



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

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR-KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT : Biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et l'effet
hémolytique de deux plantes
Marrubium vulgare Asso. et *Artemisia campestris* L.**

Présenté par :

MELIKI wissem

MELIKI oulfa

Soutenu le : 24/05/2016

Jury de soutenance :

Président	:Mr Zeraib Azzeddine	(M.C.B)Univ.abbès Laghrour-Khenchela
Encadreur	:M ^{me} Douaouya Lilia	(M.A.A)Univ.abbès Laghrour-Khenchela
Examineur	:M ^{me} Bouhalit Samira	(M.A.A)Univ.abbès Laghrour-Khenchela

Promotion: mai 2016

Le travail à été réalisé au laboratoire de biochimie Université Abbès Laghrour-Khenchela

Dédicace

Notre famille a été pour nous le principal moteur, chacun à sa manière de près ou de loin a su nous insuffler l'énergie nécessaire. A nos chers parents pour la qualité de l'éducation qu'ils nous ont conférée et les vertus qu'ils ont cherché à développer en nous. Nous leur exprimons ici tout notre affection, tout notre amour et toute notre gratitude pour nous avoir encouragées et soutenues tout au long de nos études, et aujourd'hui encore. Qu'ils voient en ce travail l'aboutissement de leurs efforts. Ce mémoire leur est dédié à 200%.

Je remercie également toute ma famille, qui ne cesse de s'agrandir et qui a contribué de près ou de loin à ce que nous sommes devenues. A ma grande sœur Asma, Docteur en Médecine à l'Université de Franche-Comté (France) et mon beau-frère Sofiane, Professeur des Universités à l'Ecole Nationale Supérieure de Mécanique et de Microtechnique à Besançon (France), à mon neveu et nièce Louai et Lina, pour tous les moments de bonheur qu'ils nous apportent. Qu'ils soient assurés de la fierté que nous éprouvons de les compter dans notre famille. Nous remercions chaleureusement ma chère sœur Imene Docteur en littératures arabes à l'Université Hadj Lakhdar Batna et mon beau-frère Maître Marouane Avocat à Khenchela et ses petits Micha la belle et le Cher à notre cœur Chahine.

A mon frère Hamza qui m'a précédé dans l'exercice de la profession. Pour ses nombreux conseils, son écoute, sa générosité, sa sympathie et tous les moments inoubliables que nous avons passés ensemble. A ma petite sœur Rakia, merci pour ta serviabilité, ta générosité, d'être là quand nous avons besoin de toi. Ce travail n'aurait pas été possible sans ton soutien et ton aide morale.

A tous mes proches et amis, particulièrement Meriem Zrari, Fadia, Meriem Gharbi, Fatima, Salima, Halima, Wafa, Mokhtar, Inijih, Saad, Karim , et tous la promo de la biochimie pour les instants de joie partagés en leur compagnie, leur gentillesse et tous les sentiments qu'ils nous témoignent. Qu'ils soient assurés de toute notre reconnaissance et de notre amitié la plus sincère

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et nous remercions tous ceux et celles qui nous connaissent et qui nous permettent de nous sentir exister...

Merci à toutes et à tous

Les sœurs Meliki

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le Tout-Puissant, pour avoir guidé nos pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront notre devise.

Nous exprimons notre plus sincère reconnaissance et notre profonde gratitude à Madame Douaouya Lilia, responsable de l'option Biochimie au sein du Département de Biologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela. Madame Douaouya fut pour nous une Directrice attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance nous ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de notre travail de chercheur.

Nous tenons à remercier très vivement Monsieur Zerriab Azdine, Professeur à l'Université Abbes Laghrour Khenchela, qui nous honore en acceptant de présider le jury de notre mémoire. Ses critiques constructives, ses précieux conseils, sans oublier ses orientations, ses suggestions et ses encouragements nous ont été d'une grande utilité.

Nos remerciements s'adressent aussi à Madame Bouhalit Samira, enseignante au Département de Biologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela, de nous avoir accordée le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire. Tout l'honneur lui en revient.

Un grand merci à Monsieur Abaidia Abdelghafour, Professeur au Département de Biologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela pour toutes les heures qu'il a consacrées à la relecture du document final, pour ses multiples conseils et pour son soutien affectif sans faille. Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous remercions sincèrement Madame Merabti Rima, Doctorante au sein du Département de Biologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela pour son aide précieuse et pour son encouragement infailible, et sa compétence dans le domaine, vraiment Merci

Nous tenons à remercier chaleureusement Madame Chorfi Rafika, pour l'accueil qu'elle nous a réservé et pour l'ambiance de travail très agréable qu'elle a su créer au sein du Laboratoire grâce à sa très grande ouverture d'esprit.

Ces remerciements seraient incomplets si nous ne nous adressons pas à l'ensemble des Membres de l'équipe de laboratoire de la biologie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela pour leur soutien logistique et moral ainsi que pour la très bonne ambiance que nous avons toujours trouvée au sein de notre département. Nous remercions plus particulièrement Baara Hanane, Samia, Saida, Souade et plus particulièrement Abdennour pour l'aide qu'ils nous ont donné et les efforts déployés pour faciliter notre travail.

Les sœurs Meliki

Table des matières

Le titre	La page
Dédicace	i
Remerciements	ii
Résumé	ix
Liste des tableaux	iix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xii
Table des matières	xiii
Introduction	1
PARTIE01: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 01 : La phytothérapie	
I. La phytothérapie	4
II. Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques	4
III.1. Les métabolites primaires	4
III.2. Les métabolites secondaires	5
III.2.1. Polyphénols	5
III.2.1.4. Flavonoïdes	8
III.2.1.5. Les tanins	10
III.2.1.6. Les Coumarines	11
III.2.2. Les terpènes et stéroïdes	11
III.2.3. Alcaloïdes	12
Chapitre II. Botanique et systématique des plantes médicinales	
<i>Artemisia campestris</i>	
I.1. Généralités	13
I.2. Description botanique	13
I.3. Systématique de la plante	14
I.4. Origine et distribution	14
I.5. Composition chimique	14
I.6. utilisation traditionnelle	15
<i>Marrubium vulgare</i>	
II.1. Généralités	16
II.2. Description botanique	16
II.3. La systématique	17
II.4. Localisation et répartition	17
II.5. Composition chimique	18
II.6. Utilisation traditionnelle	18
II.6. Toxicité	19
Chapitre III. L'hémolyse	
I. Généralités	21
II. Différents éléments du sang	21
III. Fonctions du sang	21
IV. L'hémolyse	22
V. Le globule rouge	22
VI. Les signes biologiques de l'hémolyse	23
VII. Les signes cliniques	23
VIII. Les types d'hémolyse	24

PARTIE02 : Partie expérimentale	
CHAPITRE IV :Materiel et Méthodes	
OBJECTIF	27
I. MARERIEL	27
I.1.1. Matériel végétal	27
I.1.2. Récolte des plantes	27
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations	27
II.LES METHODES	28
II.1.Extraction et préparation des extraits	28
II.1.1. rendement de l'extraction	30
II.2. Screening chimique des plantes	30
II.2.1. Recherche des tanins	30
II.2.2. Recherche des saponosides	30
II.2.3. Recherche des flavonoïdes	30
II.2.4. Recherche des coumarines	31
II.2.5. Recherche des composés réducteurs	31
II.2.6. Recherche des alcaloïdes	31
II.3. Etude qualitative	
II.3.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)	31
II.3.2. Protocole de CCM sur gel de silice	31
II.4. Etude quantitative	
II.4.1 Dosage des polyphénols	32
II.4.1.1. Principe	32
II.4.1.2. Expression des résultats	33
II.5.2.Dosage des flavonoïdes	33
II.5.2.1.Principe	33
II.5.2.2.Expression des résultats	33
III. Etude de l'évolution hémolytique	
III.1. Préparation du PBS (phosphate buffered saline) à pH=7,4±0,02	33
III .2. Préparation de la suspension érythrocytaire	33
III.3. Préparation des extraits	34
III.4. L'effet hémolytique	34
IV. Etude statistique	35
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION	
I . Détermination du rendement d'extraction	38
II. Résultats du criblage phytochimique	39
III. Résultats de l'analyse qualitative	41
III. Résultat de l'étude qualitative chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques des plantes <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia Campestris</i>	41
1) Composés identifiés chez <i>Marrubium vulgare</i>	42
2) Composés identifiés chez <i>Artemisia Campestris</i>	45
IV.Résultats de l'analyse quantitative	48
IV.1. Dosage des polyphénols totaux	48
IV.2. Dosage des flavonoïdes	49
V.Résultats de l'évolution hémolytique	52
V.1 l'effet hémolytique	52

Conclusion	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
ANNEXES	75

Liste des tableaux

Tableau1. Structure des squelettes des polyphénols.....	Page 07
Tableau2. Le rendement des extraits méthanoliques du <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia campestris</i>	Page 38
Tableau3. Résultats des tests phytochimiques d'extraits méthanoliques des parties aériennes du <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia campestris</i>	Page 40
Tableau4. CCM de l'extrait hydroalcoolique de <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : BAW	Page 42
Tableau5. CCM de l'extrait hydroalcoolique de <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H ₂ O.....	Page 42
Tableau6. CCM de l'extrait hydroalcoolique de <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : Acétone, H ₂ O.....	Page 43
Tableau7. CCM de l'extrait hydroalcoolique d' <i>Artemisia Campestris</i> Système solvant : BAW :Butanol, Acideacétique, H ₂ O	Page 45
Tableau8. CCM de l'extrait hydroalcoolique d' <i>Artemisia Campestris</i> Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H ₂ O.....	Page 46
Tableau9. CCM de l'extrait hydroalcoolique d' <i>Artemisia Campestris</i> Système solvant : Acétone, H ₂ O.....	Page 46

Liste des figures

Figure 1. Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie.....	Page 05
Figure 2. Squelette de base des flavonoïdes.....	Page 08
Figure 3. Vue générale de la plante d' <i>Artemisia campestris</i> prise à partir du site d'étude.....	Page 13
Figure 4. Vue générale de la plante de <i>Marrubium vulgare</i> prise à partir du site d'étude.....	Page 16
Figure 5. Les globules rouges.....	Page 23
Figure 7. photo de rota vapeur.....	Page 28
Figure 8. protocole d'extraction des métabolites secondaires.....	Page 29
Figure 9. Photos du chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanoliques du <i>Marrubium vulgare</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à UV), 365 nm.....	Page 44
Figure 10. photos de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanoliques d' <i>Artemisia Campestris</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à UV), 365 nm.....	Page 47
Figure 11. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).....	Page 48
Figure 12. Histogramme représente teneur en polyphénol de la plante <i>Marrubium vulgare et Artemisia campestris</i>	Page 49
Figure 13. Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).....	Page 50
Figure 14. Histogramme représente la teneur en flavonoïde de la plante <i>Marrubium vulgare et Artemisia campestris</i>	Page 50
Figure 15. Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et celle en polyphénols de la plante <i>Marrubium vulgare</i>	Page 51
Figure 16. Corrélation entre de la teneur en flavonoïdes et celle en polyphénols de la plante <i>Artemisia campestris</i>	Page 52
Figure 17. L'évolution de l'effet hémolytique d' <i>A. campestris</i>	Page 53
Figure 18. L'évolution de l'effet de <i>M. vulgare</i>	Page 53
Figure 19. Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne d' <i>A. campestris</i>	Page 54
Figure 20. Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de <i>M. vulgare</i>	Page 55

Figure21. Evolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations des deux plantes étudiées.....Page 56

Liste des abréviations

- °C : degré celsius
- *A. Campestris* : *Artemisia campestris*
- AlCl₃ : Le chlorure d'aluminium
- AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate
- BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O
- Ca⁺⁺ : calcium
- CCM : La chromatographie sur couche mince
- CG-MS : Gas chromatography-mass spectrometry
- CHCl₃ : chloroform
- Cm : centimètre
- CO₂ : dioxyde de carbone
- FeCl₃ : chlorure de fer
- G6P : glucose-6-phosphate
- GR : globule rouge
- Hb : Hémoglobine
- HT : Hémostase total
- I₂ : Le diiode
- KH₂PO₄ : Potassium dihydrogen phosphate
- KI : iodure de potassium

- LDH : lactates déshydrogénases
- *M. vulgare* : *Marrubium vulgare*
- ml : millilitre
- Mm : millimètre
- Na⁺ : Le sodium
- Na₂CO₃ : Carbonate de sodium
- Na₂SO₃ : Le sulfite de sodium
- NaCl : Le chlorure de sodium
- NaOH : hydroxyde de sodium
- NH₄OH : Ammoniaque

- **nm** : Le nanomètre
- **O₂** : oxygène
- **p.m** : picomètre
- **PBS** : phosphate buffered saline
- **Pp** : Poids de la poudre en gramme (g)
- **Ps** : Poids de l'extrait sec en gramme (g)
- **SD** : standard deviation
- **UV** : Ultra Violet
- **μg EAG/mg** : microgramme d'équivalents d'acide gallique par gramme
- **μg EAG/mg** : microgramme d'équivalents d'acide quercétine par gramme

Résumé

Ce travail porte sur l'étude des tests phytochimiques et l'étude d'effet hémolytique d'extraits de deux plantes utilisées traditionnellement par la population de l'Est algérien pour traiter plusieurs maladies, ces plantes sont *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*.

Le criblage phytochimique réalisé sur les extraits méthanoliques de la partie aérienne de ces deux plantes ont révélées leurs richesses en tanins, en flavonoïdes et en composées réducteurs et la présence des alcaloïdes, des saponines, et des coumarines qui sont marquées négativement chez *Artemisia campestris*.

L'étude quantitative des extraits bruts de deux plantes a révélé que l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de $405,606 \pm 31,179 \mu\text{g/ml}$ et $3,972 \pm 0,927 \mu\text{g/ml}$ d'extrait par rapport à l'extrait de *Marrubium vulgare* on trouve des valeurs de $208,102 \pm 20,299 \mu\text{g/ml}$ et $3,046 \pm 0,457 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM des extraits a montré la présence d'une multitude de variété des flavonoïdes comme : flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidine 3- glycosides,...etc.

La recherche d'effet hémolytique a été effectuée pour différentes concentrations des deux plantes dans une suspension érythrocytaire préparée à partir du sang humain incubé à 37 °C dans un milieu tampon PBS à pH 7,4.

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait d'*Artemisia campestris* présente un effet hémolytique très moindre par rapport aux extraits de *Marrubium vulgare*, avec un taux d'hémolyse comparé à l'hémolyse total égal à 8 % et 38 % pour *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement.

Mots clés : *Artemisia campestris*, cytotoxicité, effet hémolytique, *Marrubium vulgare*, polyphénols.

ABSTRACT

This work deals with the study of phytochemical tests and hemolytic effect study of extracts from two plants traditionally used by the population in eastern Algeria to treat many diseases, these plants are *Artemisia campestris* and *Marrubium vulgare*.

The phytochemical examination performed on methanol extracts of the aerial part of these plants have proven their wealth in tannins, flavonoids and reducing compounds and the presence of alkaloids, saponins and coumarin which are marked negatively in *Artemisia campestris*.

The quantitative study of the crude extracts from two plants found that the methanol extract of *Artemisia campestris* is richer in polyphenols and flavonoids with values 405.606 ± 31.179 mg / mL and $3.972 \pm 0,927\mu\text{g} / \text{ml}$ of extract compared to the extract of *Marrubium vulgare* there are values of $208.102 \pm 20,299\mu\text{g} / \text{ml}$ and $3.046 \pm 0,457\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively.

Qualitatively, the analysis by TLC extracts showed the presence of a multitude of various flavonoids as: flavonols, flavones, isoflavones, Flavanones, anthocyanidin 3-glycosides, ... etc.

Mark hemolytic effect was carried out for different concentrations of the two plants in a red cell suspension prepared from human blood incubated at 37 °C in PBS buffer medium at pH 7.4.

The results showed that the extract of *Artemisia campestris* has a hemolytic effect very less compared with extract of *Marrubium vulgare*, with a rate of hemolysis compared to the total hemolysis equal to 8%, 38% of *Artemisia campestris* and *Marrubium vulgare* respectively

Keywords: *Artemisia campestris*, cytotoxicity, hemolytic effect, *Marrubium vulgare*, polyphenols.

المخلص

الهدف من عملنا هذا هو محاولة دراسة الاختبارات الفيتوكيميائية و دراسة التأثير الانحلالي الدموي للمستخلصات النباتية المستعملة قديما من طرف سكان الشرق الجزائري لمعالجة الكثير من الأمراض هاتين النباتيتين هما التاقوفت و تامريوث.

الفحص الفيتوكيميائي على المستخلص الميثانول للجزء الهوائي للنباتتين و الذي اثبت وجود التينينات و الفلافونويدات و المكونات الارجاعية و الالكالويدات و الكومارينات . . . و هذا الاخير ظهر سلبا في التاقوفت.

الدراسة الكمية للمستخلصات الخامة للنباتتين اثبتت ان المستخلص الميثانولي للتاقوفت غني جدا بمتعدد الفينول و الفلافونويدات مع القيم $31,179 \pm 405,606$ ميكروغرام / مل و $0,927 \pm 3,972$ ميكروغرام / مل من المستخلص مقارنة مع مستخرج تامريوث الذي سجل القيم $102,208 \pm 20,299$ ميكروغرام / مل و $0,457 \pm 3,046$ ميكروغرام / مل على التوالي.

واثبتت الدراسة المنجزة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وجود عدد كبير من فلافونويدات مثل : فلافونول ، فلافون ، ايزو فلافون ، فلافون ضد سيانيددين 3 ، و الغليكوزيدات ..

في بحث التأثير الانحلالي المنجز بمختلف التراكيز للنباتتين في مرشح الكريات الحمراء المستحضرة من دم الانسان محضونة في درجة حرارة 37 ° في وسط عازل PBS بدرجة حموضة 7,4 .

النتائج المتحصل عليها ، تشير الى ان المرشح النباتي للتاقوفت يملك تأثير انحلاي دموي قليل جدا مقارنة بالمرشح النباتي لنبته تامريوث بمعدل الانحلال المقارن بالمعدل الكلي مساوي للقيمة 8% و 38% التفتت و تامريوث على التوالي .

الكلمات المفتاحية: التاقوفت ، التأثير النحلالي الدموي ، السمومية، الفلافونويدات , تامريوث.

***I*ntroduction**

« Les plantes semblent avoir été semées avec profusion sur la terre, comme les étoiles dans le ciel, pour inviter l'homme par l'attrait du plaisir et de la curiosité à l'étude de la nature »

JEAN-JACQUES ROUSSEAU

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (1), De plus, sur les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (2).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus Thérapeutiques, car elles contiennent des principes qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie (3).

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. Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes à travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales (4).

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, jusqu'à il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la

Photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires (5).

Les remèdes traditionnels utilisés sont, souvent, un mélange des plantes dont la connaissance et les impératifs de préparation, de dosage et de consommation ne sont pas bien maîtrisés. Ainsi les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité (6).

Il est obligé d'identifier les composés chimiques présents dans ces plantes et de déterminer la dose précise lors de l'utilisation, puisque les plantes qui ont le pouvoir de vie, peuvent aussi avoir un pouvoir de mort.

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dans cet objectif et elle a porté sur :

- Une étude phytochimique qui a permis d'identifier et quantifier certains groupes chimiques bioactifs contenus dans les extraits méthanoliques des plantes étudiées : *Marrubium vulgare*, et *Artemisia campestris*.
- Une étude de la cytotoxicité, *in vitro*, basé sur l'effet hémolytique de différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, et *Artemisia campestris* préparé par macération.

***P*artie 1 : Synthèse bibliographique**

I. La phytothérapie

La phytothérapie, du grec phyton qui veut dire plante therapeia qui signifie traitement, étudier l'utilisation des plantes médicinales en médecine (7).

La phytothérapie, selon **Bruneton (4)**, est le traitement par les plantes ; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection de molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante. Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi.

Aussi une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés, cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (8).

II. Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires : (9)

II.1. Les métabolites primaires

Les plantes utilisent l'énergie du rayonnement solaire, le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère, l'eau et les éléments inorganiques du sol qu'elles absorbent par les racines (eau, éléments inorganiques) et par les feuilles (Dioxyde de carbone).

Le processus de base est la photosynthèse qui fixe le carbone contenu dans le dioxyde de carbone atmosphérique, en le combinant aux atomes d'hydrogène contenus dans les molécules d'eau. Les premiers produits formés par la photosynthèse sont des hydrates de carbones, de faible masse moléculaire (oses). C'est à partir de ces oses (ou sucres) que sont ensuite formés tous les métabolites primaires nécessaires à la survie de la plante : glucides complexes (polymères comme la cellulose, l'amidon ou les pectines), acides aminés (constitutifs des protéines), acides gras (constitutifs des lipides), etc. (10).

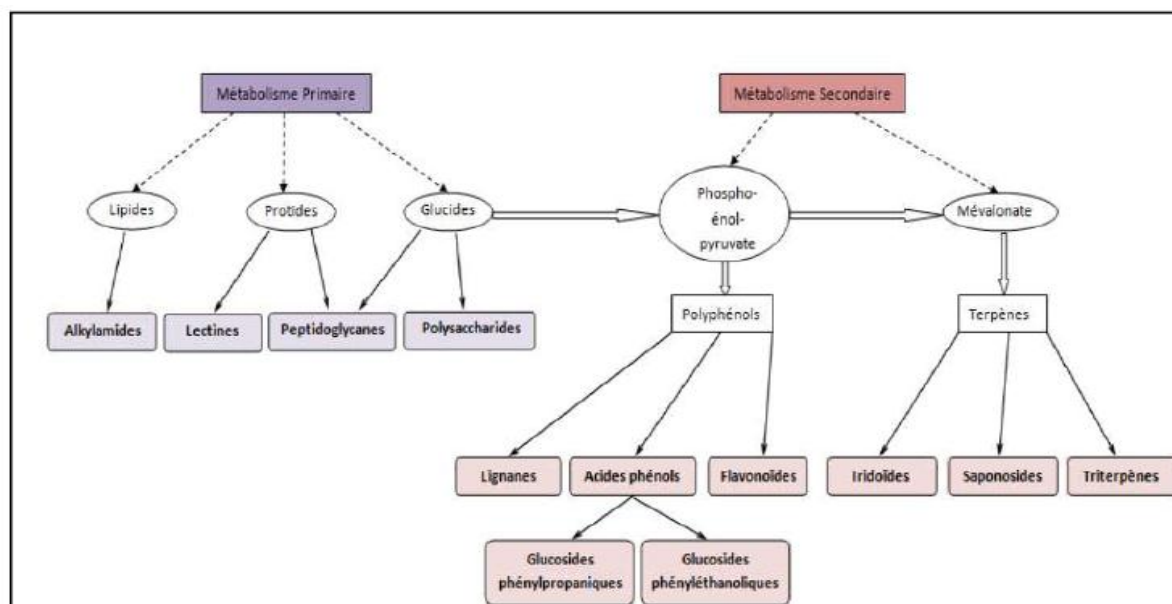


Figure 1 : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires (4).

III.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (11,12).

III.2.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (4 ; 13).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (13). Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (14). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (15).


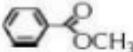

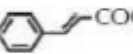
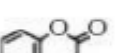
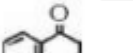
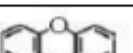
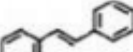
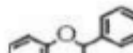
III.2.1.1. Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (**Figure 1**). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignines et coumarines (**16**).

III.2.1.2. Classe des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 1**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (17).

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de Base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide Coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

III.2.1.3. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (18).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (19), anti-allergènes, vasodilatateurs (20) et antioxydants (21). Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine.

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, isoflavandiol, flavanols, flavonols, auronés, chalcones, anthocyanins (30).

III.2.1.4.2. Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (31). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (32).

III.2.1.4.3. Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... (32).

Selon Grotewold (33) Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles (34). Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique). Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments (certaines flavones et flavonols) (32 ; 34). Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge (34 ;35) . Les flavones, auronés et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes (32 ; 33). Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et les oiseaux, qui jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion assurant ainsi la reproduction de l'espèce (33 ; 36). Les flavonoïdes, dissous dans les vacuoles à l'état d'hétérosides, s'accumulent dans les cellules épidermiques, assurant la protection des tissus contre les rayonnements solaires nocifs. (33 ; 37 ; 38). On prête à certains flavonoïdes (phytoalexines), un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes (38).

II.2.1.5. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (39).

II.2.1.5.1. Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées (40). Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (41).

III.2.1.5.2. Structure chimique et classification

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes :

III.2.1.5.2.1 Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques (32).

- Tanins galliques (Gallo tanins) : Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.
- Tanins ellagiques (Ellagitanins) : Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (39).

III.2.1.5.2.2. Tanins condensés

Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (41). Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (39).

III.2.1.5.2.2.1. Tanins condensés (proanthocyanidines)

Ce sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités (40). Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone C4-C8 ou C4-C dans le type B des pro-anthocyanidines ; ou par une liaison interflavanique double (C4-C68 ou C4-C6) et (C2-O-C) dans le type A (32 ; 42).

III.2.1.6. Les Coumarines

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique.

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants. En lumière ultra-violette, les CCM présentent des tâches dont la coloration varie du bleu au pourpre en passant par le jaune. Les coumarines sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées.

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Elles est aussi utilisée dans les produits cosmétiques (43).

III.2.2. Les terpènes et stéroïdes

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principal de formule $(C_5H_8)_n$ selon la variation de nombre n, dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes,...(44).

Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (45).

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique (45).

Chez toutes les plantes on trouve ces composés liées avec un groupement alcool qu'ils nommés les stérols ; prenant une forme plane, glycosylée, analogues du cholestérol qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale comme : B-Sitostérol, Stigmastérol (45).

III.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (46). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (47). Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (48). De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, sont extraite de la belladone mortellement toxique (*Atropa belladonna*) et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique. Les alcaloïdes sont utilisés comme anti cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (49).

III.2.3.1. Nature et présence des alcaloïdes

La source principale des alcaloïdes était auparavant les plantes florales mais plusieurs composés de cette famille ont été récemment extraient des règnes animaux à savoir les insectes et les poissons. Malgré cet avancement, les alcaloïdes floraux restent les plus importantes par rapport aux restes (50 ; 51). En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante. Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles. Cette même concentration se diffère selon la période de récolte.

Signalons que la présence des alcaloïdes dans une partie de la plantes ne prouve en aucun cas sa naissance dans ce milieu. La présence des alcaloïdes est généralement associée à un acide organique ou à une autre entité avec un pourcentage variant entre 1 et 3 % du poids sec de la plante. Dans des cas très particuliers, notamment dans les quinquinas, ils dépassent les 10 % (52 ; 53).

Le rôle des alcaloïdes dans la plante reste encore moins clair. Probablement ils sont considérés comme une réserve d'azote en cas de son manque dans le sol.

Les plantes étudiées ont été choisies en fonction de leurs emplois très fréquents en Algérie.

I. *Artemisia campestris*

I.1. Généralités

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des *Astéracées* : c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille ; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (54). Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinique, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (55).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (56).

I.2. Description botanique

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (57, 58, 59).



Figure 3 : Vue générale de la plante d'*Artemisia campestris* prise à partir du site d'étude.

I.3. Systématique de la plante (60)

Règne : *Plantae*.

Sous règne : *Tracheobionta*.

Embranchement : *Spermatophyta*.

Sous embranchement : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous classe : *Asteridae*.

Ordre : *Asterales*.

Famille : *Asteraceae*.

Sous famille : *Asteroideae*.

Tribu : *Anthemideae*.

Sous Tribu : *Artemisiinae*

Genre : *Artemisia*.

Espèce : *Artemisia campestris* L.

I.4. Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya (61), dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud.

I.5. Composition chimique

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (62 ; 63).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (32), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (64).

Plusieurs études (63 ; 65) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), (63) ont identifié dans une espèce de *Camargue* (Marseille,

France) 51 composés sont caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, methyleugenol, p-cymène et β -pinène.

d'après (65) , les constituants les plus abondants d'une espèce de *Tunisie* sont : β -pinène (24,2-27,9 %), p-cymène (17.4–22.3%) et α -pinène (4.1–11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques.

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apéginie), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (66).

Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines (67).

I.6. utilisation traditionnelle

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies.

En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (68). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (69).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (70).

Selon Valant (71), la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. Campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

II. *Marrubium vulgare*

II.1. Généralités

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des *lamiacées*, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie (72)

Le genre *Marrubium* comporte quelque 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasien et quelques pays d'Amérique Latine (73).

II.2. Description botanique

Le *Marrube vulgare* synonyme : *Marrubium album* est une plante, d'aspect blanchâtre à odeur forte et désagréable, de 30 à 80cm de hauteur. Ses fleurs blanches, relativement petites, apparaissent du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre, et parfois encore en hiver. Les feuilles ont toutes un pétiole (74).

Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure (75).

Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre qui irrite les organes du gout et de l'odorat) et amère (76).



Figure 4 : Vue générale de la plante de *Marrubium vulgare* prise à partir du site d'étude.

II.3. La systématique (77)**Règne :** *Plantes***Sous règne :** *Tracheobiontes***Embranchement :** *Spermatophytes***Division :** *Magnoliophytes***Classe :** *Magnolipsides***Sous classe :** *Asteridae***Ordre :** *Lamiales***Famille :** *Lamiaceae***Genre :** *Marrubium***Espèce :** *Marrubium vulgare***Nom binomial :** *Marrubium vulgare***Nom vernaculaire algérien :** *Meriwet***Français :** *Marrube blanc*

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth (75), Merrîwt au Maroc (78), Marroubia en Tunisie (79). En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. le Marrube est composé de deux mots hébreux : mar, rob, suc amer (80).

II.4. Localisation et répartition

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud (76).

Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande (81).

Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne (80).

Répondues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine (73, 82).

II.5. Composition chimique

La partie aérienne du *marrube blanc* contient plusieurs métabolites secondaires tels que les di-terpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques du *Marrubium vulgare* (83), les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) (84), ainsi que plusieurs phenylpropanoïdes esters tels que les verbascosides (85).

On y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactones : marrubiine principalement et son précurseur pré uranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol. Il y a également des Hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique. En outre il y a des tanins spécifiques des *Lamiacées* et dérivés de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, lomonène) (86).

II.6. Utilisation traditionnelle

Marrubium vulgare est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie (87). Elle est également employée comme antinocicepti (88), antihypertenseur (89), antispasmodique (90), antioedematogénique (91), analgésique (82), insecticide (92), antiinflammatoire (93), antimicrobien (73, 94, 95), antioxydant (96), antifongique (97), antileucémique (98) et dans de nombreuses autres activités biologiques.

Le marrube blanc est une prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de l'acoqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique (78).

Le Marrubium vulgare est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie (99).

II.7. Toxicité

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être tolérée s'il y a une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (76).

I. Généralités

L'hématologie est la branche de la médecine qui étudie le sang et ses maladies (ou hémopathies). Elle étudie plus particulièrement les cellules sanguines dont l'origine est hématopoïétique (synthèse de ces cellules dans la moelle osseuse) et qui ont un rôle pour l'oxygénation, l'immunité et la coagulation, et étudie également certaines molécules plasmatiques que sont les facteurs de coagulation (100).

II. Différents éléments du sang

Si le sang se compose de plasma et de cellules en suspension, les examens biologiques sont réalisés:

III-1/ Sur du sang total: plasma et éléments figurés (globules rouges, blancs et plaquettes);

III-2/Sur le plasma: partie liquide du sang recueilli sur anticoagulant et obtenue après séparation des éléments figurés par centrifugation;

III-3/Sur du sérum: obtenus après coagulation.

Le sang est divisé en 4 groupes :

III-A : Electrolytes: Ca^{++} qui permet le maintien de la pression osmotique et l'équilibre acido-basique.

III-B : Protéines: Albumine qui permet la viscosité du sang, rôle de tampon; maintien de la pression oncotique, du volume sanguin ... etc. Transport des divers éléments, anticorps, facteurs de la coagulation.

III-C : Substances azotées: Urée, acide urique et créatinine qui sont des déchets du métabolisme.

III-D : Nutriments: Glucose, lipides et cholestérol sont des substances métaboliques (101).

III. Fonctions du sang

C'est le transport des produits finaux du métabolisme jusqu'aux organes de l'excrétion (106). Il assure les échanges gazeux (O_2 et CO_2) grâce au pigment respiratoire (hémoglobine)

contenue dans les hématies. Il transporte les éléments nutritifs du système digestif aux cellules, et les hormones vers le lieu de leur fonction (102).

IV. L'hémolyse

D'après Aguilar_Martinez (103), l'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges (érythrocytes ou hématies) sont détruits et libèrent leur contenu hémoglobinique dans le plasma. Et quand leur durée de vie est de moins de 100 jours, plutôt que de 120 jours, qui est un laps de temps normal. Une anémie va apparaître si la moelle ne réussit pas à compenser (104).

L'hémolyse peut être causée par des facteurs extrinsèques tels une réponse anormale du système immunitaire, la formation de caillots dans les petits vaisseaux sanguins, certaines infections et les effets secondaires de certains médicaments (céphalosporines, antiinflammatoires non stéroïdes, la pénicilline et ses dérivés, phenazopyridine, quinidine, lévofloxacine) (105).

La destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges, en fin de vie, y sont détruits et éliminés (106).

V. Le globule rouge

Les globules rouges (GR) sont des cellules matures de la lignée érythrocytaire, à la forme d'une lentille biconcave. Son diamètre est de 7 p.m. La forme particulière du GR 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 GR est de 120 jours (103).

Selon Braham (107), l'hématie est une cellule anucléée qui comprend donc seulement une membrane et un cytoplasme, à l'état normal tous les GR ont sensiblement même forme, même diamètre, même coloration et toute modification de ses critères traduit un phénomène pathologique.



Figure 5 : les globules rouges (105).

VI. Les signes biologiques de l'hémolyse

Selon Guitton (108), La destruction prématurée des GR (hémolyse) induit par :

- Une augmentation de la bilirubine libre ou indirecte ou non conjuguée (catabolisme de l'hémoglobine).
- Un effondrement de haptoglobine.
- Une augmentation des LDH (permet de quantifier le degré d'hémolyse intravasculaire).
- Une augmentation des réticulocytes (souvent $> 150\ 000/\text{mm}^3$).
- Hémoglobinurie, hémosidérinurie : uniquement dans les hémolyses intravasculaires.

VII. Les signes cliniques

- La pâleur, Asthénie, Dyspnée (essoufflement), Vertiges, Céphalées, Tachycardie, ictère, fièvre)
- Arthralgies (douleurs dans les articulations).
- Douleurs dans l'abdomen.
- Hypotension artérielle.

- Vomissements, diarrhée.
- Urines rouges (bon signe sous anesthésie générale).

Etat de choc (déficit de fonctionnement de certains organes) en cas d'hémolyse importante s'accompagnant d'une anurie (absence d'urine), ou d'une diminution de la quantité des urines (109).

VIII. Les types d'hémolyse

VIII.1. Hémolyse intratissulaire

Les GR âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système des phagocytes mononucléés. Chez le sujet normal, la majorité des GR sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie. Cette phagocytose porte sur des GR dont le vieillissement s'est traduit par:

- Des modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs.
- Des modifications morphologiques (tendance à la sphérocité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation).
- Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des GR entraînant une stagnation dans les capillaires (103).

Ce type d'hémolyse se caractérise par :

- Hyperbilirubinémie non conjuguée (>17mmol/L).
- Libération d'Hb.
- Chute de l'haptoglobine modérée.
- Les (GR) vieillissent disparaissent du torrent circulatoire par un mécanisme intratissulaire de (85%) (110).

VIII.2. Hémolyse intravasculaire

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine. Dans ce cas, l'Hb est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau du

quel l'Hb est dégradée. La taille du complexe haptoglobine-Hb ne lui permet pas de traverser le glomérule rénal (**103**).

Ce type d'hémolyse se caractérise par :

- Chute de l'haptoglobine et hémoglobinémie et hémoglobinurie.
- Élévation des LDH.
- Élévation inconstante de la bilirubine non conjuguée.

VIII.3. Hémolyse pathologique

Elle peut être due à deux principaux mécanismes :

- Soit une anomalie du GR : hémolyses corpusculaires ou globulaires c'est-à-dire la

Destruction des hématies provenant de sa fragilité et qui correspond à :

-Une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine exemple: anomalie de structure (hémoglobinopathies), anomalie quantitative de la synthèse des chaînes de globine (thalassémies), Drépanocytose (en faucille) caractérisée par la présence d'Hb.

-Une anomalie constitutionnelle de la membrane du GR : Micro-sphérocytose (augmentation de la perméabilité au Na⁺ et à l'eau).

-Déficit enzymatique du GR exemple : déficit en G6P, déficit en pyruvate kinase : défaut de régénération de l'ATP.

- Soit à une agression extrinsèque des hématies : hémolyses extra corpusculaires (**103**)
C'est-à-dire extérieur à l'hématie et qui caractérise par :

- Agression directe de l'hématie par une toxine bactérienne, animale, chimique ou par un parasite.

- Rigidité anormale acquise de la membrane du globule rouge : anémies hémolytiques auto-immunes.

- Rupture des hématies normales sur un obstacle : prothèses valvulaires, (microangiopathie thrombotique) (**110**).

***Partie2* : Matériel et méthodes.**

Objectif

Notre travail expérimental ayant pour objet l'investigation phytochimique et l'étude de l'effet hémolytique de l'extrait méthanolique brut de deux plantes médicinales *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*. L'étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie, Université Abbés Laghrour - Khenchela.

I. Matériel

I.1. 1. Matériel végétal

Il est constitué des feuilles et tige de *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*, récoltées au cours du mois de novembre 2015 de la région de KHENCHELA (BAGHAI), l'identification de ces espèces a été effectuée par les herboristes de la région (mokhtar ganis).

I.1.2. Récolte des plantes

Les parties aériennes des deux plantes *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* ont été nettoyées, après leur récolte sont conservées à l'ombre dans un endroit sec et aéré, après leurs séchages, la partie concernée a été broyée pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des extraits.

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits:

Folin-Ciocalteu FeCl_3 , acide sulfurique (H_2SO_4), HCl , acide acétique, NaOH , NH_4OH , KI , I_2 , Na_2CO_3 , Toluène, acide formique, méthanol, KH_2PO_4 , Acide gallique, NaCl , Na_2SO_3 , AlCl_3 , acide orthophosphorique, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, Acétone, Plaque CCM.

Parmi l'appareillage utilisé : Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV (VILBER COURMAT), Bain Marie (MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec Ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), vortex (VELP) et Balance (OHAUS), pH mètre

II. Méthodes

II.1.Extraction et préparation des extraits

L'extrait méthanolique des parties aériennes des deux plantes *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* été préparés selon la méthode de Tadeg H (111).

Ces parties aériennes broyées sont mises à macérer dans un mélange méthanol/eau (7:3 V/V). L'extrait hydro-alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation (**figure 7**) sous pression réduite dans un rotavapeur à une température de 60°C. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant.

L'extrait obtenu a été conservé à +5°C jusqu'à son utilisation (**figure 8**).



Figure 7 : photo de rotavapeur (Meliki, 2016).

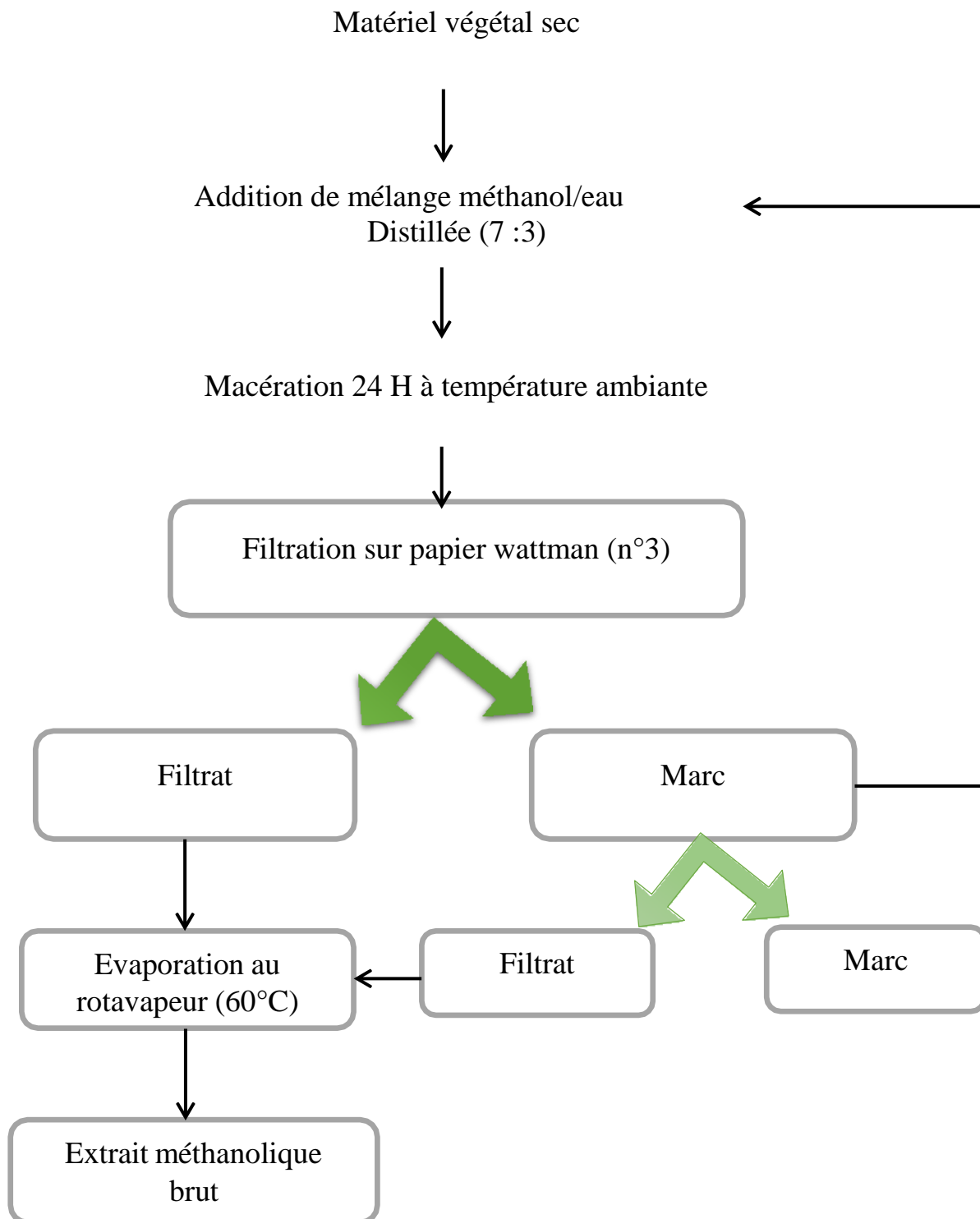


Figure 8: Protocole d'extraction (111).

II.1.1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extrait est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante sèche. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{P_p}{P_s} \times 100$$

Où : P_s : Poids de l'extrait Brute en gramme (g)

P_p : Poids de la poudre en gramme (g).

II.2. Screening phytochimique des plantes

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques.

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique.

II.2.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%, sont ajoutées à 2 ml de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes et le test est considéré positif s'il y a l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (112).

II.2.2. Recherche des saponosides

- Test 1 : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (112).
- Test 2 : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques (113).

II.2.3. Recherche des flavonoïdes

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (114).

II.2.4. Recherche des coumarines

Les résidus secs sont dissous dans l'eau distillée par chauffage, après refroidissement, la solution obtenue est répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 05 ml de NH_4OH 10% dans le 2eme tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines (**115 ; 116**).

II.2.5. Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmée par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (**117**).

II.2. 6. Recherche des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels 5 ml d'HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffé dans un bain marie. Après la filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (**118**).

II.3. Etude qualitative

II.3.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM):

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité, vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures (**119**).

II.3.2. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 20/20 Cm.

- L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette (2 μl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque.

- les plaques sont placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur. dans les quelles se trouve 3 systèmes de migration appelés phase mobile constitué de :

BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 : 1 : 5).

Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5).

Acétone, H₂O (1 : 1).

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par une révélation physique sous lampe UV à 365 nm.

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant / la distance parcourue par le solvant. Les rapports frontaux des spots sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits (120).

II.4. Etude quantitative

II.4.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode citée par Wong (119).

II.4.1.1. Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif Folin) dans une solution alcaline (120).

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité et température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

II.4.1.2. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200ug /ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (ug EAG /mg).

II.5.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) cité par Djeridane (121) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

II.5.2.1. Principe :

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol).Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

II.5.2.2. Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été fait en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 μ g/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ gEQ/mg).

III. Évolution de l'effet hémolytique

Les tests d'activité hémolytique des extraits hydroalcoolique des parties aériennes des deux plantes *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* ont été réalisés in vitro sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le tampon phosphate buffered saline (PBS).

III.1. Préparation du PBS (phosphate buffered saline) à pH=7,4 \pm 0,02

Nous avons préparé 1 litre d'une solution tampon phosphate salé (PBS) par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na_2HPO_4 (8mM), KH_2PO_4 (2mM) (122).

III.2. Préparation de la suspension érythrocytaire

- Le sang est prélevé dans un tube héparine à partir d'un donneur sain

- Le sang est centrifugé à 2400 tour / minute durant 10 min
- Le plasma (surnageant) est éliminé et le culot est lavé 2 fois par du PBS
- Le culot, ainsi obtenu, est resolubilisé à nouveau par le même volume de plasma éliminé par le PBS
- La suspension érythrocytaire, ainsi obtenue, est diluée 20 fois par PBS.

III.3. Préparation des extraits

Les différentes concentrations d'extraits hydroalcoolique sont préparées dans du PBS. Les concentrations initiales préparées sont (50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et 200mg/ml).

III.4. L'effet hémolytique

Le test d'effet hémolytique des deux plantes étudié est réalisé selon les méthodes décrit par Guo-Xiang (123).

- Mettre dans des tubes à hémolyse 2970 μ l de la suspension érythrocytaire préparé avec 30 μ l de l'extrait à différentes concentrations initiales (50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et 200mg/ml).
- Incuber les tubes dans l'étuve à 37 °C durant 45min.
- Prélever 500 μ l chaque 15 min.
- Ajouter 1, 5 ml de PBS.
- Mélanger les tubes délicatement.
- Arrêter la réaction avec un bain glaçon.
- Centrifuger les tubes à 2000 tour par minute durant 5 min.
- Lire l'absorbance de chaque tube à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 500 μ l de suspension érythrocytaire et 1500 μ l de solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, **préparer un tube D'hémolyse totale** qui contient 250 μ l de la suspension érythrocytaire et 4750 μ l d'eau distillée, en absence d'extrait. Assurer le maximum d'hémolyse à l'aide d'un vortex.

Suivre les mêmes conditions (temps d'incubation, température et pH) et les mêmes démarches expérimentales.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à L'hémolyse totale, après 45 min d'incubation, selon la formule suivant:

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{DO (extrait 45 min)} - \text{DO (témoin négatif 45 min)}}{\text{DO (hémolyse totale 45 min)}} \times 100$$

IV. Etude statistique

Chaque expérience est répétée trois fois et les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écartype.

Partie 3 : Résultats et discussion

I. Détermination du rendement d'extraction :

L'extrait a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* et d'*Artemisia campestris* en utilisant la méthode de macération, les résultats sont représentés dans le Tableau 1.

Tableau 2. Le rendement des extraits méthanoliques du *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
<i>Marrubium vulgare</i>	86 ,002	15 ,11	17,57 %
<i>Artemisia campestris</i>	150	21,98	14,65 %

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des rendements d'extraction des parties aériennes de *Marrubium vulgare* et d'*Artemisia campestris* qui sont 17,57 % et 14,65 % respectivement.

Les extraits méthanoliques (MeOH) issus des plantes (*Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*), présentent une couleur verte très foncée et un aspect collant.

Pour l'extrait de *Marrubium vulgare*, un rendement de 39,2% de l'extrait brut a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par (124). C'est un pourcentage nettement supérieur à celui obtenu dans notre cas (17,57 %). Ceci pourrait être dû à la technique utilisée (extraction par soxhlet) et sous une température de 70 °C, ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération.

L'analyse d'*Artemisia campestris*, a été réalisée sur la matière sèche de la plante (partie aérienne) et les tissus testés, était similaire à celle de l'espèce *Artemisia* dans des études antérieures (125, 126, 127) , un rendement de 17,80% a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par Talbi (128); ceci pourrait être dû à l'utilisation du soxhlet et la durée de l'extraction (48 heures) et la quantité de matériel végétal broyé utilisé.

Dans notre étude, l'extraction est réalisée à froid par simple macération (129) qui est une méthode discontinue dont le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (130) ; donc il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif; il varie en fonction de la

localisation géographique de l'espèce végétale, le degré de maturité, la génétique, le climat, la période de récolte l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et des apolarité. **(131)** Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites.

II. Résultats du criblage phytochimique

II.1. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés qui existent dans les parties aériennes du *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*, par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 3 : Résultats des tests phytochimiques d'extraits méthanoliques des parties aériennes du *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*

Les tests phytochimiques			Extraits(MeOH) méthanoliques de la parties aérienne	
Métabolites secondaires	Réactifs	Observation	<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Artemisia campestris</i>
Tanins	FeCl ₃	Coloration bleu-noire et un précipité.	+	+
Saponosides	Test de la mousse	Formation d'une mousse	+	+
	Chloroforme et acide sulfurique concentré	Couleur rouge-marronne de la couche d'interface	+	+
Flavonoïdes	AlCl ₃	Couleurjaune	+	+
Coumarines	NH ₄ OH 10%	Fluorescence UV bleu ouverte	+	-
Composés réducteurs	Acide sulfurique d'acide acétique FeCl ₃	Formation de 2 phases:brun e rouge et bleu-verte	+	+
Alcaloïdes	Wagner	precipitation	+	+

Positif : +, Négatif : -

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, composés réducteurs et coumarines) au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée.

La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette.

L'étude phytochimique d'extrait méthanolique de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* a montré que cette plante contient: des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, des composés réducteurs, des alcaloïdes sels et des coumarines.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de (132), qui confirme la présence des tanins et les travaux de (133), qui ont en plus des tanins, des alcaloïdes, les coumarines et des sucres réducteurs, ont révélé la présence des flavonoïdes et saponines.

De même, Les résultats des études phytochimiques effectuées par Ashkennazy (134) sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les di terpènes et les tris terpènes. Ils confirment aussi l'existence des tanins.

En ce qui concerne l'étude phytochimique de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a montré que cette plante contient: des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, des composés réducteurs et des alcaloïdes sels. Par contre, le test des coumarines est marqué négatif. Ces résultats sont en accord avec des nombreuses études phytochimiques de cette espèce (62 ; 65 ; 135), qui ont révélé la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanins, les huiles essentielles; ce qui confère à cette plante de nombreuses propriétés biologiques (62).

Dans ce même contexte plusieurs criblages phytochimiques ont montré la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes, une petite quantité de saponines et des tanins, et aucune coumarine (136).

III. Résultat de l'étude qualitative chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia Campestris*

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation (110).

La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des extraits méthanolique des parties aériennes des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*, l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf's et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur la plaque en utilisant plusieurs systèmes d'élution de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à la longueur d'onde 365nm, dont elle révèle les taches fluorescentes et visible et les tableaux 4-5-6-7-8-9 résumant les résultats du CCM.

1) Composés identifiés chez *Marrubium vulgare***Tableau 4:** CCM de l'extrait hydroalcoolique de *Marrubium vulgare*Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : pourpre sombre	0.43	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Spot2 : mauve	0.49	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu blanc fluorescent	0.56	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol
Spot4 : rouge	0.86	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : rouge	0.92	Anthocyanidine 3-glycosides

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5)) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des Anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 5: CCM de l'extrait hydroalcoolique de *Marrubium vulgare*Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : Violet	0.22	Anthocyanidine 3-glycosides

Un seul spot a été ségrégué des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5)) appartenant à la classe des anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 6: CCM de l'extrait hydroalcoolique de *Marrubium vulgare*Système solvant : Acétone, H₂O (1 :1)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.36	Acide phénol
Spot2 : rouge vif	0.44	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : rouge vif	0.54	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot4 : mauve	0.90	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : rose pale	0.94	Anthocyanidine 3,5-diglycosides

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Acétone, H₂O (1 :1) appartenant aux différentes classes des anthocyanidine 3-glycosides et d'acide phénol.

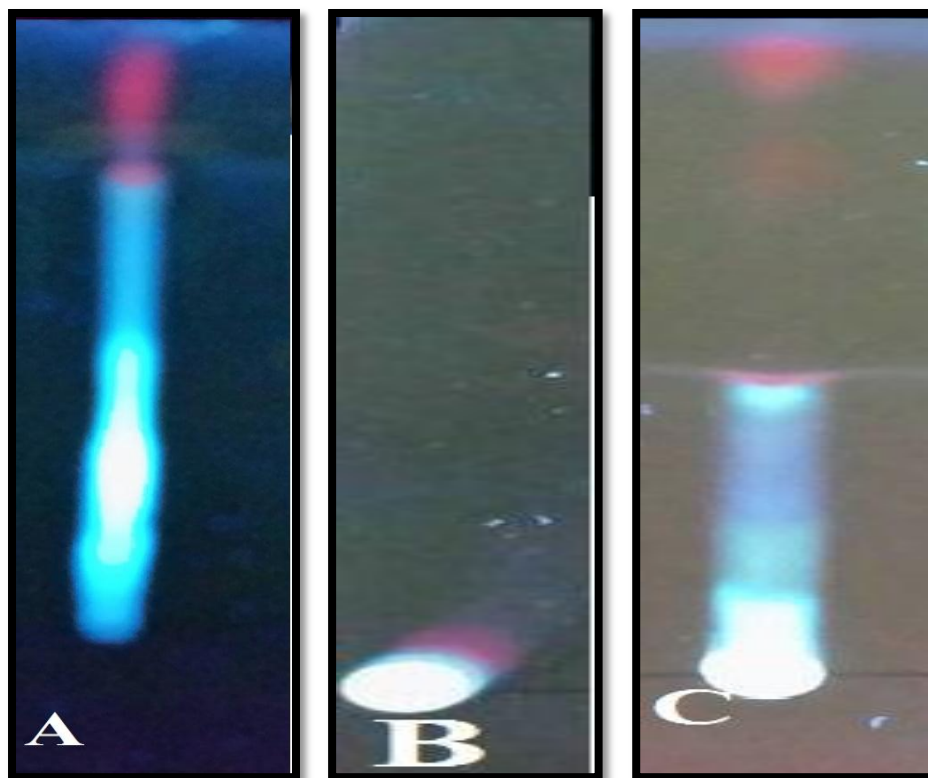


Figure9 : Photos du chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* par chromatographie sur gel silice (révélation à UV), 365 nm par les systèmes solvants: (A): BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5), (B): Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) et (C): Acétone, H₂O (1 :1)

Après une simple comparaison entre les trois systèmes, il apparaît clair et évident que la tache mauve (violet), qui correspond aux anthocyanidines 3-glycosides est commune.

D'après les résultats de ces tableaux (4-5-6), le système qui a donné la meilleure séparation est celui de (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5) par ce qu'il a permis la séparation de 05 taches ce qui explique la solubilité différentielle des composés flavonoïques dans ce système.

2) Composés identifiés chez *Artemisia Campestris***Tableau 7** : CCM de l'extrait hydroalcoolique d'*Artemisia Campestris*Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu blanc fluorescent	0.56	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot2 : bleu blanc fluorescent	0.65	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot3 : pourpre sombre	0.69	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Spot4 : bleu blanc fluorescent	0.77	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot5 : mauve	0.82	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot6 : rouge	0.86	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot7 : rouge	0.92	Anthocyanidine 3-glycosides

Sept spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonols, flavonones, isoflavone et flavanones.

Tableau 8 : CCM de l'extrait hydroalcoolique d'*Artemisia Campestris*Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.05	Acide phénol
Spot2 : mauve	0.11	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu	0.14	Flavonols, Acide phénol
Spot4 : mauve	0.17	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : violet	0.55	Flavones
Spot6 : bleu	0.65	Acide phénol
Spot7 : mauve	0.77	Anthocyanidine 3-glycosides

Sept spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) appartenant aux classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des acides phénols, et anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 9 : CCM de l'extrait hydroalcoolique d'*Artemisia Campestris*Système solvant : Acétone, H₂O (1 :1)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.36	Acide phénol
Spot2 : rose	0.53	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu	0.77	

Spot4 : jaune	0.84	Flavonols
Spot5 : bleu	0.98	Acide phénol

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Acétone, H₂O (1 :1) appartenant aux différentes classes des anthocyanidine 3-glycosides et de acide phénol et des flavonols.

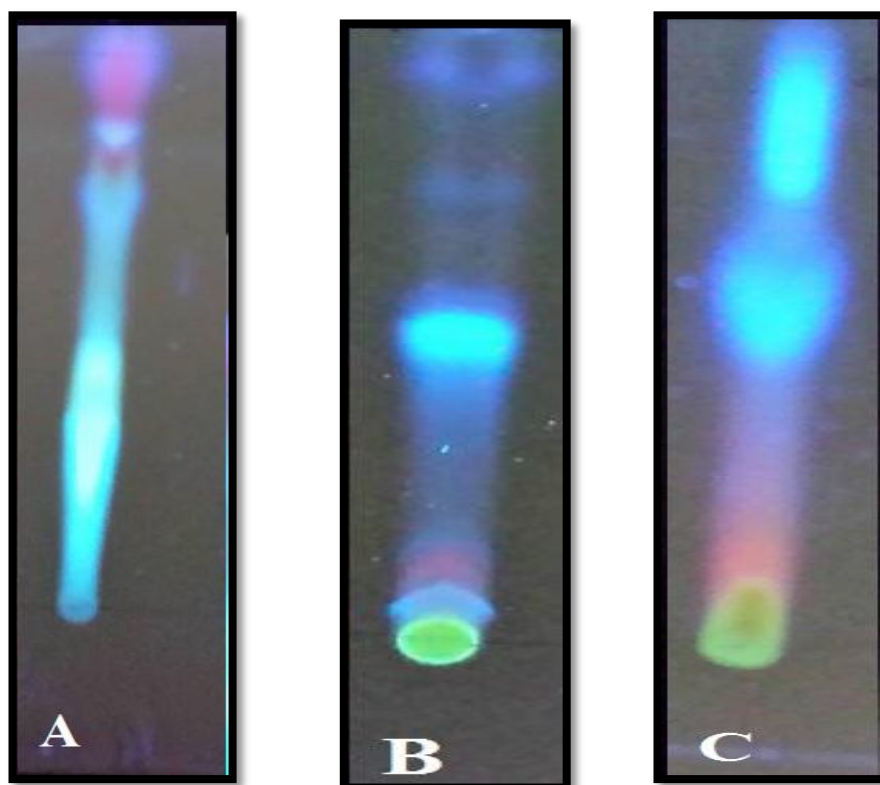


Figure 10 : photos de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique d'*Artemisia Campestris* par chromatographie sur gel silice (révélation à UV), 365 nm par les systèmes solvants : (A): BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5), (B): Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) et (C): Acétone, H₂O (1 :1)

D'après les résultats des tableaux (7-8-9), le système qui a donné la meilleure séparation est celui de BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5) par ce qu'il a permis la séparation de 07 taches de différentes classes mieux que le deuxième système chloroforme, méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) celui qui sépare à son tour 07 taches moins intéressantes que le premier, ce qui explique la solubilité différentielle des composés flavonoïques dans ce système.

Après l'analyse des résultats obtenus, la CCM confirme la présence et la richesse des plantes en flavonoïdes déjà mis en évidence préalablement par des tests phytochimiques. La bonne séparation apparaît dans les systèmes polaires prouve que les flavonoïdes existants sont de nature beaucoup plus polaire.

IV.2. Résultats de l'analyse quantitative

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différents concentration.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait). (**Figure 11**)

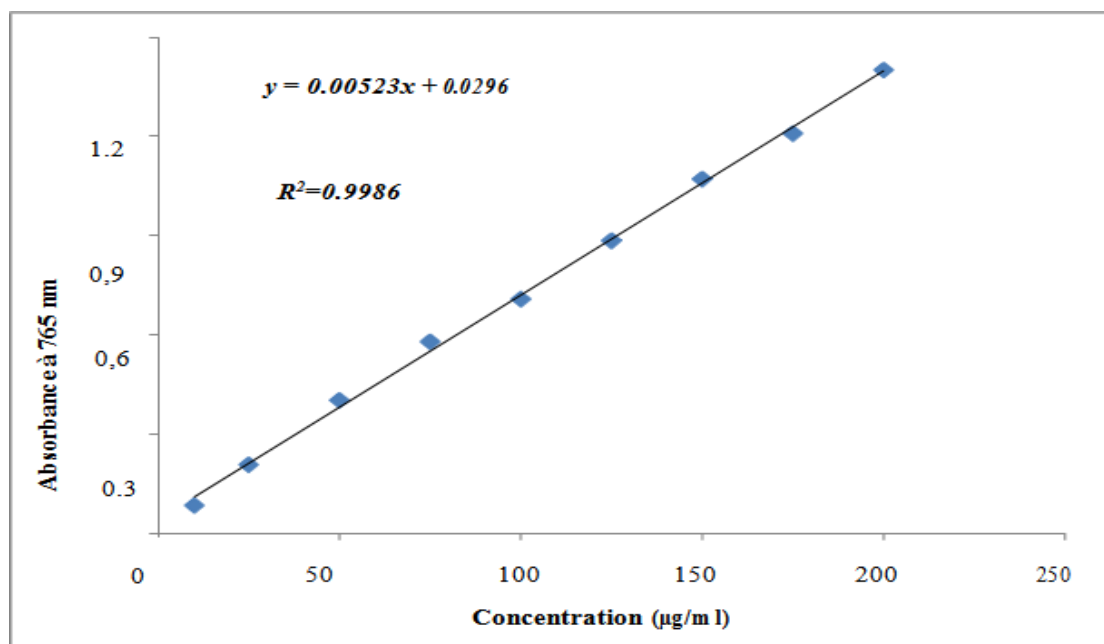


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

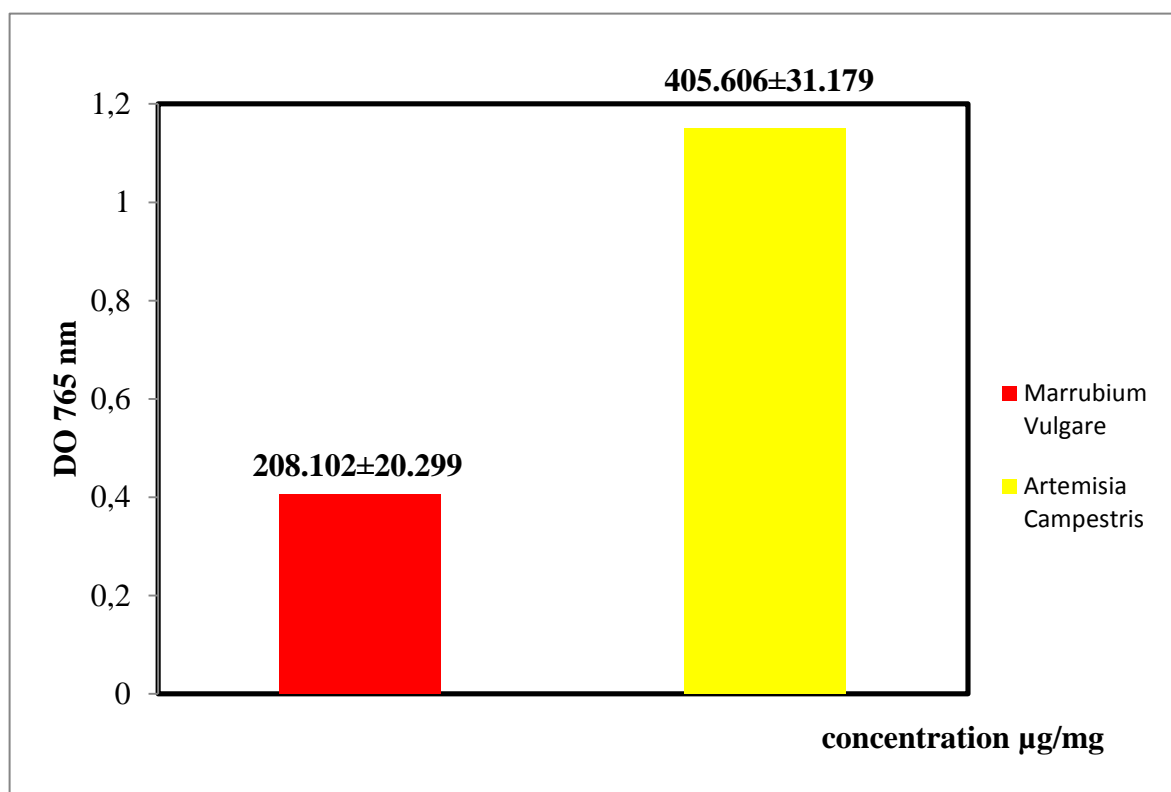


Figure 12 : Histogramme représente les teneurs en polyphénol des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*

Suivant la figure ci-dessous (**Figure 12**), La teneur en polyphénols totaux estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait a été rapportée en µg équivalent d'acide gallique/mg du matériel végétal sec. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris* a une forte teneur en phénols totaux (405.606 ± 31.179 µg /mg) par rapport à celle de l'extrait méthanolique de la plante *Marrubium vulgare* (208.102 ± 20.299 µg /mg).

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisé par une solution étalon (l'acide quercétine) à différents concentration.

La teneur flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide quercétine par gramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait). (**Figure 13**)

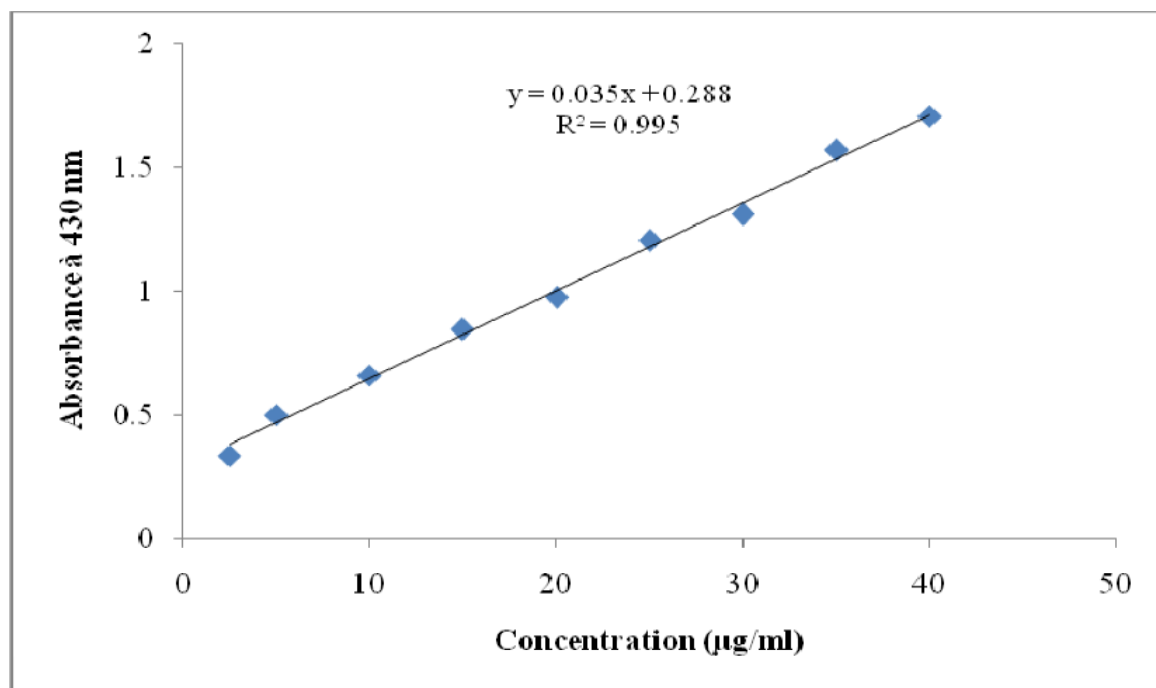


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

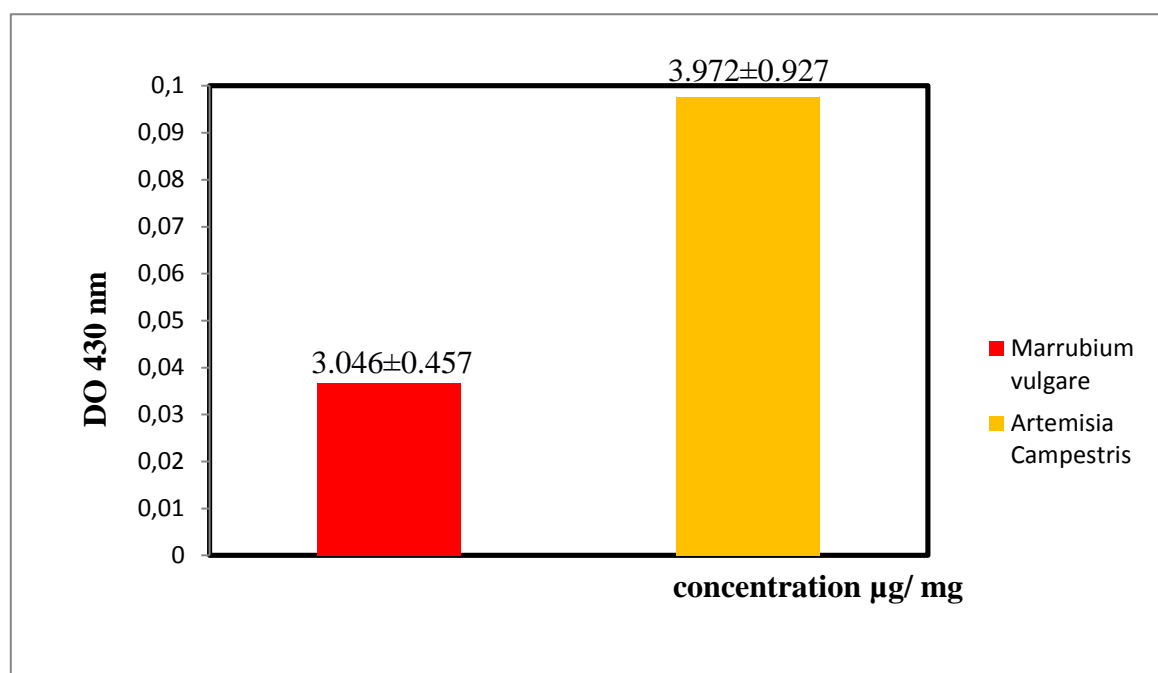


Figure 14 : Histogramme représente les teneurs en flavonoïde des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*

Suivant la figure ci-dessous (**Figure 14**), Les teneurs en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium pour chaque extrait a été rapportée en μg équivalent de quercétine /mg extrait. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique de la plante *Artemisia campestris* a une forte teneur en flavonoïdes ($3.972 \pm 0.927 \mu\text{g} / \text{mg}$) par rapport à celle de l'extrait méthanolique de la plante *Marrubium vulgare* ($3.046 \pm 0.457 \mu\text{g} / \text{mg}$).

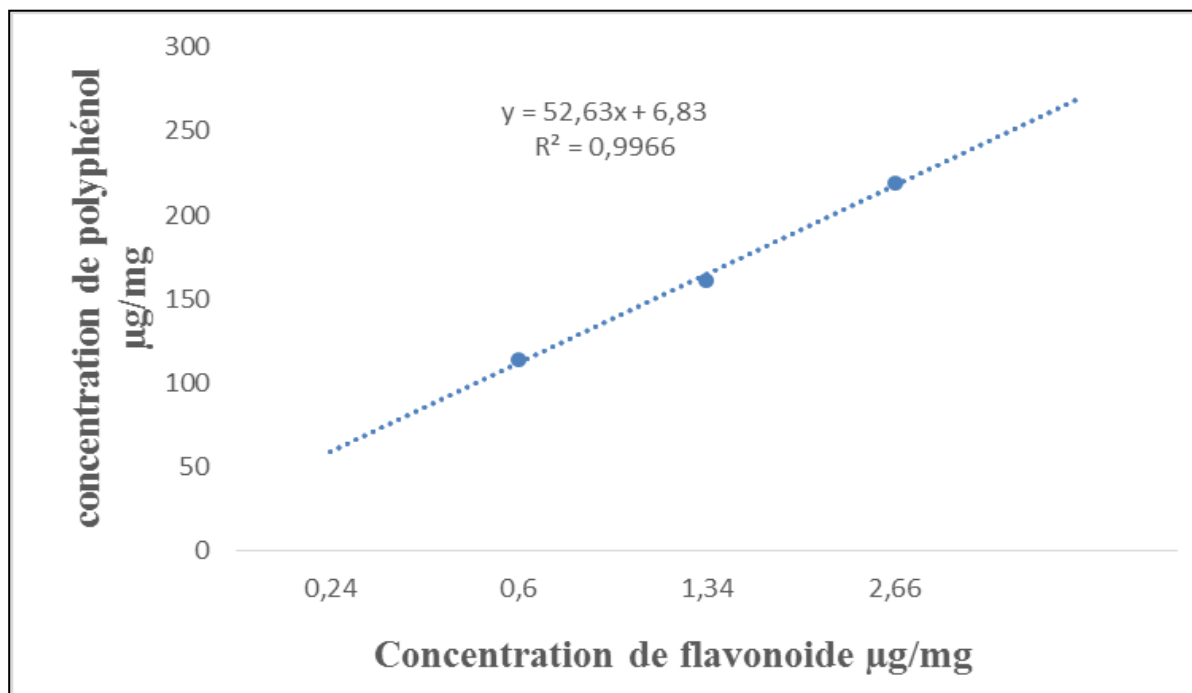


Figure15 : Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et celle en polyphénols de la plante *Marrubium vulgare*

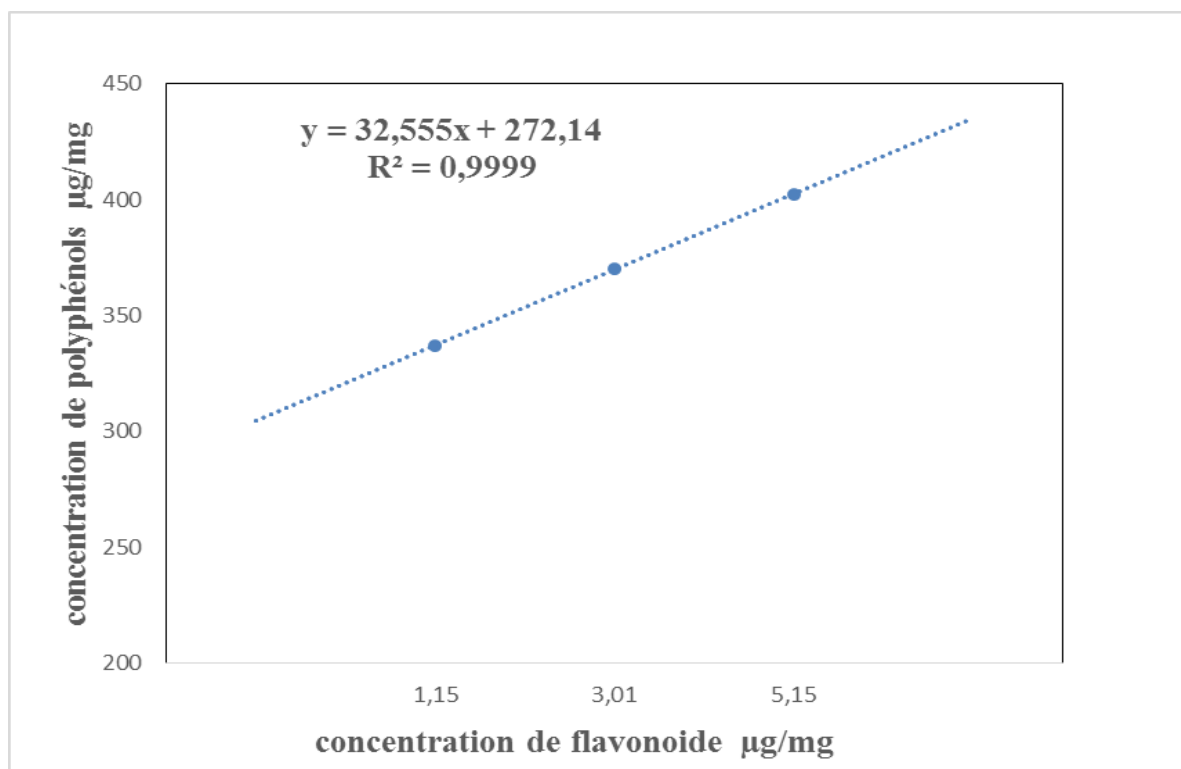


Figure16 : Corrélation entre de la teneur en flavonoïdes et celle en polyphénols de la plante *Artemisia campestris*

Suivant les figures ci-dessus (**Figure 15, 16**), Nous pouvons suggérer d'après ces résultats, qu'il y a une parfaite corrélation entre les flavonoïdes et polyphénols des deux plantes étudié.

V. Evolution de l'effet hémolytique

Les tests biologiques ont été réalisés sur les extraits hydroalcooliques préparés par macération, à partir de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* et d'*Artemisia campestris*.

Les figures 17 et 18 présentent l'évolution de l'effet hémolytique, et les figures 19 et 20 présentent l'évolution des taux d'hémolyse par absorbance, durant 45 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 de ces plantes (50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml et 200mg/ml), comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total (HT) provoqué par l'eau distillée.

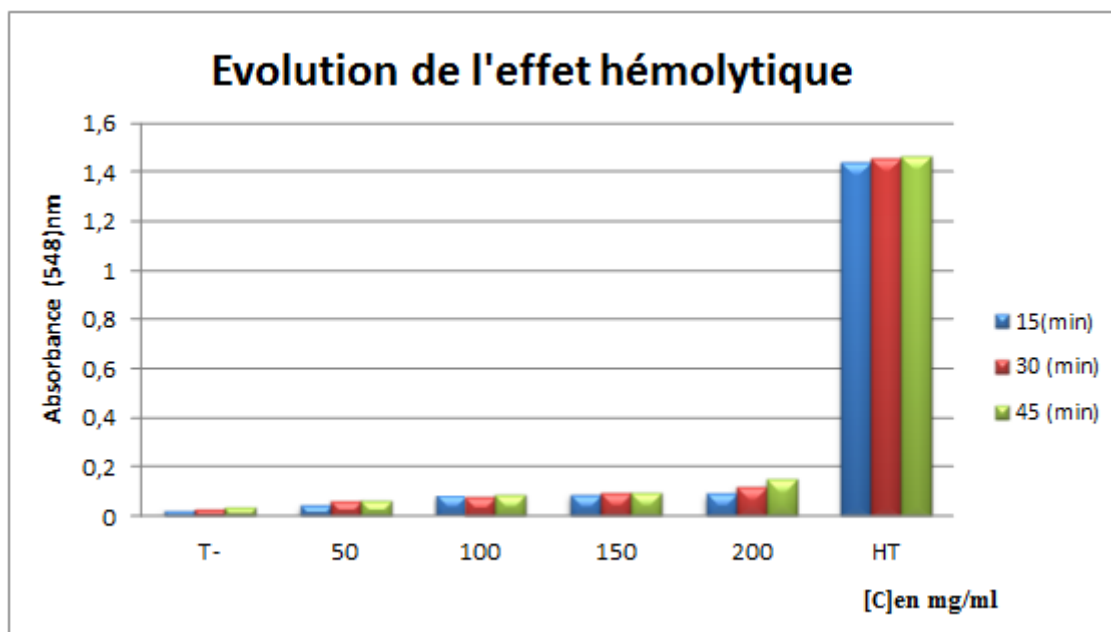


Figure 17 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne d'*A.campestris*, incubé à 37 °C durant 45 min, à 548nm.

PBS+ susp : témoin négatif (T-) ; HT : hémolyse total.

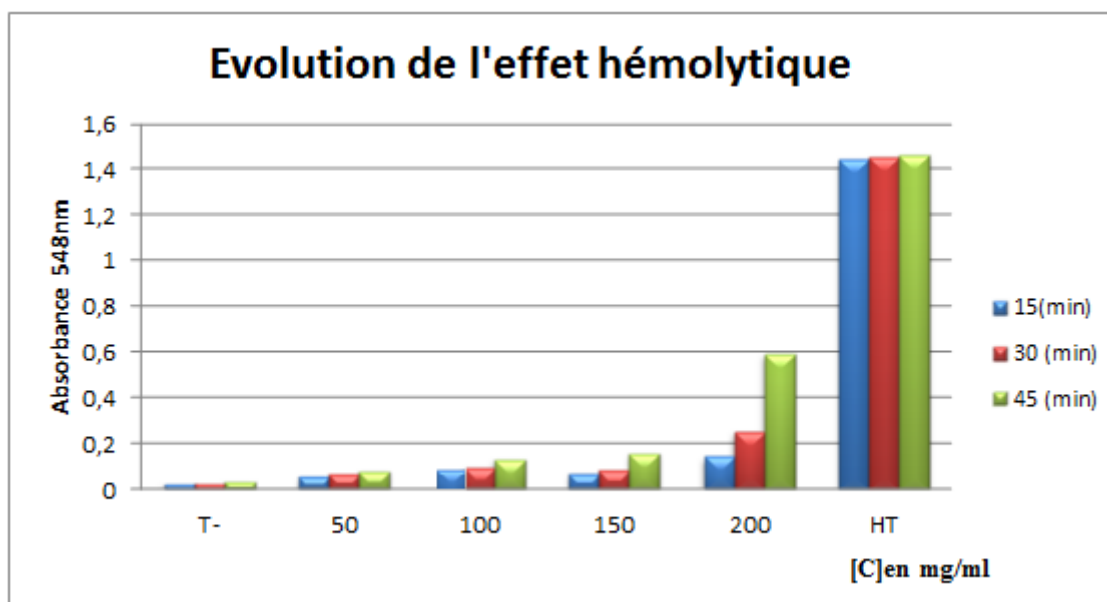


Figure 18 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait brut Hydroalcoolique de la partie aérienne de *M.vulgare*, incubé à 37 °C durant 45 min, à 548nm.

PBS+ susp : témoin négatif (T-) ; HT : hémolyse total.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des absorbances (taux d'hémolyse) des érythrocytes incubés et isolés dans du PBS (pH 7,4) en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique du *M. vulgare* et *d'A.campestris*. Ces augmentations enregistrées sont en fonction des concentrations et de temps mais elles ne dépassent pas une valeur de 0,60 et 0,20 respectivement, pour une concentration finale de 200mg/ml à 45 min d'incubation. Ces valeurs sont largement inférieures par rapport à l'absorbance de tube d'hémolyse total, qui dépasse 1,46 à 45 min dans les mêmes conditions.

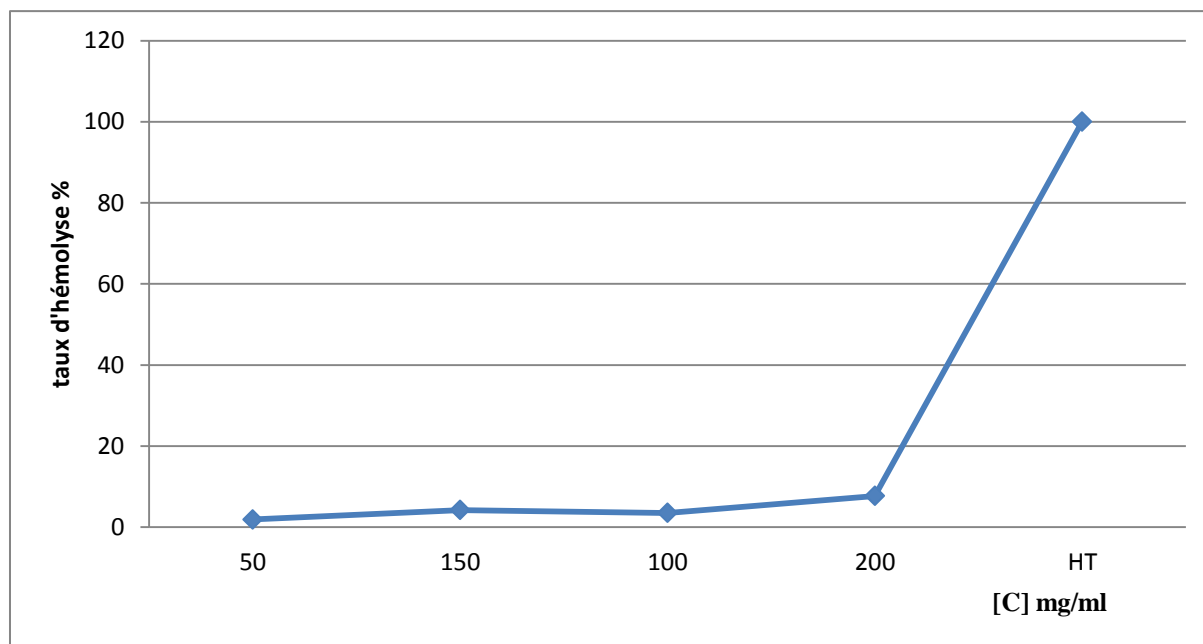


Figure 19 : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne *d'A.campestris*, après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

D'après les résultats présentés dans la figure 19, nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de 2%, 3% , 4% et presque 8%, par rapport à l'hémolyse total pour les concentrations 50 ; 100 ; 150 et 200 mg/ml, respectivement par rapport au témoin positif (hémolyse totale). On remarque que ce taux est très bas même à une concentration élevée.

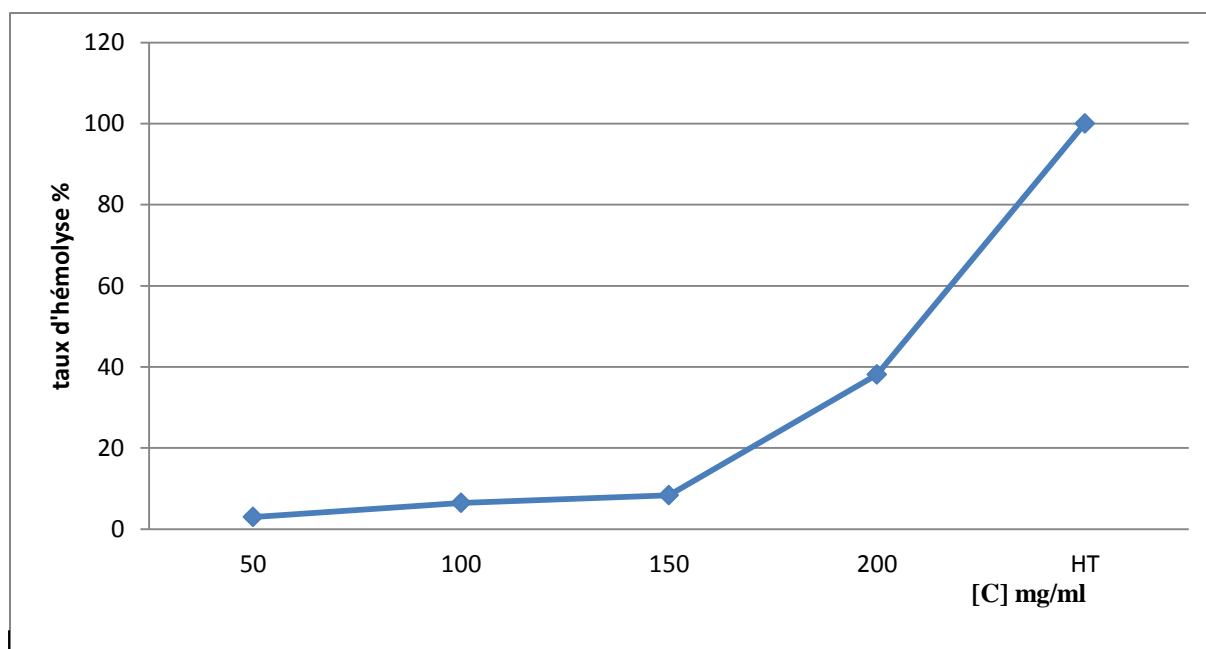


Figure 20 : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

D'après les résultats présentés dans la figure 20, nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de 3%, 6% et 8%, par rapport à l'hémolyse total pour les concentrations 50 ; 100 et 150 mg/ml, respectivement. Ce taux est moyennement élevé (d'ordre de 38%) à une concentration de 200 mg/ml d'extrait étudié, par rapport au témoin positif (hémolyse total).

La figure 21 présente la comparaison des taux d'hémolyse en pourcentage des deux plantes *M. vulgare* et *A. campestris*, après 45 min d'incubation à différentes concentrations d'extraits

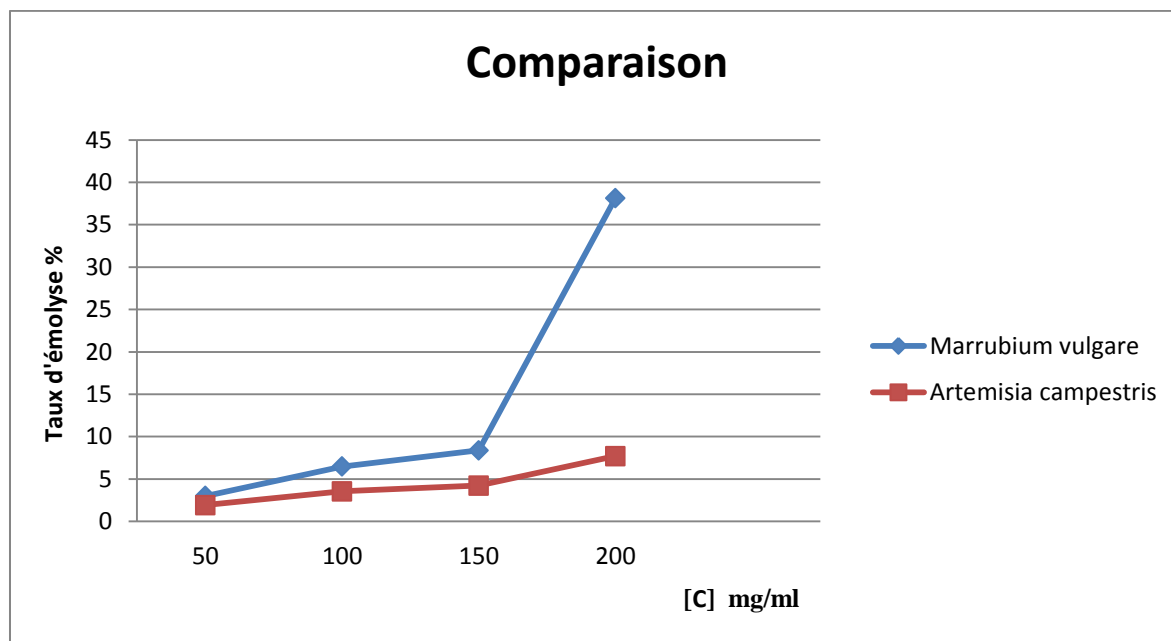


Figure 21 : Evolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations des deux plantes étudiées après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

En comparaison, nous avons constaté que l'extrait de *Marrubium vulgare* présente un effet hémolytique très élevé par rapport à l'extrait de *Artemisia campestris* avec un taux d'hémolyse comparé à l'hémolyse totale égale à 38% et presque 8% respectivement.

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition, les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ce qui nous a menés à étudier l'effet hémolytique, *in vitro*, de ces plantes :

1) A souligner que *Marrubium vulgare* est une plante amère à caractère salin qui ne peut donc pas être tolérée (76).

Les résultats de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *M. vulgare*, préparé par macération, ont montré que cette plante présente un effet toxique très faible face aux érythrocytes isolés, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 8% à une concentration de 150 mg/ml par rapport à l'hémolyse totale.

Cet extrait peut être légèrement toxique sur les érythrocytes isolés à une concentration de 200 mg/ml avec un taux d'hémolyse enregistré d'ordre de 38%.

Ces résultats sont confirmés par l'étude de (137), qui ont enregistré un taux d'hémolyse d'ordre de 5,4%, 45min après l'incubation d'une faible concentration d'extrait brut de *M. vulgare*, par rapport l'hémolyse total.

2) Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'activité d'*Artemisia campestris* comme Agent de protection de l'organisme, elle possède de nombreuses propriétés biologiques parmi lesquelles on cite la plus importante : activité antioxydante prouvé par (65 ; 138), donc l'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité puisse être entreprise en vue de son adaptation en tradithérapie, pour cela on étudiée l'effet hémolytique des extraits hydroalcoolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*.

Les résultats obtenus dans notre test montrent que d'*Artemisia campestris* ne possède aucune activité hémolytique (l'apparition d'un taux d'hémolyse de 8% à une concentration très élevé 200mg/ml et ce pourcentage est négligeable par rapport au taux d'hémolyse total) Elle peut être une source très importante dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies.

- Des anciennes observations indiquent la relation entre la richesse des plantes par les métabolites secondaires et le pouvoir antioxydant qui joue un rôle primordial dans la réduction de taux de la libération érythrocytaire et ça ce que prouvé (32 ; 139) dans son thème qui mentionne que : les flavan-3-ols, épicatechine et catéchine et leurs oligomères (procyanidines). Bien que ces flavonoïdes aient été rapportés pour réduire le taux de la libération érythrocytaire induite par des radicaux dans des modèles animaux expérimentaux, on sait peu sur leurs effets sur hémolyse érythrocytaire humaine.

- L'analyse phytochimique des deux plantes qu'on est étudié a révélé la présence des grands groupes chimiques que sont: flavonoïdes, les tanins

Ils ont un pouvoir antioxydant, favorisent la régénération des tissus, diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance à l'hémolyse (32).

La présence de ces grands groupes chimiques de par leurs propriétés, justifie la résistance à l'hémolyse.

*C*onclusion et
perspectives

Conclusion et perspectives

La phytothérapie peut constituer une médecine alternative ou au moins comme un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique.

De nos jours, un grand nombre des plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme

Le principal objectif portait sur la valorisation pharmacologique de deux plantes issues de cette biodiversité végétale. Le choix de ces plantes était basé sur la fréquence de leurs utilisations par la population locale.

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative de ses extraits.

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimiques et l'effet hémolytique des extraits bruts.

L'extraction de la partie aérienne de deux plantes a permis d'obtenir des rendements avec un teneur en composés phénoliques, flavonoïdes était conséquente.

A lumière des résultats obtenus dans notre étude, l'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des tannins, des saponines, des flavonoïdes et des composés réducteurs en quantités importantes. Cependant, il y a manque de coumarines, dans les extraits méthanolique d'*Artemisia campestris*.

L'analyse quantitative de l'extrait hydrométhanolique, est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une concentration de 3.972 µg/mg et 3,046 µg/mg en flavonoïdes pour l'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement, et une concentration de 405.606 µg /mg et 208,102 µg/mg de polyphénols totaux d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement.

Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une

menace pour la santé de l'homme, l'intérêt des humains exige l'étude de ces toxicités.

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

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 d'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de ces plantes, nous avons constaté que la *Marrubium vulgare* est faiblement toxique, par contre l'*Artemisia campestris* ne possède aucun effet hémolytique. Elles peuvent être des sources très importantes dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies.

Finalement, tous ces résultats obtenus *in vitro* restent préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agissent ces plantes sur les érythrocytes isolés du sang humain

En fin ce travail reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit cette plante sur les érythrocytes isolés du sang humain. Par conséquent, la réalisation d'autres études complémentaires seraient nécessaires :

- ✓ Etude de la cytotoxicité, fuite cellulaire, par l'étude de la pompe Na^+/K^+ ,
- ✓ La réalisation d'une étude phytochimique approfondie qui consiste en: la purification, l'identification, caractérisation des composés actifs ;
- ✓ Etude de la toxicité aigüe et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] **Newmann D, Cragg G.** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products.* 2007; 70: 461-477.
- [2] **Verpoorte R.** La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^o congrès européen d'ethnopharmacologie. 2002 ;p 274 .
- [3] **Adjanohoum J, Assi L, Floret J, Guinko S, Koumare M, Ahyi A, et Rayanal J.** Médecine traditionnelle et pharmacopée contribution aux études ethnobotaniques et florestiques au mali . 1979 ; p 291.
- [4] **Bruneton J.** Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales En 3^{ème} Ed. 1999 ; pages 199–388.
- [5] **Seguiri R.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea C. africana* *C. nicaensis*, Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique - Option Phytochimie , FACULTE DES SCIENCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE, Université Mentouri – Constantine. page 12.
- [6] **Khattabi A, Rhalem N, Chabat A, Skali S, et Soulaymani-Bencheich R .** Plantes toxiques définition et classification Toxicologie Maroc 2010; 2: p3-4.
- [7] **Frederich M.** espace Duesberg. , Janvier 2014.
- [8] **Kasolem.** Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de *leucasMartinicensis*(Jacquin) R. Brown, *HoslundiaOpposita.* **2009.**
- [9] **Belfadel A .** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale (*Rutamontana*).Mémoire de master en microbiologie, Université Abbès laghroure Khenchela. 2013 ;p 1-4 .
- [10] **Bruneton J.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. 2009 ;p 1288.

- [11] **Lutge U, Kluge M, Bauer G.** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. **2002** ; 211.
- [12] **Abderrazak M, Joel R.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. **2007** ;p 177.
- [13] **Lugasi A, Hovari J, Sagik and Birol.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.J.Acta.biologica. Szegediensis. (Cited in Mohammedi Z, 2005.**2003**; 47 (14):119-125.
- [14] **Tapieroh, Tewk, Nguyen B and Mathé G.** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies Biomed.pharmacother (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).**2002**;56: 200-207.
- [15] **Boizot N, Charpentier J.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008).**2006**; 79-82.
- [16] **Bruneton.** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et Documentation, 2ème édition. Lavoisier. Paris. **1993** ; 266- 275.
- [17] **Crozier A, Clifford M, Ashiharad.** Plant Secondary Métabolites : Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. Thèse Présentée Par Mme Belyagoubi Née Benhammou Nabila. **2006**.
- [18] **Bahorun T.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source D'approvisionnement potentiel. Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius. **1997** ; p83-94.
- [19] **Babar Ali M, Hahn E,Paek K.** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. Molécules. **2007**; p607-621.
- [20] **Fallehh, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N,Trabelsin, Boulaaba M and Abdelly C.** Phenolic composition of CynaracardunculusL. Organs and their biological activities .C. R. Biologies. **2008** ; **331**:p372-379.
- [21] **Gomez A, Gomez M, Arraez D, Segura A and Fernandez A.** Advances in the analysis of phenolic compounds in Products derived from bees. J Pharmaceutical and Bio medical Analysis. **2006** ; 41: p1220-1234.

- [22] **Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **2002** ; 51: p304-315.
- [23] **Seyoum A, Asres K, El-Fiky F.** Structure– radical scavenging. **2006**.
- [24] **Ghestem A, Seguin E, Pari M and Orecchioni A.** Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed TEC&DOC. Paris. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008). **2001**; p 275.
- [25] **Bruneton J.** Pharmacognosie, photochimie .Plantes médicinales. Technique et documentaires, 3 Edition Lavoisier, Paris. 1999 ; p1120 .
- [26] **Harborne J, Williams C.** Advances in flavonoid research since 1992-2000.
- [27] **Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras A, Simoncic M and Knez Z.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* **2005**; 89: 191-198.
- [28] **Dacosta Y.** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. **2003** ; p317.
- [29] **Chebrouk F.** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Magister. Université KasdiMerbah Ouargla. **2009**.
- [30] **Effendil, Yajun Y.** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* .*Metab. Eng.* **2008** ; 8:p 172-181.
- [31] **Medic–Saric M, Jasprika I, Suolcic Bubalo A and Momar A.** Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta* (cited in Mohammedi Z, 2005). **2003**; 77(1-2):p361-366.
- [32] **Bruneton J.** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. 1999 ; pp: 227-310-312-313-314.494 .
- [33] **Grotewold E.** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol. Review.* PubMed PMID:166697. **2006**; 57:761-80.
- [34] **Grace K, Pereira, Paulo M and Donate and Sergio E and Galembeck.** Electronic structure of hydroxylated derivatives of the flavylum cation, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. **1996**.
- [35] **Luigia Longo, Giuseppe Vand Asapolo.** Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera L.* berries, *Food Chemistry*. **2006**; p226–231.
- [36] **Jaime A, Yanez , Preston K. Andrews, Neal M and Davies,** Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *Journal of Chromatography B*. **2007** ;848:p159–181.

- [37] **Crozier, Einar Jensen, Michael E ,Lean J , Morag S and Mcdonald.** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase highperformance liquid chromatography, Journal of Chromatography A. **1997**; 761: p315-321.
- [38] **Stobieckim, Skiryca, Kerhoas L,Kachlicki P , Muth D ,Einhorn J , Mueller B and Roeber,** Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS, Metabolomics. **2006**; p197-219.
- [39] **Paris M, Hurabielle.** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris. **1981** ; p 102-103-104-107.
- [40] **Ghestem A, Seguin E,Paris M and Orecchioni A.**Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed TEC&DOC. Paris. (Cited in DjemaiZoueglache S, 2008).**2001**; p 275.
- [41] **Khanbaba K, Reetr.** Tannins : Classification and Defenition. Journal of Royal Society of Chemistry. **2001**; 18:p 641-649.
- [42] **Xie D, Dixon R.**Proanthocyanidins biosynthesis-still more question thananswers .Photochemistry. **2005** ;66:p 2127-2144.
- [43] **Kansole M.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucasmartinicansis*(Jacquin). **2009**.
- [44] **Wichtl M, Anton R.** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. **2009** ; p 38- 41.
- [45] **Hopkins W.** Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris.**2003** ;p 514.
- [46] **Guignard J.** Abrégé botanique, 9 ème édition. Édition Masson, Paris.**1994** ; p204.
- [47] **Dellile L.**Les plantes médicinales d'Algérie.Édition BERTI.Alger,(DjemaiZoueglache S, 2008).**2007** ;p 122.
- [48] **Judd S, Campbell Chrithoper S, Kellogg A and Stevens P.**Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université.**2002**; p84 -87, 396-399.
- [49] **Iserin P.** Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed., Paris.**2001** ; p 14-275.
- [50] **Kirrman J, Cantacuzene P, Duhamel.** Chimie organiquefonctions complexes, tome 3, éd. Librairie Colin. Paris.**1975** ; 197- 199.
- [51] **BRUNETON.** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation. 1993 ; p266- 275.
- [52] **Vallet.** Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par *agrobacteriumtumefaciens*,

Agrobacteriumrhizogenes et culture de chevelus lacunaires, mémoire D.E.A. Université de Picardie Jules Vienne. **1996** ;p1 – 32.

[53] **Bruneton J.** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3^{ème} Ed Techniques et documentations. Paris. 1999 ; pp: 227-310-312-313-314.494.

[54] **Mucciarelli M, Maffei M.** *Artemisia*: Introduction to the Genus Vol. 18 Ed Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York. **2002**; p10-16.

[55] **Kundan S, Anupam S.** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. J. Pharm. Biol. **2010**; p1-9.

[56] **Mirjalili M, Tabatabaei S, Hadian J and NejadSandSonboli A.** Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **2007**; **19**; p 326–329.

[57] **David A, Herve M.** Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel Suisse. **1994** ;p428.

[58] **Quezel, Santa.** Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique Paris. **1962** ;p 990.

[59] **Ozenda P.** Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique Paris. **1983** ;p 441.

[60] **CARATINI R.** Bordas encyclopedie. Ed *Bodas* Belgique. **1971**;23:p137-195.

[61] **Vernin G, Merad O, Vernin G and Zamkostian R and Parkanyi C.** GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. *Dev. Food Sci.* **1995**; **37**:p 147- 205.

[62] **Joa O, Vasconcelos , Artur M and Jose A.** Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp Maritima. *Phytochemistry.* **1998**; 49 (5):p1421-1424.

[63] **Juteau F, Masotti V, Bessiere J and Viano J.** Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* **2002** ;(30):p 1065-1070.

[64] **Jerkovic J, Mastelic M, Milos ,Juteau F , Masotti V and Viano J.** Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* **2003**; **(18)**:p 436–440.

[65] **Akrouit A, Chemli RC, Chrief, and Hammami M.** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J. FlavourFragr.* 2001 ; p337–339.

- [66] **Valant-Vetschera K, Fischer R, Wollenweber E.** Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**; **31**: p487-498.
- [67] **Naili M, Alghazeer O, Saleh N and Al-Najjar A.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* **2003.2010**; **3**: p 79–84.
- [68] **Dob T, Dahmane D, Berramdane T and Chelghoum C.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.* **2005v**; **43**(6): p512–514.
- [69] **Sefi M, Fetoui H, Maknim and Najiba N.** Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food.Chem.Toxicol.* **2010**; **48**: p1986–1993.
- [70] **Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, and Aouni M.** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio.* 2007 ;p421–428.
- [71] **Saoudi M, Allagui M, Abdelmouleh A , Jamoussi K and El Feki A.** Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against pufferfish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* **2010** ; **62**: p601–605.
- [72] **Boudjelel A, Henchiri C, Siracuza L , Sari M and Ruberto G.** Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia.* **2012**; **83**: p286–292.
- [73] **Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S and Bruno M.** Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. Libanoticum, *J. Phytother. Res*, Vol. **2006** ; **21** : p395-397.
- [74] **Bonnier G.** La grande Flore française Ed. Billin ; Complète La Végétation de la France, Suisse et Belgique. **1990**; **09** : p 25-26.
- [75] **Quezel P, Santa S.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris .1962 ; Tome I : p565.

[76] **Aouadhi S.** Mémoire Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. **2010.**

[77] **Judd Walter S, Campbell Christopher S, Kellogg Elizabeth A, Stevens Peter.**

Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck

Université .2002 ;p84 -87 ,396-399.

[78] **Bellakhdar J.**Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : Dunes France. **1997 ;** 341.

[79] **Boukef M.**Médecine Traditionnelle et Pharmacopée Les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, France.**1989 ; p 163-164.**

[80] **Bonnier G.** La grande Flore française Ed. Bllin ; Complète. 1990: (09) :p25-26.

[81] **Baba Aissa F.** Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algerie, Ed. Librairie moderne- Ruiba. **1999 ;p46-47-194-195-231.**

[82]**Meyre-silva C, Yunes R,Schlemper V, Campos-buzzi F. and Cechinel V.** Analgesicpotential of marrubiinderivatives, a bioactive diterpenepresent in *Marrubium vulgare*(Lamiaceae), *IL Farmaco.* 2005 : Vol. 60 (4) ;p 321-326.

[83] **Çitoglu G, Aksit F.** Occurence of marrubiin and ladanein in *Marrubiumtrachyticum*Boiss. From Turkey. *BiochemSystEcol.* **2002;p 30:885–886.**

[84] **Nawwarm, El-Mousallamy A, Barakat H and Buddrus J and Linscheidm.** Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry.* **1989; p28: 3201–3206.**

[85] **Papoutis Z, Kassi E, Mitakou S and Aligianiss N and Tsiapara and Chrousos G.**Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol.***2006 ;p 98: 63–71.**

[86] **Wichtl M, Anton R.** Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2e Ed : TEC & DOC. Paris. **2003 ; p1 -364.**

[87] **Raynaud J.** Prescription et conseilen phytothérapie. Ed. Tec & Doc. **2007 ;p215.**

- [88] **Dejesus R, Cechinel-Filho V, Oliveira A and Sehlemper V.** Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine.*, Vol. **2000**; **7**: p 111-115.
- [89] **El Bardais, Lyoussib, Wibo M and Morel N.** Comparative Study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridinecalcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat, *Clin. Exp. Hypertens.*, Vol. **2004**; **26** (6): p465-474.
- [90] **Rigano D, Aviello G, Bruno M , Formisano C , Rosselli S , Capasso R, Senatore F and Izzo A and Borrelli F.** Antispasmodic Effects and Structure–Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum*ssp. *Libanoticum*, *J. Nat.Prod.*, Vol. **2009** ; **72** :p1477-1481.
- [91] **Stulzer H, Tagliari M, Zampirolo J , Cechinel-filho V and Schlemper V.** **2006.** Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*, *J.Ethnopharmacol.*, Vol. **2009** ;**108** (3) : p379-384.
- [92] **Pavela R.** Insecticidal activity of certain medicinal plants, *Fitoterapia.*, Vol. **75** : p745-749. *Phytochemistry.* **55**: p481-504.
- [93] **Sahpaz S, Garbacki N, Tits M and Bailleul F.** Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*, *J.Ethnopharmacol.*, Vol. **2002** ; **79** (3): p389-392.
- [94] **Quave C, Plano L, Pantuso T and Bennett B .** Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *J.Ethnopharmacol.*, Vol. **2008** ; **118**(3) :p 418-428.
- [95] **Warda K, Markouk M, Bekkouche K, Larhsini M, Abbad A, Romane A, and Bouskraoui M.** Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2009** : Vol. **3** (3) ;p 101-104.
- [96] **Weelk, Venskutonis P, Pukalskas A, Gruzdiene D and Linsen J.** Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *J.Fett/Lipid.*, Vol. **1999** ; **101** (10): p 395-400.

- [97] Edzirih, Ammar S, Groh P , Mahjoub M ,Mastouri M ,Guttman L, Zine M and Aouni M. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alyssonand Retamaretamain* Tunisia, Pak. J.Biol.Sci.,Vol. 2007; 10:p1759-1762.
- [98] Alkhatib R, Joha S, Cheok M, Roumy V, Idzoierek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F and Hennebelle T .Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*,PlantaMedica., Vol.2010; 76 (1): p86- 87.
- [99] Valnet J, Maloine S. Phytothérapie traitement des maladies par les plantes. 1983.
- [100] Kamoun P, Fajaville J, et Achard J. Guide des examens de laboratoire. 2002 ; p 23.
- [101] Beraud J, Arnould J, et Begel M. Le technicien d'analyses biologiques. 2001 ; p 21.
- [102] Ghnassia J , Desch G, et Duchassaig D. Echantillons biologiques phase pré analytique etprélèvements en biologie médicale. 1998 ; p 12 .
- [103] Aguilar_M. H2-Erythrocytes_MB7 : Hémathologie H2_Faculté demédecineMontelieu_Nîmes. 2007.
- [104] Ucar K. Clinicalpresentation and management of hemolyticanemias *Oncology (Hunting)*. 2002 ;p 163-70.
- [105] Mintzer M, Billet Shira N,and Chmielewski L. *Drug-inducedhematologic syndromes. Advances in hematology*. 2009 ;p 495-863.
- [106] Olivier P, André D, et Dagmar K. fiche technique: 31 Échantillon hémolysé, lipémique, ictérique CSCQ .Juin 2010.
- [107] Braham jmlinejia .le globule rouge : faculte de pharmacie de monastir *Support Pédagogique 3eme Année (Nouveau Cours)*. 2012.
- [108] Guitton C, Garcon L, Cynober T, Gauthier F , Tchernia G, Delaunay J,Leblanc, Thuret I, et Bader-Meunier B. Sphérocytose héréditaire :recommandations pour le diagnostic et laprise en charge chez l'enfant. Archives de Pédiatrie. [article in press] . 2008.
- [109] Benjamin B, Marc Z. Hémolyse et son exploration : Hémathologie biologique (Pr Marc Zandecki). Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France . 2006.
- [110] Marc D. Tissu Sanguin : Le Globule Rouge Et Sa Pathologie. Les Principaux Types D'anemies. 2013 .

- [111] **Tadeg H, Mohammed A, Asres K , and Gebre-Mariam T.** Antimicrobial activities of some selecte dtraditional Ethiopianmedicinal plants used in the treatment of skin disorders. *JEthno pharmacol .* 2005 ;p 168–175.
- [112] **Karumi Y, Onyeyili P, Ogugbuaja V.** Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *JMed Sci.* **2004**;4(3):p179-182.
- [113] **Edeaga H, Okwu D, Mbaebie B.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology.* **2005**;4(7):p685-688.
- [114] **Bemahdi A.** Identification des Principes actifs des extraits des plantes medicinales.*Phytochimie.* **2001** ; 6 :p11-27.
- [115] **Wagner H, Blatt S.** Plant druganalysis : athin layer chromatography. Atlas, Second edit.Springer.**1996** ;p 384.
- [116] **Ciulei I.** Praticalmanuals on the industrialutilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of veget abledrugs Ed. Ministry of chemicalindustry, Bucharest. **1982** ; p67.
- [117] **Yrjönen T.** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of naturalproducts. *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis .*2004 ; 32:p 64
- [118]**Mohammedi Z.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Tlemcen. (2006).
- [119] **Wong C, Lihb , Chengk and Chen F.** Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **2006**;12:p120-130.
- [120] **Vuorela S, Kreander K, Karonen M, Nieminen R , HamalainenM, Galkin A, Laitinen L, SalminenJ, Moilanen E, Pihlaja K , Vuorela H, Vuorela P and Heinonen M.** Preclinicalevaluation of rapeseed, raspberry and pine barkphenolics for healthrelatedeffects. *J. Agric. Food Chem.* **2005** ; 53: p 5922-5931.
- [121] **Djeridane A,Yous M, Nadjemi B and Boutassouna D , Stocker P and Vidal N.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extractscontainingphenoliccompounds. *Food Chem.* **2006** ;97 :p 654-660.

- [122] **Mohan C, Buffers A.** guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD, San Diego, California, Calbiochem. 2006 ;p 22.
- [123] **Guo-Xiang L, Zai-Qun L.** The protective effects of ginsenosides on human erythrocyte against thapsigargin-induced hemolysis. *Food and Chemical Toxicology* .2008 ;p 886–892.
- [124] **Kanyonga P, Faouzi B, Meddah M , Mponal E, Essassi ,and Cherrah Y.** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011 ;p 199-204.
- [125] **Arab H, Rahbari S, Rassouli A, Moslemi MH, and Khosravirad FDA.** Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. *Trop Anim Health Prod.* 2006;p497–503.
- [126] **Delabays N, Simonnet X, Gaudin M.** The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Curr Med Chem.* 2001;8;p1795–801.
- [127] **Suberu J, Gromski PS, Nordon A, and Lapkin A.** Multivariate data analysis and metabolic profiling of artemisinin and related compounds in high yielding varieties of *Artemisia annua* field-grown in Madagascar. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;p 522–31.
- [128] **TALBI MOHAMMED.** Dosage de Polyphénols de la plante d'Artemisia campestris.L par la chromatographie HPLC. Mise en évidence de l'activité biologique. 2015.
- [129] **Su Y, Ho C, Wang E.** Analysis of leaf essential oils from the indigenous five conifers of Taiwan, *Flavour Fragr. J.* 2006 ; 21 : (3) p 447-452.
- [130] **Yrjonen T.** Extraction and Planar Chromatographic Separation Technique in the Analysis of Natural Product, Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki .2004 ;p64.
- [131] **Mohammedi Z.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat. Univ. Tlemcen. 2013 ; p 22-25.
- [132] **DJAHRA Ali Boutliliss .** Activité bactéricide des flavonoïdes et des tanins extraits d'une plante médicinale spontanée le Marrube blanc : *Marrubium vulgare* L. de la région de Chefia Wilaya d'EL Taref (Nord-Est algérien). Faculté des Sciences Département de

biologie laboratoire de Biologie Végétale et Environnement Mémoire de Magistère Filière :
Biologie Végétale Option : Physiologie des Plantes Médicinales. 2010 .

[133] **Azzi R, and Djaziri R.** Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. in normal and streptozotocin induced-diabetic wistar rats. *Int J PharmSciRes* 2014; 5(5):p 2006-13.

[134] **Ashkenazy D, Friedmann J, Kashman Y.** The furocoumarin composition of *Pituranthostriradiatus*. *Planta Med.* 1983; 47(4):p 218–20.

[135] **Rauter A.P, Branco I, Tostao Z, Pais M.S, Gonzalez A.G and Bermejo J.B.** Flavonoids from *Artemisia campestris* Subs pMaritima. *Phytochemistry.* 1989 ; 28 (8): p 2173-2175.

[136] **A.U. Khan, Gilani A.H.** Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx, *J. Ethnopharmacol.* 2009 ; p 480–486.

[137] **Moussaoui Soumia ,Harkati Zeyneb.** Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de trois plantes utilisées pour le traitement du diabète contenant (*Eucalyptus globulus, Haloxylon scoparium* et *Marrubium vulgare*) DES biochimie, département biologie, Faculté SNV STU , université Tlemcen -Algérie .2013 .

[138] **Aniya Y, Shimabukuro M, Shimoji M, Kohatsu M, Gyamfi M.A, and Miyagi C.** Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *J. Biol. Pharm. Bull.* 2000. 23 (3):p309–312.

[139] **Carl L Keen , Roberta R Holt, Patricia I Oteiza, César G Fraga., and Harold H Schmitz.** Cocoa antioxidants and cardiovascular health. 2005.

Annexes

Annexes

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.

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 *Artemisia campestris* hydroalcoolique de à 37°c durant 45 min à 548nm.

	T-	HT	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml
15(min)	0,025	1,446	0,047	0,073	0,089	0,092
30 (min)	0,028	1,457	0,063	0,079	0,094	0,122
45 (min)	0,036	1,468	0,064	0,088	0,098	0,149

Tableau 02 : L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique d' *Artemisia campestris* après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

Concentration	HT	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml
Taux d'hémolyse %	100	1,91	3,54	4,22	7,70

Annexes

Tableau 03: L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extraits brut *Marrubium vulgare* hydroalcoolique de à 37°C durant 45 min à 548nm.

	T-	HT	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml
15(min)	0,025	1,446	0,055	0,076	0,07	0,145
30 (min)	0,028	1,457	0,067	0,096	0,081	0,254
45 (min)	0,036	1,468	0,08	0,131	0,159	0,596

Tableau 02 : L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extraits brut hydroalcoolique de *Marrubium vulgare* après 45 min d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

Concentration	HT	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml
Taux d'hémolyse %	100	2,99	6,47	8,38	38,14

Annexes

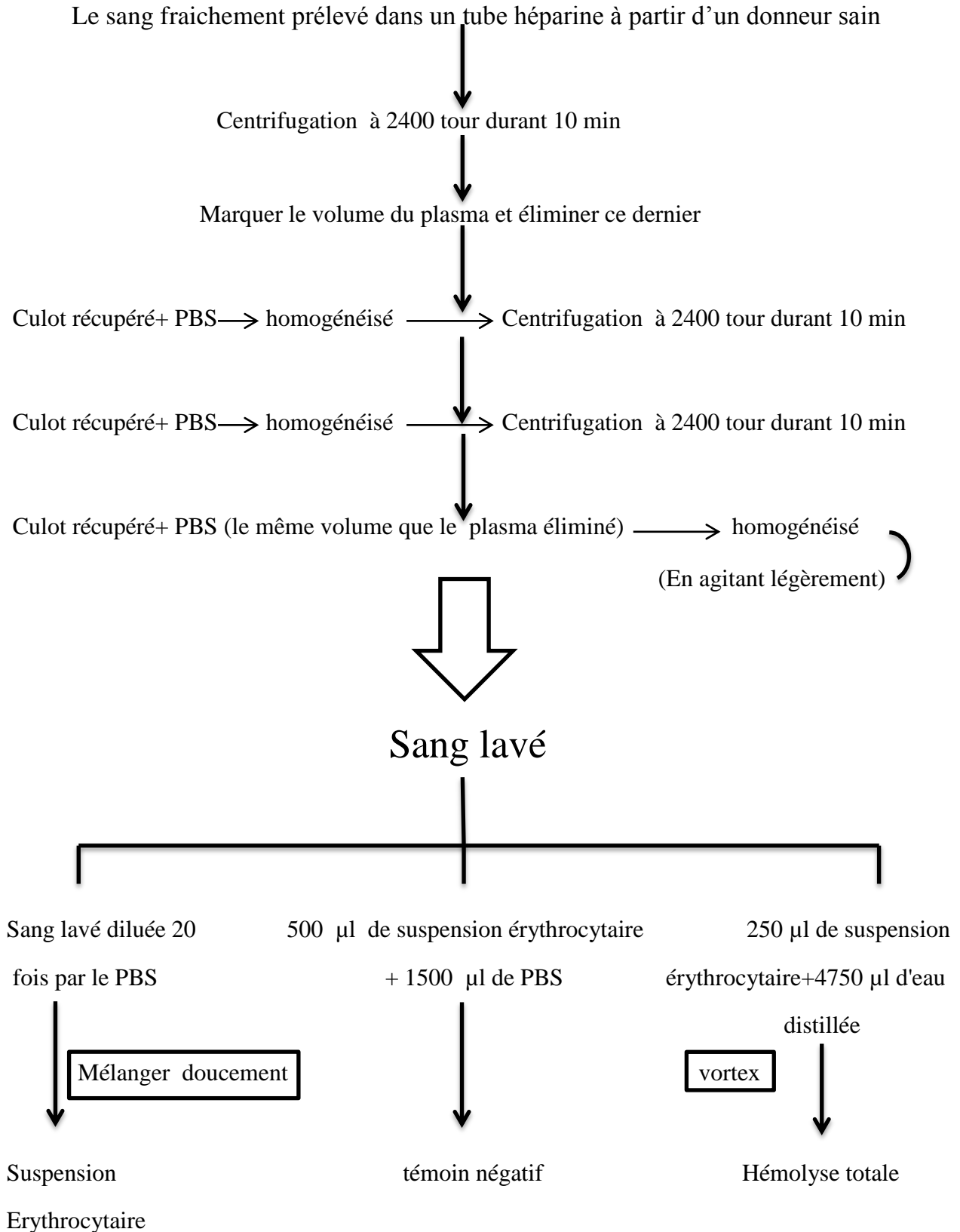


Figure 01 : préparation de suspension érythrocytaire, témoin négatif et positif (HT).

Annexes

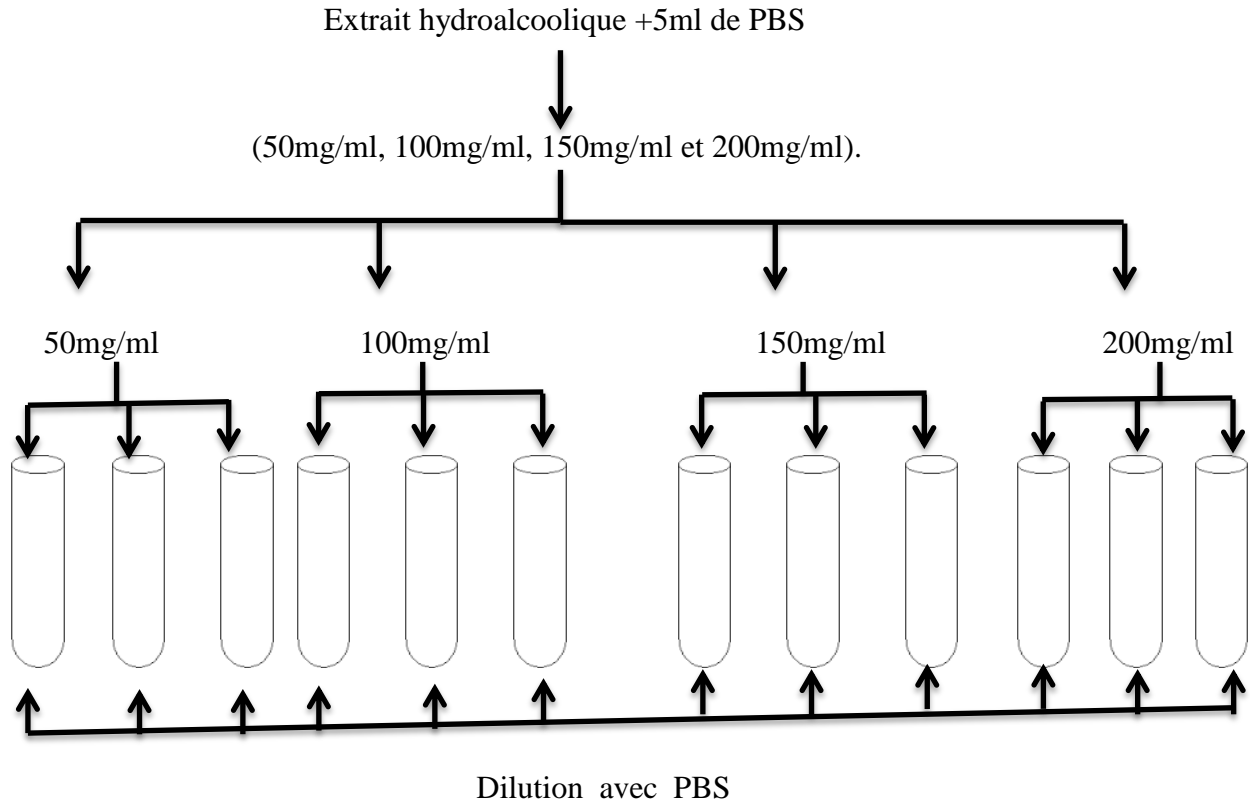
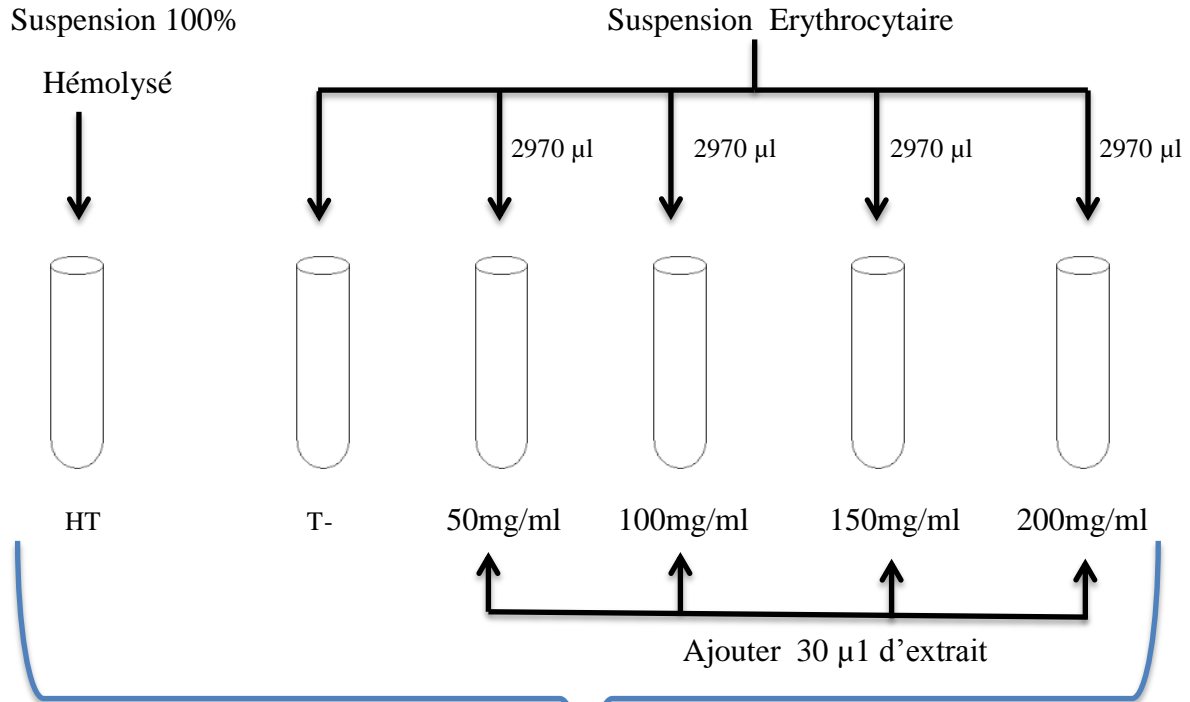


Figure 02 : préparation des extraits.

Annexes



Incuber les tubes dans l'étuve à 37 °C durant 45min

↓
Prélevement de 500 µl chaque 15 min et l'ajout de 1,5 ml de PBS

↓
Centrifugation des tubes à 2000 tour par minute durant 5 min

↓
Lecture d'absorbance de chaque tube à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

<p>Noms et prénoms : MELIKI OULFA MELIKI WISSEM</p>	<p>Date de soutenance : 24/05/2016</p>
<p align="center">Master: Biochimie Appliquée</p>	
<p align="center">Thème</p> <p align="center">Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de deux plantes <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia campestris</i></p>	
<p align="center">Résumé</p> <p>Ce travail porte sur l'étude des tests phytochimiques et l'étude d'effet hémolytique d'extraits de deux plantes utilisées traditionnellement par la population de l'Est algérien pour traiter plusieurs maladies, ces plantes sont <i>Artemisia campestris</i> et <i>Marrubium vulgare</i>. Le criblage phytochimique réalisé sur les extraits méthanoliques de la partie aérienne de ces deux plantes ont révélées leurs richesses en tanins, en flavonoïdes et en composées réducteurs et la présence des alcaloïdes, des saponines, et des coumarines qui sont marquées négativement chez <i>Artemisia campestris</i>.</p> <p>L'étude quantitative des extraits bruts de deux plantes a révélé que l'extrait méthanolique d'<i>Artemisia campestris</i> est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de $405,606 \pm 31,179 \mu\text{g/ml}$ et $3,972 \pm 0,927 \mu\text{g/ml}$ d'extrait par rapport à l'extrait de <i>Marrubium vulgare</i> on trouve des valeurs de $208,102 \pm 20,299 \mu\text{g/ml}$ et $3,046 \pm 0,457 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM des extraits a montré la présence d'une multitude de variété des flavonoïdes comme : flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidine 3-glycosides,...etc.</p> <p>La recherche d'effet hémolytique a été effectuée pour différentes concentrations des deux plantes dans une suspension érythrocytaire préparée à partir du sang humain incubé à 37 °C dans un milieu tampon PBS à pH 7,4.</p> <p>Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait d'<i>Artemisia campestris</i> présente un effet hémolytique très moindre par rapport aux extraits de <i>Marrubium vulgare</i>, avec un taux d'hémolyse comparé à l'hémolyse total égal à 8 % et 38 % pour <i>Artemisia campestris</i> et <i>Marrubium vulgare</i> respectivement.</p>	
<p>Mots-clés: <i>Artemisia campestris</i>, cytotoxicité, effet hémolytique, <i>Marrubium vulgare</i>, polyphénols.</p>	