ammonium concentré.

Les deux phases obtenues sont extraites par le chloroforme jusqu'à leur épuisement total, et la phase organique est évaporée à sec à 40 °C. Le résidu obtenu des alcaloïdes totaux est conservé au réfrigérateur à +4 °C.

4. Tests phytochimiques

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter différentes familles chimiques présentes dans la plante par des réactions de coloration et de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette.

L'examen phytochimique est réalisé sur trois extraits : aqueux, méthanolique et étherique, obtenus par extraction de 10 g de la poudre des écorces de racine de *Berberis vulgaris* par 100 ml du solvant sous reflux pendant 1h.

a. Alcaloïdes

10 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique 2 % sous agitation au bain marie à chaud. Après refroidissement et filtration.

Le filtrat est divisé en 2 volumes égaux : le tube 1 est traité par le réactif de Mayer et le tube 2 est traité par quelques gouttes du réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc et marron respectivement indique la présence des alcaloïdes [Majob, 2003]

b. Substances polyphénoliques

➤ **Flavonoïdes** : Réaction à la cyanidine

1 ml de l'infusion obtenue est ajouté à 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylique puis quelques copeaux de magnésium [N'Guessan et al, 2009].

Coloration sur la phase surnageante :

Rose orangé : flavones ;

rose violacé : flavonones ;

rouge : flavonols, flavanonols

➤ **Anthocyanines (Leucoanthocyanes)**

À 1 ml d'infusion est ajouté 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylique. Le mélange est chauffé pendant 15 min.

Coloration :

Rouge-cerise violacé : leucoanthocyanes ;

brun-rouge : catéchols.

➤ **Tanins**

À 1 ml de l'infusion est ajouté 200 µl de FeCl₃ 1 %. Leur présence est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir [Karumi et al, 2004].

c. Coumarines

5 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans l'eau chaude 2 ml. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml NH₄OH 25 %, ensuite, une goutte de chaque tubes est prélevée puis déposé sur un papier filtre et observation sous U.V. à 366 nm [Bruneton, 1999].

Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH₄OH.

d. Anthraquinones

À 10 ml de l'extrait est ajouté 5 ml de NH₄ OH 10 %, après agitation, leur présence est indiqué par une coloration violette dans la phase ammoniacale [Oloyede, 2005].

e. Stérols et triterpènes : Lieberman – Burchardt

5 ml de l'extrait est évaporé. Le résidu est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré.

L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert indique leurs présences [Edeoga et al, 2005].

f. Terpénoïdes : Test de Slakowski

5 ml de l'extrait est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes [Khan et al, 2011].

g. Saponosides

10 ml de l'extrait est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides [N'Guessan et al, 2009].

h. Composés réducteurs

1 ml de la solution est chauffé dans un bain marie, puis 200 µl de réactif de Fehling est ajouté au résidu. Un test positif est obtenu par la présence d'un précipité rouge brique [Cai et al, 2011].

i. Mucilages

1 ml de l'extrait est ajouté à 5 ml d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages

j. Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani

5 ml de l'extrait est mélangé à 2 ml d'acide acétique glacial contenant une goutte de FeCl_3 , puis, l'addition de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré [Khan et al, 2011].

La formation d'un anneau marron, violet ou vert à l'interphase indique leur présence.

5. Dosage des polyphénols totaux

Le réactif utilisé est le réactif de Folin-Ciocalteu, c'est un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$).

Les composés phénoliques totaux sont quantifiés de la manière suivante : 0.1 ml des extraits aqueux et hydrométhanolique ou acide gallique est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 2%. Après agitation et incubation pendant 5 minutes, 100 µl du réactif Folin-Ciocalteu 1 N est ajouté. Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc [Vermerius et Nicholson, 2006].

Une courbe étalon est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche mg GAE / g.

6. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par colorimétrie selon le protocole de Zhishen et al, 1999.

500 µl de l'extrait aqueux et hydrométhanolique ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée, puis 150 µl d'une solution de nitrite de sodium NaNO_2 15 % est ajouté.

Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, 150 µl de chlorure d'aluminium AlCl_3 10 % est ajouté. Et, à 6 minutes, 2 ml d'hydroxyde de sodium 4 % est ajouté. Le volume total est complété à 5 ml d'eau distillée.

Après agitation et incubation pendant 15 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm contre un blanc.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche mg CEQ / g.

II. Activité biologique

1. Test d'hémolyse

1.1 Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec une solution de PBS, puis repris à nouveau dans le tampon phosphate de sodium salé (PBS) à 10 mM, pH 7.4.

1.2 Mesure de la fuite de l'hémoglobine

Les globules rouges sont suspendus dans le PBS à raison de 4000 cellules/ml (0.5 ml sont mis en contact avec 9.5 ml de PBS). La suspension érythrocytaire à 2% est incubée à 37°C pendant 60 min avec différentes concentrations des extraits testés. Des prélèvements de 0.5 ml sont réalisés chaque 15 min pour être repris dans 1 ml de PBS. Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm. Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée. Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif.

Pour chaque échantillon le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation (Lee, 2002):

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(D.O_{\text{Extrait}} - D.O_{\text{Contrôle négatif}}) / D.O_{\text{Contrôle positif}}] \times 100$$

III. Analyses statistiques:

Des études statistiques ont été réalisées pour la comparaison des résultats et l'évaluation de la précision et de l'exactitude d'analyse. [Schwartz D, 1992; Amotte M, 1971].

➤ **La moyenne (m)**

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

➤ **L'écart type (σ)**

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

➤ **Test de Student**

Pour comparer les moyennes des deux échantillons indépendants, nous avons appliqué le test de Student « te » à un degré de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon.

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

La valeur de «te» donne le degré de signification «p» lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est:

- ✓ Peu significative si $p < 0,05$ (*)
- ✓ Significative si $p < 0,01$ (**)
- ✓ Très significative si $p < 0,001$ (***)
- ✓ Hautement significative si $p < 0,0001$ (****)

I. Étude phytochimique

1. Extraction

L'extraction des écorces de racine de *Berberis vulgaris* ont été réalisés : l'extraction sous reflux pendant 3 h.

Les solvants utilisés sont : eau distillée, eau / méthanol (30 : 70), Les rendements obtenus sont présentés dans le figure 3

Les résultats obtenus montrent que le rendement est meilleur pour les extraits bruts obtenus par extraction sous reflux.

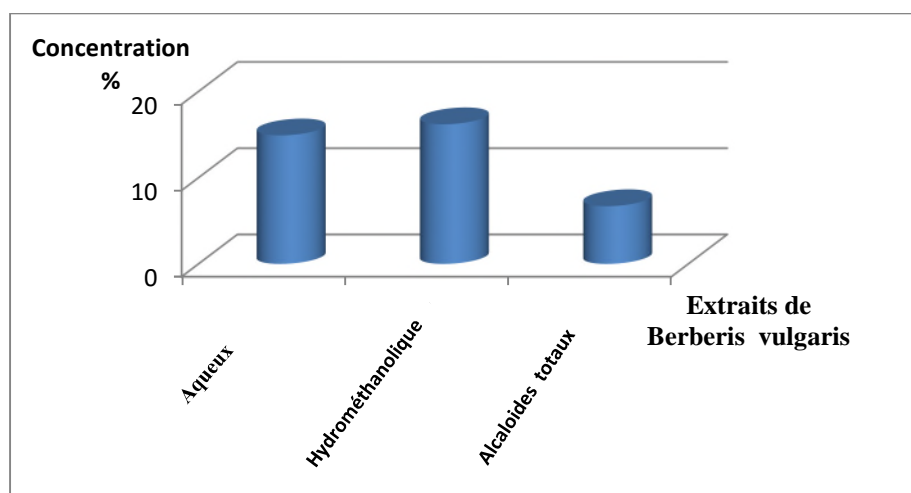


Figure 4 : Rendements des extraits sous-reflux de *Berberis vulgaris*

Le rendement pour l'extraction sous reflux est meilleur avec l'extrait hydrométhanolique, ensuite l'extrait aqueux. Tandis que les extraits des Alcaloïdes totaux ont présentés des rendements faibles.

2. Tests phytochimiques

Les tests de caractérisation réalisés sur les trois extraits aqueux, méthanolique et étherique, ont donné les résultats reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats de l'examen phytochimiques des différentes préparations de *Berberis vulgaris*.

Familles chimiques		Extraits		
		Aqueux	Méthanolique	Etherique
Alcaloïdes	Mayer	+++	+++	-
	Wagner	+++	+++	-
Substances polyphénoliques	Flavonoïdes	-	-	-
	Anthocyanines	-	-	-
	Tanins	+++	++	-
Coumarines		+	+	-
Anthraquinones		-	-	-
Stérols et triterpènes		+	+++	+++
Terpénoïdes		+	-	-
Saponosides		++	-	-
Composés réducteurs		+++	+++	-
Mucilages		++	+	-
Glycosides cardiaques		-	-	-

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits des écorces de racines de *Berberis vulgaris* ont révélé la présence des coumarines, des terpénoïdes, de saponosides et de mucilages. Les composés les plus abondants sont les alcaloïdes, les tanins, les stérols et les triterpènes et les composés réducteurs.

Les tests de recherche des flavonoïdes, des anthocyanines, des anthraquinones et des glycosides cardiaques ont été négatifs sur nos extraits.

3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE/g), et mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg CEQ/g) respectivement.

L'extrait aqueux et hydrométhanolique obtenu par extraction sous reflux, a montré une concentration de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et une teneur plus faible en flavonoïdes 2.05 mg CEQ/g, ceci nous laisse à penser que les polyphénols sont représentés surtout par la famille des tanins qui a donné un test positif pour l'examen phytochimique.

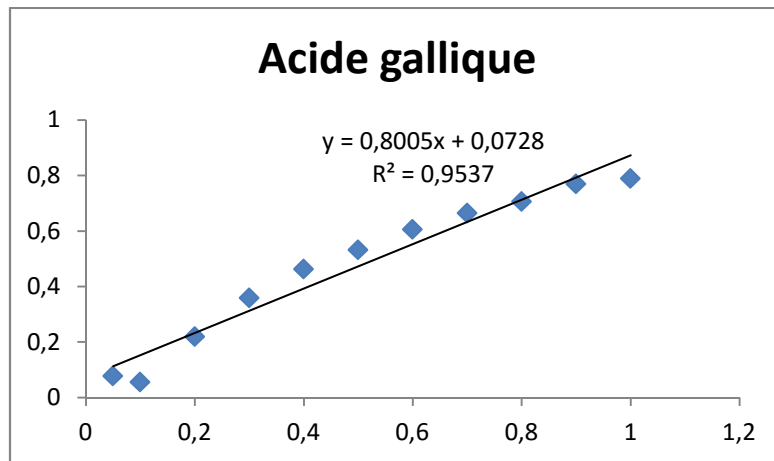


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

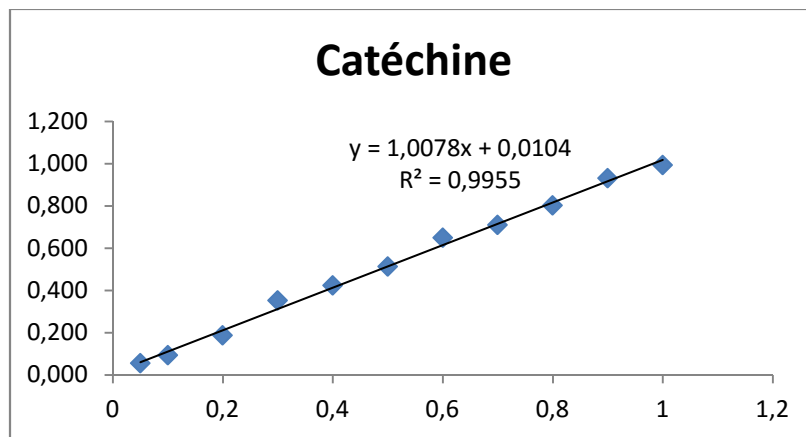
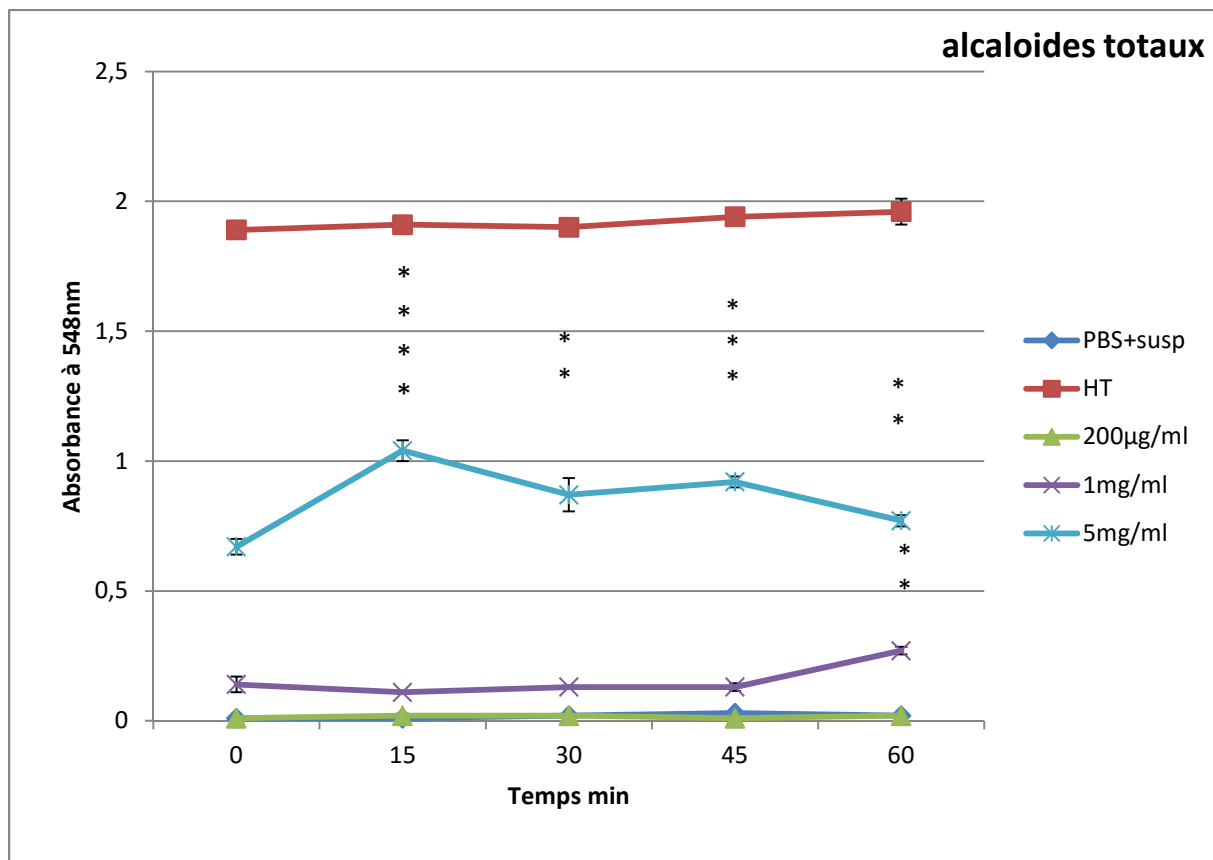


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de catéchine

I. Activité biologique

1. L'évolution de l'effet hémolytique de plante étudié

Les figures 07 , 08 présentent l'évolution de l'effet hémolytique en fonction de temps, par absorbance, durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37 °C, et en présence des différentes concentrations des extraits aqueux, hydrométhanique et alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* (200µg/ml, 1mg/ml, 5 mg/ml), préparées par décoction, comparées à un témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée.



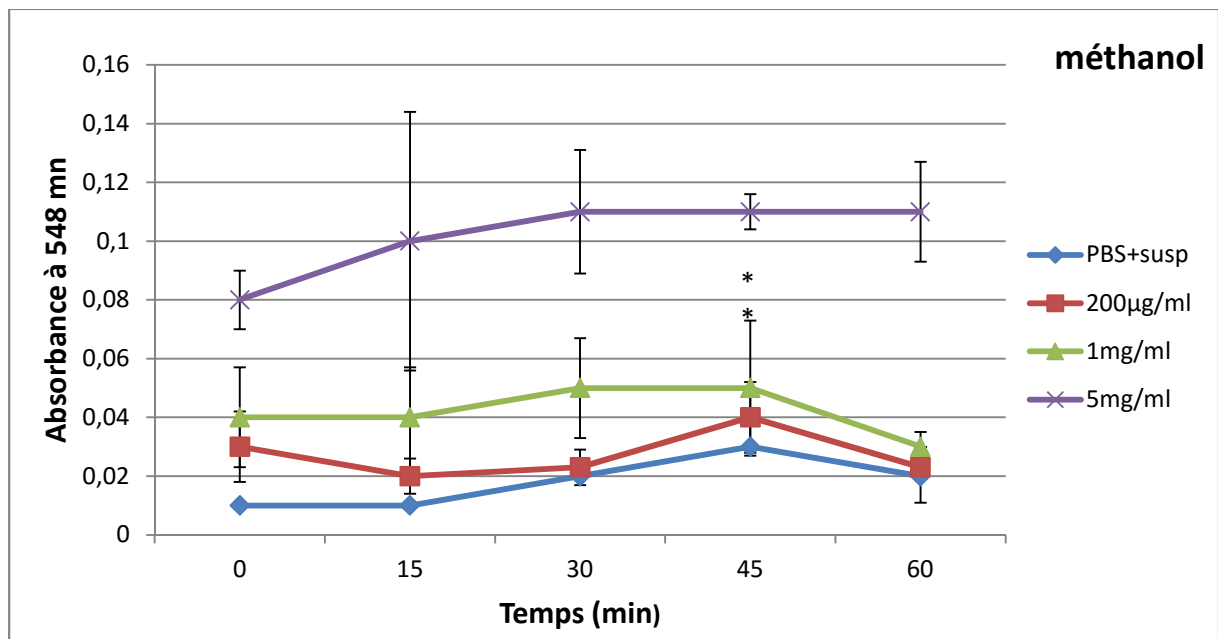
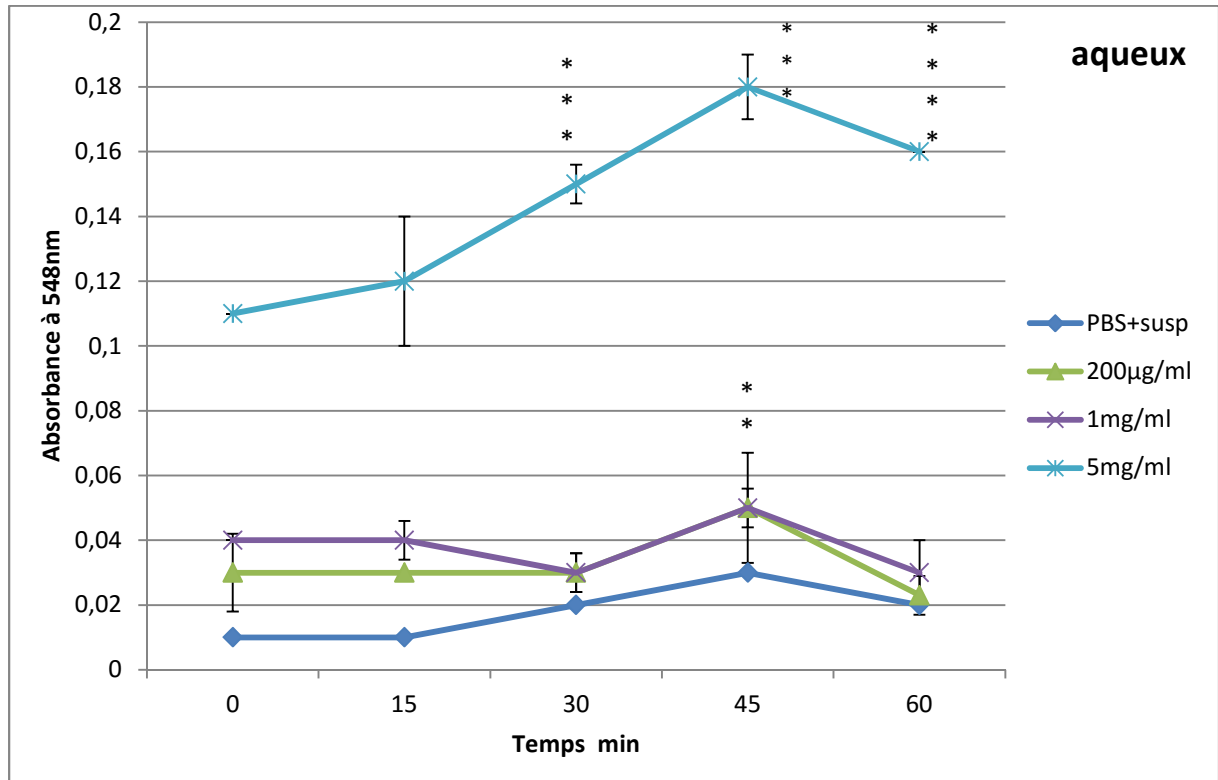
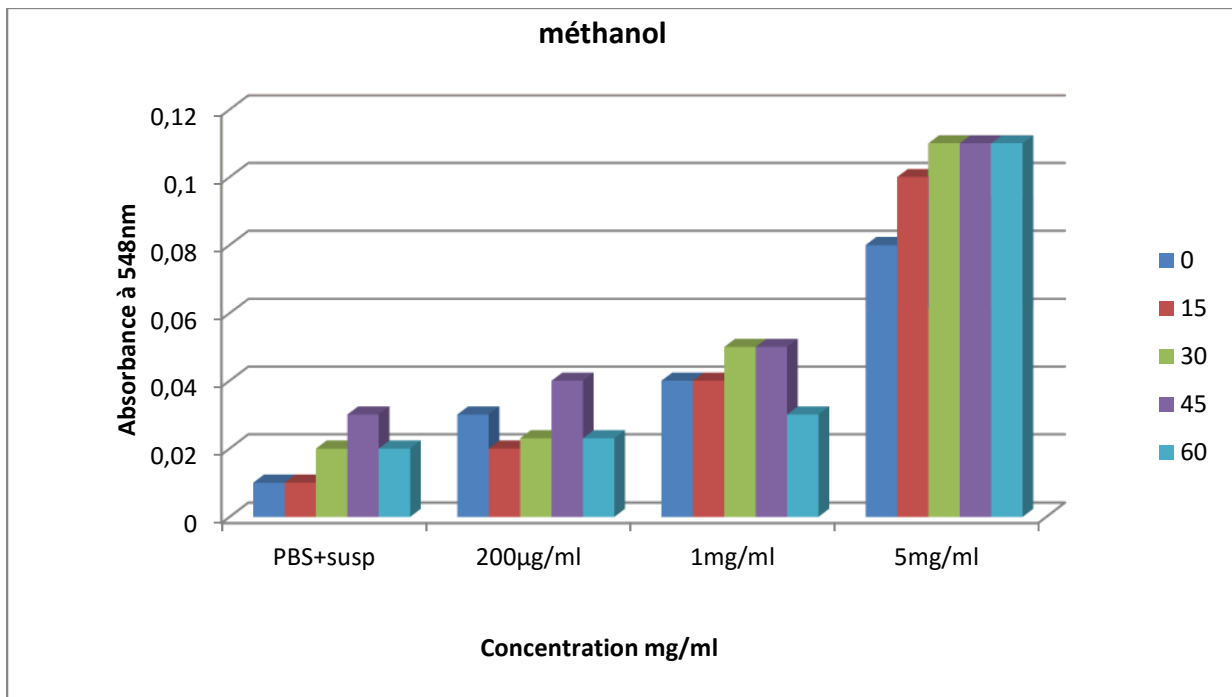
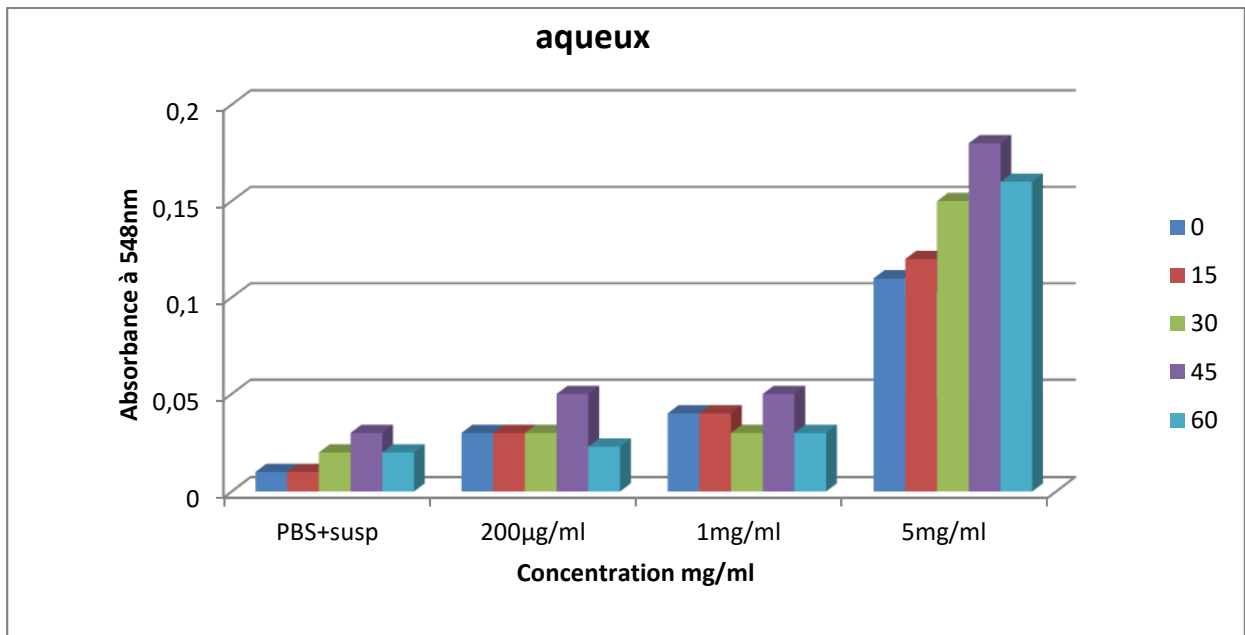


Figure7: L'évolution de l'absorbance en fonction du temps des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations des extraits brut aqueux, hydrométhanique et alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* incubé à 37°C.

* P < 0.05; ** P < 0.01 ; P*** < 0,001 ****P <0.0001 signification par rapport Temps 0 min ; PBS: témoin négatif; HT hémolyse total.



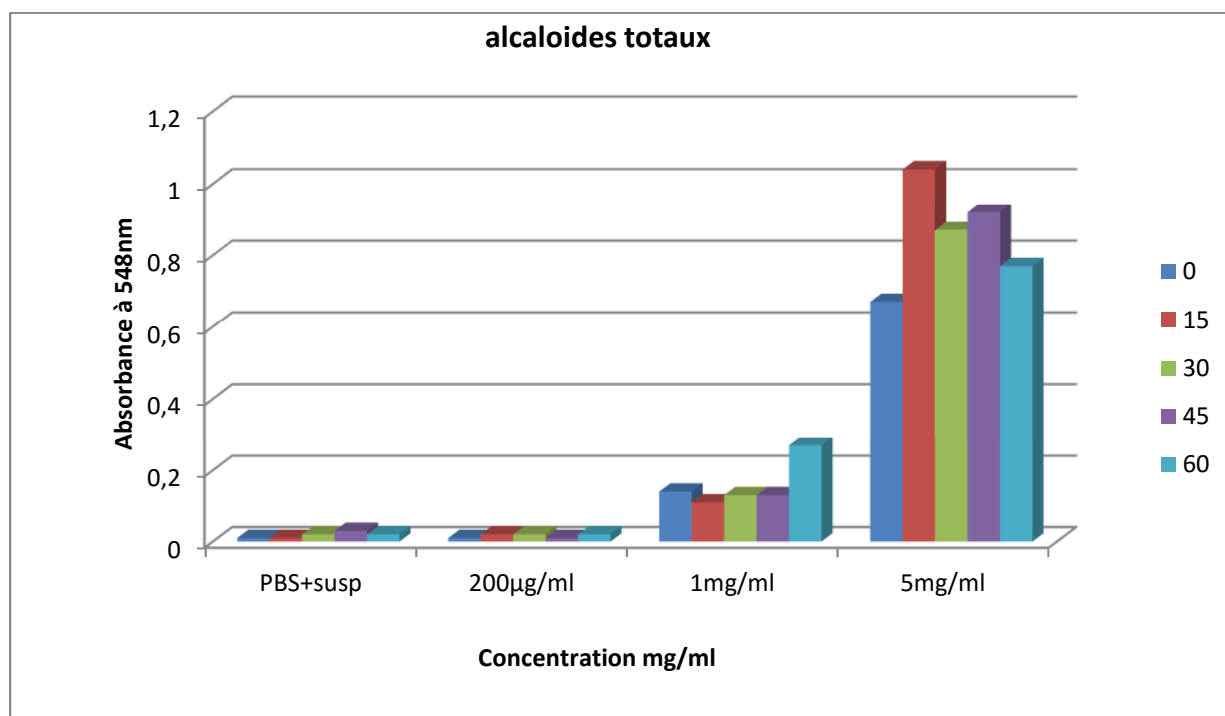


Figure 8: L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des extraits brut aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux de *Berberis Vulgaris* incubé à 37 °c durant 1 heure à 548nm.

L'Absorbance pour l'extraction sous-reflux est meilleur avec l'extrait alcaloïdes totaux, Tandis que les extraits aqueux et hydrométhanolique ont présentés des absorbance plus faibles.

Les résultats obtenus, montrent que les pourcentages d'effet hémolytique sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits en fonction du temps

Pour l'extrait aqueux ainsi que hydrométhanolique, à des concentrations faibles (200µg/ml et 1 mg/ml), nous avons enregistré des taux très faibles de l'absorbance qui ne dépasse pas 0.06. De même, nous n'avons pas noté des différences significatives après une heure d'incubation par rapport aux temps 0 min pour l'extrait hydrométhanolique et une augmentation significative ($p < 0.01$) d'absorbance (de 0.05) à 45min pour l'extrait aqueux en présence d'une concentration de 1mg/ml.

De même, à une concentration de 5 mg/ml, nous avons enregistré un effet hémolytique faible de l'extraits brut aqueux et hydrométhanolique, préparé par décoction, des *Berberis vulgaris*. Nous avons noté une augmentation significative ($p < 0.01$) d'absorbance (de 0.11) à

45min pour l'extrait hydrométhanolique et une augmentation très significative ($P<0.001$) à 30 min et 45 min (une absorbance de 0.15 et 0.18, respectivement) et une augmentation hautement significative ($P<0.0001$) à 60 min d'absorbance (de 0.16) pour l'extrait aqueux. Par rapport aux absorbances enregistré à 0 min. cette augmentation d'absorbance est aussi comparable par rapport au tube d'hémolyse total.

Pour l'extrait alcaloïdes totaux, à une concentration faible ($200\mu\text{g/ml}$), nous avons enregistré des taux très faibles de l'absorbance qui ne dépasse pas 0.03 De même, nous n'avons pas noté des différences significatives après une heure d'incubation par rapport aux temps 0min.

A une concentration de 1mg/ml , l'absorbance a arrivé jusqu'à 0.27 à 60 min, cette augmentation d'absorbance est significative par rapport au temps 0min.

Par contre, à une concentration de 5 mg/ml , nous avons enregistré un effet hémolytique remarquable de l'extrait brut alcaloïdes totaux, préparé par décoction, de *Berberis vulgaris*. Nous avons noté une augmentation hautement significative ($p<0.0001$) d'absorbance (de 1.04) à 15 min et une augmentation très significative ($P<0.001$) d'absorbance (de 0.92) à 45min et une augmentation significative ($P<0.01$) à 30min et 60min (une absorbance de 0.87 et 0.77, respectivement) . Cette augmentation d'absorbance est aussi comparable par rapport au tube d'hémolyse total.

La figure 09 présente les taux d'hémolyse, par pourcentage en fonction de temps dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C , en présence des différentes concentrations des l'extraits aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* ($200\mu\text{g/ml}$ 1mg/ml , et 5 mg/ml), préparé par décoction, par rapport au tube d'hémolyse totale contenant la suspension érythrocytaire dans un milieu hypotonique provoqué par l'eau distillé

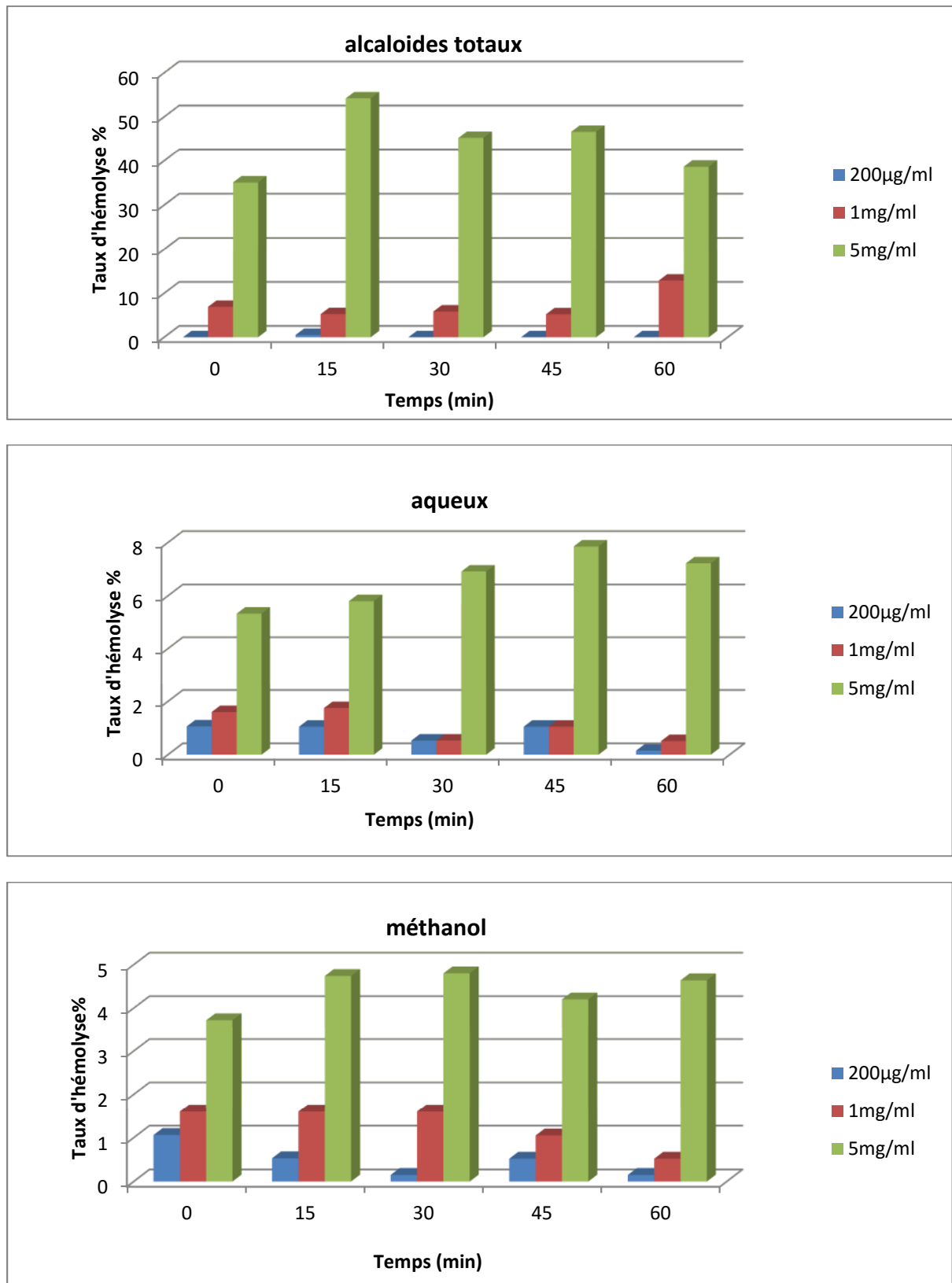


Figure 9: Evolution de taux d'hémolyse (%) en fonction de temps en présence des différentes concentrations d'extrait brut aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris*.

Les résultats relatifs aux taux d'hémolyse induit par les différentes concentrations de la fraction alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* allant de 0,2 à 5mg/ml vis-à-vis des globules rouges sont présentes sur la figure N°9

Les extraits alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* ont montré des niveaux d'activité hémolytique variant entre 12,88% à la concentration 1mg/ml au temps 60min et 54,21% à la concentration 5 mg/ml au temps 15 min, l'activité hémolytique à cette concentration diminue à 38,65 % à 60 min d'incubation. L'hémolyse maximale (54,21%) est obtenue avec l'extrait alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris* à la concentration 5 mg/ml. En revanche, aucune lyse de globule rouge n'est observée en présence de l'extrait alcaloïdes totaux à une concentration finale de 0,2mg/ml jusqu'à 60min.

En ce qui concerne l'effet de l'extrait aqueux de *Berberis vulgaris* sur la fuite de l'hémoglobine des globules rouge, les résultats sont présentés sur la figure N°9

Nous remarquons que cet extrait est plus moins toxique que l'extrait précédent. L'hémolyse maximale estimée à 7,85 % avec une concentration finale de 5mg/ml. En revanche, aucune lyse de globule rouge n'est observée en présence de l'extrait aqueux à une concentration finale équivalent à 0,2 et 1mg/ml.

Nous avons testé également la cytotoxicité de l'extraits hydrométhanolique, les résultats sont présente sur la figure N°9

L'extrait testé a montré une légère activité hémolytique avec des pourcentages inférieurs à 5%. Donc, ils sont d'une très faible toxicité, même à des concentrations élevées (5mg/ml) et après 1 heure de contact avec les érythrocytes humains.

La découverte de nouvelles molécules d'origine végétale reste capitale pour leur utilisation comme de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Les plantes médicinales sont employées comme des remèdes pour les maladies surtout les maladies chroniques, grâce aux composants de valeur thérapeutique qu'elles contiennent. Ces composés biochimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à détecter, extraire et doser certains principes actifs existants dans la plantes.

Des enquêtes ethnobotaniques récents effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales utilisées par la population dans l'Est et l'Ouest Algérien [Azzi et al., 2012 ; Allali et al., 2008 ; Hamza, 2011], soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétale dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement des différents maladies chroniques.

L'évaluation des activités biologiques des extraits naturels, nécessite une étude de l'activité hémolytique, afin d'évaluer les effets biologiques de *Berberis vulgaris*, nous avons procédé à des extractions des écorces de racine de la plante. L'extraction peut affecter la quantité et la composition en métabolites secondaires d'un extrait, de plus plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction : le mode et le temps d'extraction, la température, la nature du solvant et sa concentration ainsi que la polarité qui permet de solubiliser les composés de polarité similaire au solvant [Green, 2004 ; Ncube et al, 2008].

Nous avons opté pour une type d'extraction : sous reflux pendant 3h. Les solvants utilisés sont de polarité croissante : eau/méthanol (30 : 70) et eau. Cette différence de polarité permet d'extraire plusieurs métabolites secondaires de la plante [Green, 2004].

L'examen phytochimique réalisé sur les écorces de racines de *Berberis vulgaris* a révélé la présence des alcaloïdes, tanins, les composés réducteurs, les stérols et triterpènes en quantités importantes, et les saponosides, les coumarines, les terpénoïdes et les mucilages en quantités moins importante. Cependant, nous observons l'absence des flavonoïdes, des anthocyanines, des anthraquinones et des glycosides cardiaques dans les extraits.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapporter dans la littérature par les travaux de Mezouar, 2013, qui confirme la présence , des alcaloïdes, tanins, les composés réducteurs, les stérols et triterpènes en quantités importantes, et les saponosides, les coumarines, les terpénoïdes et des sucres réducteurs,

De même, Les résultats des études phytochimiques effectuées par Meliani et ses collaborateurs, qui ont détecté la présence des tanins, des alcaloïdes, des saponosides, des stérols et des anthraquinones dans les écorces de racines de *Berberis vulgaris* [Meliani et al, 2011].

L'étude quantitative de l'extrait aqueux et hydrométhanolique de *Berberis vulgaris* a pour objectif de déterminer la teneur en polyphénols totaux qui est de l'ordre de 10.48 mg GAE/g et des flavonoïdes 2.05 mg CEQ/g. Ces valeurs sont proches de ceux obtenues par Zovko Končić et collaborateurs, qui ont obtenus des concentrations de 7.29 mg GAE/g et 10.34 mg GAE/g en polyphénols totaux des régions de Skrad et Crni Lug – Croatie [Zovko Končić et al, 2010].

Ces teneurs restent bien inférieures à la quantité en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique 80 % des fruits de *Berberis vulgaris* avec une teneur de 280 mg GAE/g [Motalleb et al, 2005].

Nous remarquons aussi que la concentration des flavonoïdes est plus faible que celle des polyphénols totaux, ceci nous permet de penser que les tanins sont la famille la plus représentatif des polyphénols totaux.

D'après les résultats obtenus de l'examen phytochimique qualitatif et quantitatif, *Berberis vulgaris* est riche en alcaloïdes représenté par berberine, qui est connu pour ces différentes activités : antidiabétiques, anti inflammatoire, antitumorale et antimicrobienne [Ivanovska et Philipov, 1996 ; Tan et al, 2006 ; Kosalec et al, 2009 ; Yin et al, 2012].

Les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ce qui nous à mener d'étudier l'effet hémolytique, in vitro, de cette plante

Dans notre analyse biologique, Nous remarquons que le pourcentage d'effet hémolytique des extraits de plante augmente au cours du temps en fonction de la concentration.

L'hémolyse maximale (54,21%) est obtenue avec l'extrait alcaloïdes totaux à la concentration 5 mg/mL. Cet extrait à 5 mg/mL est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, l'extraits hydrométhanolique à une concentration de 5mg/mL présente un taux d'hémolyse de 4,8% , le pouvoir hémolytique ne dépasse pas 5 % d'hémolyse. Donc, La cytotoxicité pour cet extrait est mineure .

L'extrait aqueux (7.85%) à une concentration de 5mg/ml présente une activité hémolytique.

Donc, on peut classer l'effet hémolytique des différents extraits testés, à la concentration de 5 mg .ml⁻¹, après 60 min de contact avec les érythrocytes humain, comme suit : l'extrait des alcaloïdes totaux > l'extrait aqueux > l'extrait hydrométhanolique

Nos résultats sont en accord avec les conclusions de Rengasamy et al. (2013) et Zubair et al. (2013) où les extraits méthanoliques et aqueux, de plusieurs plantes étudiées, ont montré des effets hémolytiques faibles contre les érythrocytes humains.

Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme, l'intérêt des humains exige qu'une étude de sa toxicité soit étudiée.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à faire une étude phytochimique et à évaluer l'activité hémolytique des extraits de nos de plante vis-à-vis des globules rouges humains.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence différentes familles de composés chimiques dans la plante de *Berberis vulgaris* appartenant à la famille des Berberidacées.

A lumière des résultats obtenus dans notre étude, l'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des tanins, des stérols et des triterpènes et des composés réducteurs en quantités importantes. Cependant, il y a moins de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de mucilages dans les extraits.

L'analyse quantitative de l'extrait aqueux et hydrométhanolique sous reflux, est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une concentration de 10.48 mg GAE/g en polyphénols totaux et 2.05 mg CEQ/g en flavonoïdes.

Les tests d'hémolyse réalisée par la méthode spectrophotométrique on montré que les extraits des alcaloïdes totaux présentent un effet hémolytique élevé à 5 mg/ml, En revanche, les extraits aqueux et hydrométhanolique de *Berberis vulgaris* de concentration 5 mg/ml ont montré une activité hémolytique faible.

D'après les tests biologiques, réalisés *in vitro*, sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4), en présence des différentes concentrations des extraits des alcaloïdes totaux de *Berberis vulgaris*, nous avons constaté que cette plante est fortement toxique. Elle ne peut être une source dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies.

L'accomplissement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives.

Ce travail reste préliminaire et ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances responsables de la toxicité, il est intéressant d'approfondir cette étude par purification des molécules phytochimiques responsables de l'activité biologique et évaluer leurs effet toxique *in vivo*.

1. **Aguilar-Martinez . (2007) .** H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier- Nimes.
2. **Alain Damier. (2002)**. Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris.
3. **Aline oliveira da conceição. (2010)**. Effet d'extraits de plantes médicinales sur la différenciation cellulaire et le transport du calcium par les cellules syncytiotrophoblaste-like humaines. Thèse de doctorat de l'université du Québec à Montréal, 2 p.
4. **Allali H., Benmehdi H., Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N. (2008)**. Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. Asian J Chem ;20 (4): 2701–2710
5. **Anyinam C. (1995) .** Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. Social Science and Medicine; 4: 321-329.
6. **Arrif S. (2009)**. Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre Verbascum: V. ballii et V. dentifolium. Thèse de Doctorat en Sciences. Université El Hadj Lakhdar- Batna. Faculté des Sciences. Département de Chimie. 172 p.
7. **Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., Belkacem N.(2012)**. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. J Med Plants Res.; 6(10):2041–2050 .
8. **Badiaga M.(2011)**. Etude ethnobotaniques phytochimiques et activités biologiques de *Naculea latifolia smith*, une plante médicinale africaine récoltée au Mali .Thèse de Doctorat ,Mali :université de Bamako.
9. **BahorunT.(1997) .**Substances naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritius pp 83-94
10. **Belouad A. (1998)**. Plantes médicinales en Algérie. Office des publications nationale ; Algérie: 273.
11. **Bérubé-Gagnon J. (2006) .** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
12. **Bismuth C., Baud F., ;Fréjaville P.P., Garnier R. (1987)**. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, p 956.

13. **Brunetton J. (1999)** . Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 3^eéd. Tech & Doc – Lavoisier, France.
14. **Brunetton J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 5^{ème} édition La Voisier TEC et DOC, Paris. p.250-270.
15. **Brunetton J.(2009)**.Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4^eéd, Tec&Doc lavoisier. Paris.
16. **Catier O ., Roux D. (2007)**. Botanique ,pharmacognosie ,phytothérapie :Cahiers du préparateur en pharmacie . 3^{ème} ed .France : Wolters Kluwer .
17. **Chen H.Q., Jin Z.Y., WangX.J., Xu X.M., Deng L., Zhao J.W. (2008)**. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci Lett.* [Epub ahead of print]
18. **Chevallier A.(2001)** .Encyclopedia of Medicinal Plants. 2^{ème} éd. Londres : Larousse .
19. **Clément RP.(2005)**. Aux racine de la phytothérapie :entre tradition et modernité. *Phytothérapie 4* :171-175
20. **Cseke L. J., Kirakosyan A. et al., (2006)**. Natural Products From Plants; Ed2: CRC Press; p: 22- 25.
21. **Cuendet M. (1999)**. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* »(Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.
22. **Dacosta Y.(2003)**. Les phytonutriments bioactifs. (Ed)Paris.317p
23. **Diallo A-M.(2005)** .Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée).Thèse de Doctorat. Université de Bamako.125p
24. **Edeoga HO., Okwu DE., Mbaebie BO.(2005)**. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afric J Biotech.* 4 : 685 – 688.
25. **Elqaj M., Ahami A., et Belghyti D.(2007)**. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

26. **Fallah Huseini H., Zareei Mahmoudabady A., Ziai S. A., Mehrazma M., Alavian S. M., Kianbakht S, Mehdizadeh M. (2010).** The Effects of *Taraxacum officinale* L. and *Berberis vulgaris* L. root extracts on carbon tetrachloride induced liver toxicity in rats. *Journal of Medicinal Plants*. Vol. 9. (Suppl. 6): 45 – 52.
27. **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*. 64(2) : 159-164.
28. **Fiorucci S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 211p.
29. **Flesch F. (2005).** Intoxications d'origine végétale *Plant poisoning* F. Flesch (Praticien hospitalier) Centre antipoison, hôpitaux universitaires de Strasbourg
30. **Fourasté I. (2000).** Rappel de la toxicité de quelques plantes. *Revue Française des Laboratoires* ; Vol 2000, Issue 323. pp 51-55.
31. **Fukuda K., Hibiya Y., Mutoh M., Koshiji M., Akao S., Fujiwarw H. (1999).**Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J. Ethnopharmacol*, 2: 227-233.
32. **Garnero J. (1991).** les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques-encyclopédie des médecines naturelles.(paris, France), *Phytothérapie, Aromathérapie*, (1991), C-2,pp, 2-20.
33. **Ghedira K.(2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois phytothérapeutique, 4 : 162-169.
34. **Ghourri M., Zidane L., Douira A.(2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences* ; Vol. 17, ISSN 2071-7024.
35. **Gurib-Fakim A. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*; 27: 1–93.

36. **Green R.J.(2004).** Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues. [Masters Thesis]. USA : North Carolina State University.
37. **Hamza N.(2011).** Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse Doctorat en science alimentaire option : Nutrition. Univ. Mentouri Constantine, Institut de Nutrition de l'alimentation et des Technologies agroalimentaires : 32-61.
38. **Hanachi P et Golkho SH.(2009).** Using HPLC to Determination the Composition and Antioxidant Activity of Berberis Vulgaris. Eur J Sci Res. 29 (1) : 47 – 54.
39. **Huang WM., Wu Z.D and Gan YQ. (1989).** Effects of berberine on ischemic ventricular arrhythmia. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za, 5: 300-301.
40. **Igor Passi, L.B. (2002).** Etude des activités biologique de Fagara zanthoxyloïdes, lam (Rutaceae).Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.
41. **Ivanovska N et Philipov S.(1996).** Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. Int J Immunopharmac ; 18 (10) : 553 – 561.
42. **Kansole, M.M.R. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia opposita vahl et Orthosiphon pallidus royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
43. **Kaoubaia G., Ayachb N., Elhafidb N., Bennanib S., Elkhayatb G., Medkourib M., Zamdb K., Hachimb M., Benghanemb B., Ramdanib G. (2011).** Toxicité rénale secondaire à la prise de m'khinza. Néphrologie & Thérapeutique 7 ; 411-447.
44. **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O. (2004).** Identification of active parincipales of M.balsamina (Balsam apple) leaf extract. Medical Science. 4 : 179-182.

45. **Khan AM., Qureshi RA., Ullah F., Gilani SA., Nosheen A., Sahreen S., et al.(2011)** .Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J Med Plants Res.* 5 (25) : 6017 – 6023 .
46. **Khanbaba K., et Ree T.R. (2001)** . Tannins: classification and Definition. *Journal of royal society of chemistry*, 18:641-649.
47. **King A and Young G. (1999)** . Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.*Journal of the American dietetic association*, 99: 213-218.
48. **Kosalec I., Gregurek B., Kremer D., Zovko M., Sanković K., Karlović K.(2009)** . Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine – analysis and antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 25 : 145 – 150.
49. **Kupeli E., Kosar M., Yesilada E., Husnu K and Baser C. (2002)** . Comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci*, 72: 645-57.
50. **Larousse.(2008)** .www. Larousse.fr.
51. **Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y., Song K.Y., et Hong S.J. (2002)**. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 296: 1238-1 244.
52. **Lhuillier A.(2007)**.Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches :*Agauria salicifolia* Hook. F ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse, , spécialité : sciences des Agroressources, p 214.
53. **Mahmoudi Y.(1987)** . La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Blida, Edition ANES Palais du livre; 01: 105.
54. **Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R. (2003)** . Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranien Journal of pharmaceutical Research.*77-82.
55. **Makkar H., Siddhuraju P., Becker K.(2007)**. Plant secondary metabolites. New Jersey : Humana Press .

56. **Marc T., Gérard W., Denis L. (2001).** Classification es anti-inflammatoires, in : Guide de pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4^{ème} Ed. 426p.
57. **Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat de l'Universités de Limoges, pp. 24-42.
58. **Meliani N., Dib M.E.A, Allali H., Tabti B. (2011).** Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asi Pac J Trop Biomed.*; 468–471.
59. **Mezouar D. (2013).** Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris* ; Mémoire de Magister en Biologie Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien ; Université de Tlemcen.
60. **Motalleb G., Hanachi P., Kua SH., Fauziah, O., Asmah R.(2005).** Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. *J Biol Sci* ;5 : 648 – 653.
61. **Nafisi S., Bonsaii M., Maali P., Khalilzadeh MA., Manouchehri F.(2010).**Beta-carboline alkaloids bind DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100: 84-91.
62. **Ncube NS., Afolayan AJ., Okoh AI. (2008)** .Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin : current methods and future trends. *Afri J Biotech*; 7 (12) : 1797 – 1806.
63. **N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., Aké-Assi L.(2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sci Nat.* 6 (1) : 1 – 15.
64. **Nissen, S.E., Wolski, K., (2007).** Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes, *N. Engl. J. Med.* 356: 2457–2471.
65. **Oloyede O.I. (2005).**Chemical Profile of Unripe Pulp of carica papaya. *Pakistan Journal of nutrition.* 4 :379-381 .

66. **Ouedraogo y.,Nacouima.,Guisson i.p.,Guede guina f.j.,(2001)**. Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* (wilid).o.(rubiaceae).Pharm.med.tra.Alr. ; Vol 1, ppl 3-29.
67. **Patrick N SAS ., (2003)**.Intoxications par les végétaux : plantes baies. Éditions Scientifiques et Médicales.
68. **Pietta P.G. (2000.)**Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products.*, 63: 1035-1042.
69. **Quezel P et Santa S .(1962)**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. T 1. Paris : Centre national de la recherche scientifique.
70. **Reynaud J., Lussignol M. (2005)**. The flavonoids of *Lotus Corniculatus*. *Lotus Newsletter*, 35:75-82.
71. **Rengasamy R.R.K., Radjassegarin A., Palanisamy I., Thirunavukarasu T., Perumal A.(2013)**. In vitro antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrasses from the Gulf of Mannar, South India. *Food Chemistry*, 136(3-4): 1484 -1489.
72. **Roberts M.F.,Wink M.(1998)**. *Alcaloids :Biochemistry ,Ecology ,and Medicinal Applications* .New York :phenum press .
73. **Saeed Arayne M., Sultana N., Bahadur SS.(2007)**.The *Berberis* story : *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pak J Pharm Sci.* 20 (1) : 83 - 92.
74. **Saied S. et begum S.(2004)**.Phytochemical studies of *Berberis vulgaris* L. *Chemistry of Natural compounds.* 40 : 137-140.
75. **Schauenberg P. et Paris F.(2010)** . *Guide des plantes médicinales*. Ed. Delachaux et Niestlé.
76. **Soulaymani A. (2010)**. Intoxication par *Atractylis gummifera* L. Données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc. *Springer*; 46(3):144-6.
77. **Stockigt,J.,Sheludk,Y.,Unger,M.,Gerasimenko,I.,Warzecha ,H .,Stockigt,D.(2002)**. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic .*chromatograph A*,vol.267,n°1,pp.85-113 .

78. **Takase H., Yamamoto K., Ito K. and Yumioka E. (1993).** Pharmacological studies on antidiarrheal effects of berberine and geranin herb. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2: 101-112.
79. **Tan YL., Goh D., Ong ES.(2006).** Investigation of differentially expressed proteins due to the inhibitory effects of berberine in human liver cancer cell line HepG2. *Mol Biosyst* ; 2 : 250 – 8.
80. **Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B. G., Mathé G.(2002).**Polyphenol: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*, 56: 200-207.
81. **Tron I., Piquet O., Baert A., Mouton C. (2002).** *Toxon Manuel de Toxicologie. Guide technique.* ADEME, Angers; 128p.
82. **Vermerris W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).
83. **Vermerris W., Nicholson R.(2006).** Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht : Springer .
84. **ViaIa A., Botta A. (2007).**Toxicologie, 2ème édition, Lavoisier; pp 03-10.
85. **Vitor RF., Mota-Filipe H., Teixeira G.(2004).** Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury . *J Ethnopharmacol* 93 (2-3): 363-70.
86. **Wikipédia. (2012).** L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>.
87. **Yin J., Ye J., Ji W.(2012).** Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Phar Sinica B* ; 2 (4) : 327 – 334.
88. **Zakaria I., Ahmat N., Jaafar FM., Widyawaruyanti A. (2012).** Flavonoids with antiplasmodial and cytotoxic activities of *Macaranga triloba*. *Fitoterapia* 83:968-972.
89. **Zenk ,M .H.,juenger,M.(2007).**Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds .*phytochemistry*,vol.68 ,n°(22-24)PP.2757-2772.
90. **Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W.(1999.,2007).**The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*

- 64 : 555 – 559. In : Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation. *Food Chem Toxicol.* 45 : 2402 – 2411.
91. **Zovko Končić M., Kremer D., Karlović K., Kosalec I. (2010).** Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris*L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food and Chemical Toxicology.* 48 : 2176–2180.
92. **Zubair M., Bibi Za., Rizwan K., Rasool N., Zahoor AF., Riaz M.(2013).** In Vitro Antimicrobial and Haemolytic Studies of *Bambusa arundinaceae* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 3(4): 111 -115.

Annexe 1 : Réactifs et réactions de caractérisation des tests phytochimiques

- ✚ Réactif de Wagner : Dans 75 ml d'eau distillée dissoudre 2g d'iodure de potassium KI et 1.27g diiode I₂, le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

- ✚ Réactif de Mayer : Dissoudre 1.358 g de chlorure de mercure HgCl₂ dans 60 ml d'eau distillée puis 5g d'iodure de potassium KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- ✚ Alcool chlorhydrique : Mélange à volumes égaux d'alcool à 95° et d'acide chlorhydrique concentré.

- ✚ Liqueur de Fehling :

 - ✓ Fehling A : dissoudre 3.5 g de sulfate de cuivre pentahydraté CuSO₄.5H₂O dans 50 ml d'eau distillée.
 - ✓ Fehling B : dissoudre 6.5 g d'ammoniaque NH₄OH, 17.3 g de tartrate de sodium et de potassium dans 35 ml d'eau distillé puis compléter le volume à 50 ml.

Les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

Annexe 2 : Rendements obtenus avec les différents solvants**Tableau 2**: Rendements obtenus pour les extraits bruts sous reflux de *Berberis vulgaris*

Extraits	Sous reflux		
	Aqueux	Hydrométhanolique	Alcaloïdes totaux
Rendements %	14.91	16.2	6.7

Annexe 3 : Résultats de l'activité hémolytique

Tableau3:Densités optiques et l'écarte type obtenues pour l'extrait aqueux, hydrométhanolique et alcaloïdes totaux respectivement de *Berberis vulgaris*.

Temps(min)	PBS+susp	HT	200µg/ml	1mg/ml	5mg/ml
0	0.01±0	1.89±0.02	0.03±0.012	0.04±0	0.11±0
15	0.01±0.006	1.91±0.02	0.03±0	0.04±0.006	0.12±0.02
30	0.02±0.006	1.9±0.01	0.03±0.006	0.03±0.006	0.15±0.006
45	0.03±0.046	1.94±0.017	0.05±0.017	0.05±0.006	0.18±0.01
60	0.02±0.015	1.96±0.05	0.023±0.006	0.03±0.01	0.16±0

Temps	PBS+susp	HT	200µg/ml	1mg/ml	5mg/ml
0	0.01±0	1.89±0.02	0.03±0.012	0.04±0.017	0.08±0.01
15	0.01±0.006	1.91±0.02	0.02±0.006	0.04±0.017	0.1±0.044
30	0.02±0.006	1.9±0.01	0.023±0.006	0.05±0.017	0.11±0.021
45	0.03±0.046	1.94±0.017	0.04±0.012	0.05±0.023	0.11±0.006
60	0.02±0.015	1.96±0.05	0.023±0.012	0.03±0	0.11±0.017

Temps	PBS+susp	HT	200µg/ml	1mg/ml	5mg/ml
0	0.01±0	1.89±0.02	0.01±0.01	0.14±0.03	0.67±0.03
15	0.01±0.006	1.91±0.02	0.02±0.007	0.11±0.006	1.04±0.04
30	0.02±0.006	1.9±0.01	0.02±0.007	0.13±0.006	0.87±0.064
45	0.03±0.046	1.94±0.017	0.01±0.006	0.13±0.015	0.92±0.021
60	0.02±0.015	1.96±0.05	0.02±0.007	0.27±0.015	0.77±0.021

Tableau 4 : Effet hémolytique des extraits eau/MeOH sous reflux

	0	15	30	45	60
200µg/ml	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03
	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01
DO MOY	0,03	0,02	0,023	0,04	0,023
Ecart type	0,012	0,006	0,006	0,012	0,012
Student	0,03	0,67	0,67	0,35	0,74
TH%	1,06	0,53	0,15	0,52	0,15
1mg/ml	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03
	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03
	0,06	0,06	0,07	0,08	
DO MOY	0,04	0,04	0,05	0,05	0,03
Ecart type	0,017	0,017	0,017	0,023	0
Student	0,04	1	0,52	0,46	0,49
TH%	1,6	1,6	1,6	1,05	0,52
5mg/ml	0,07	0,07	0,09	0,11	0,1
	0,08	0,08	0,1	0,11	0,1
	0,09	0,15	0,13	0,12	0,13
DO MOY	0,08	0,1	0,11	0,11	0,11
Ecart type	0,01	0,044	0,021	0,006	0,017
Student	0,08	0,48	0,12	0,007	0,060
TH%	3,72	4,74	4,8	4,2	4,64

Tableau 5 : Effet hémolytique des alcaloïdes totaux

	0	15	30	45	60
200µg/ml	0			0,02	
	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
DO MOY	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02
Ecart type	0,01	0,007	0,007	0,006	0,007
Student	0,01	0,6	0,6	0,64	0,6
TH%	0	0,53	0	0	0
1mg/ml	0,15	0,12	0,12	0,12	0,27
	0,11	0,11	0,13	0,13	0,26
	0,17	0,11	0,13	0,15	0,29
DO MOY	0,14	0,11	0,13	0,13	0,27
Ecart type	0,031	0,006	0,006	0,015	0,015
Student	0,14	0,17	0,40	0,64	0,0027
TH%	6,91	5,26	5,85	5,23	12,88
5mg/ml	0,69	1,08	0,94		0,78
	0,64	1,01	0,82	0,9	0,75
	0,67	1,03	0,84	0,93	0,79
DO MOY	0,67	1,04	0,87	0,92	0,77
Ecart type	0,025	0,036	0,064	0,021	0,021
Student	0,67	0,0001	0,007	0,001	0,0048
TH%	35,1	54,21	45,21	46,59	38,65

Tableau 6: Effet hémolytique des extraits aqueux sous reflux

	0	15	30	45	60
200µg/ml	0,02	0,03	0,03	0,07	0,02
	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03
	0,04	0,03	0,02	0,04	0,02
DO MOY	0,03	0,03	0,03	0,05	0,023
Ecart type	0,011	0	0,006	0,017	0,006
Student	0,03	0,64	1	0,12	0,67
TH%	1,06	1,05	0,53	1,05	0,15
1mg/ml	0,04	0,04	0,03	0,05	0,02
	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04
	0,04	0,05	0,03	0,05	0,03
DO MOY	0,04	0,04	0,03	0,05	0,03
Ecart type	0	0,006	0,006	0,006	0,01
Student	0,04	0,37	0,12	0,01	0,16
TH%	1,6	1,75	0,53	1,05	0,51
5mg/ml	0,11	0,14	0,14	0,18	0,16
	0,11	0,13	0,15	0,19	0,16
	0,11	0,1	0,15	0,17	0,16
DO MOY	0,11	0,12	0,15	0,18	0,16
Ecart type	0	0,021	0,006	0,01	0
Student	0,11	0,33	0,00038	0,00026	0,0001
TH%	5,31	5,8	6,91	7,85	7,22

Tableau 7: Densités optiques obtenues pour un témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée.

	0	15	30	45	60
PBS	0,01	0,01	0,02	0	0,04
	0,01	0,01	0,01	0,08	0,01
	0,01	0,02	0,02	0	0,02
DO MOY	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
Ecart type	0	0,006	0,006	0,05	0,015
Eau distillée	1,9	1,89	1,91	1,95	1,9
	1,9	1,93	1,9	1,92	2
	1,86	1,92	1,89	1,95	1,97
DO MOY	1,89	1,91	1,9	1,94	1,96
Ecart type	0,023	0,021	0,01	0,017	0,051