

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn

Badis-Mostaganem

Faculté des sciences De la

Nature et de la vie



جامعة عبد الحميد بن باديس

مستغانم

كلية العلوم الطبيعية و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## Mémoire de fin d'études

*Présenté par*

**BEHIH NESRINE**

**BEHILIL FATMA RANIA**

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Pharmaço – Toxicologie

*Thème*

***Phytochimie et Activité anti-Hémolytique des  
Extraits de l'épinard (Spinacia oleracea L.)***

Soutenu publiquement le...13/07/2022

Devant le jury :

Présidente	Dr. ZERYOUH. F. I.	MCA.	U. Mostaganem
Examineur	Dr. AMARI. N. A	MCA.	U. Mostaganem
Encadrant	Dr. BALABED. S.	MCB.	U. Mostaganem

Laboratoire de Biochimie

Année Universitaire : 2021-2022

# Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH pour nous avoir aidé pour nous pouvoir parcourir tout ce chemin avec succès durant nos années d'études.

Nous remercions très chaleureusement notre promotrice, Madame *Kribi Soraya*.

Merci pour votre encadrement ainsi que pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'amitié et le soutien moral qu'elle a su nous apporter tout au long de ce travail. Nous tenons également à la remercier de toute la patience dont elle a su faire preuve au cours de la rédaction de notre mémoire.

Nous remercions aussi Madame *Amari Nesrine* et Madame *Zeryouh Fatima Ilhem* pour leur collaboration, et d'avoir accepté de juger notre travail.

nos sincères remerciements vont également à tous les ingénieurs de laboratoire et spécialement à Melle *Rachida*, Mme *Amel*, Mme *Saadia*, Monsieur *Mohammed* de nous avoir toujours aidés chaque fois que nous désirions avancer dans la recherche de différentes solutions.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

A tous merci beaucoup

Rania et Nesrine

## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.*

*A mes frères Amine et Nadir*

*A toute ma famille.*

*A ma chère binôme Nesrine*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui m'ont enseigné.*

*A toutes personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*Rania*

# Dédicace

*Mon parcours universitaire s'est terminé après l'épuisement et les difficultés ...*

*Nous remercions Dieu qui nous a permis de mener à bien cette recherche scientifique et qui m'a inspiré avec la santé, bien-être et détermination,*

*Dieu merci, merci beaucoup.*

➤ *Je me dédie d'abord cette remise des diplômes*

➤ *À mon battement de cœur et à la source de mon bonheur, **ma très chère Mama**, qui me reçois avec un sourire et me quitter par des prières, espérant que dieu tout-puissant me la conservera. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquent pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même quand j'ai devenu adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leurs vies et leurs études. Je te dédie ce travail de mon profond amour.*

➤ *À l'âme de **mon cher Père**, que dieu lui fasse miséricorde, je ne t'oublierai jamais **mon Père**, j'ai souhaité que tu sois témoin de la réussite de ta fille.*

➤ *À mon frère **Lakhal**.*

➤ *À mes adorables sœurs **Fatima Zohra, Asmaa***

*Mes exemples de volonté et de courage pour leurs efforts, la présence à côté de moi et de ses conseils tout le temps.*

➤ *À mes très chères amis : **Timoucha, Narimane, Khadidja, Romaiassa, Houda, Hanane, Salima, Dhiba***

➤ *À ma chère binôme **Rania***

➤ *Je le dédie à tous mes amies de la promotion master 2 pharmacotoxicologie 2022. Je vous souhaite une bonne continuation et beaucoup de réussite.*

➤ *Je ne saurai terminer sans citer **Madame KRIBI-S** pour son encadrement, pour son aide et surtout pour ses conseils précieux.*

*Et Enfin, À tous ceux qui m'ont soutenu et se sont tenus à mes côtés, avec un mot sincère de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

**Nesrine**

## Résumé

Ce présent travail a pour objectif, la mise en évidence des composés phytochimiques et l'estimation in vitro de l'activité anti-hémolytique des extraits de la partie aérienne d'une plante médicinale : *Spinacia Oleracea* L contre une hémolyse induite par l'hypotonie, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la chaleur. Les résultats de la phytochimie montrent que l'épinard est riche en tanins, flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes et stérols. Les saponines ont été révélés au niveau du décocté chloroformique, pour les quinones ils sont présents au niveau de la décoction aqueuse

L'activité anti-hémolytique contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est positive pour l'ensemble des dilutions de la décoction aqueuse avec un maximum à la dilution de 25% dont le taux de protection est de 27%. L'extrait de l'infusion dilué à 75% a donné une bonne protection des érythrocytes contre l'hémolyse hypotonique (induite par le Na Cl) avec un taux de protection de 32,86%. Les résultats de l'activité anti-hémolytique en présence des extraits de l'épinard contre la chaleur indiquent que quelque soient les dilutions pour l'ensemble des extraits, à la température 60 C° l'activité anti-hémolyse est faible.

Les composants des extraits de *Spinacia Oleracea* pourraient être le principal constituant anti-hémolytique. En effet, le dosage des composés polyphénoliques par méthode colorimétrique a montré que la partie aérienne de *Spinacia Oleracea* est très riche en polyphénols et flavonoïdes. Ces derniers sont étroitement liés à l'activité anti-hémolytique de l'épinard exprimée par les extraits végétaux;

**Mots clés:** Epinard; Extraction; Phytochimie; Activité anti-Hémolytique

## Abstract

This present work aims to highlight the phytochemical compounds and the in vitro estimation of the anti-hemolytic activity of the extracts of the aerial part of a medicinal plant: *Spinacia Oleracea* L against hemolysis induced by hypotonia , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and heat. Phytochemistry results show that spinach is rich in tannins, flavonoids, terpenoids, alkaloids and sterols. The saponins were revealed at the level of the chloroform decoction, for the quinones they are present at the level of the aqueous decoction

the anti-hemolytic activity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is positive for all the dilutions of the aqueous decoction with a maximum at the dilution of 25%, the protection rate of which is 27%. The infusion extract diluted to 75% gave good protection of erythrocytes against hypotonic hemolysis (induced by NaCl) with a protection rate of 32.86%. The results of the anti-haemolytic activity in the presence of spinach extracts against heat indicate that whatever the dilutions for all the extracts, at a temperature of 60 C° the anti-haemolysis activity is weak.

Components of *Spinacia Oleracea* extracts could be the main anti-hemolytic constituent. Indeed, the determination of polyphenolic compounds by colorimetric method showed that the aerial part of *Spinacia Oleracea* is very rich in polyphenols and flavonoids. The latter are closely related to the anti-hemolytic activity of spinach expressed by plant extracts

**Keywords:** Spinach ; Extraction; phytochemistry; Anti-hemolytic activity

## المخلص

المركبات الكيميائية النباتية وتقدير النشاط المضاد للانحلال في المختبر لمستخلصات الجزء الجوي من نبات طبي: *Spinacia Oleracea L* ضد انحلال الدم الناجم عن نقص الاسموزية ،  $H_2O_2$  والحرارة. تظهر نتائج الكيمياء النباتية أن السبانخ غنية بالعفص ، والفلافونويد ، والترينويدات ، والقلويدات ، والستيرولات. تم الكشف عن الصابونين على مستوى ديكتيون الكلوروفورم ، بالنسبة للكينونات فهي موجودة على مستوى ديكتيون مائي

يكون النشاط المضاد للانحلال ضد  $H_2O_2$  موجباً لجميع التخفيفات من ديكتيون مائي بحد أقصى عند التخفيف 25% ، ومعدل الحماية منها 27%. أعطى مستخلص التسريب المخفف إلى 75% حماية جيدة لكريات الدم الحمراء ضد انحلال الدم ناقص التوتر (المعرض بواسطة كلوريد الصوديوم) بنسبة حماية 32.86%. تشير نتائج النشاط المضاد للانحلال في وجود مستخلصات السبانخ ضد الحرارة إلى أنه مهما كانت التخفيفات لجميع المستخلصات ، عند درجة حرارة 60 درجة مئوية ، يكون النشاط المضاد لانحلال الدم ضعيفاً.

يمكن أن تكون مكونات مستخلصات *Spinacia Oleracea* هي المكون الرئيسي المضاد للدم. في الواقع ، أظهر تحديد مركبات البوليفينول بطريقة القياس اللوني أن الجزء الجوي من *Spinacia Oleracea* غني جداً بالبوليفينول والفلافونويد. ترتبط هذه الأخيرة ارتباطاً وثيقاً بالنشاط المضاد للانحلال للسبانخ الذي يتم التعبير عنه بواسطة المستخلصات النباتية ؛

**الكلمات المفتاحية:** سبانخ؛ إستخلاص؛ الكيمياء النباتية. نشاط مضاد للدم

## Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

AG : Acide gallique

DO: Densité optique

FeCl<sub>3</sub>: Chlorure de fer

EqAG : Equivalent d'Acide Gallique

EqQ : Equivalent de Quercétine

GR : Globule Rouge

g: Gramme

Hb : Hémoglobine

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

H: Heure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Le peroxyde d'hydrogène

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique

Kg : Kilogrammes

MS: Matière sèche

Min: Minutes

M : Molaire

mg : Milligramme

mm : Millimètre

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonate de sodium

PBS : Phosphate Buffer Salin (tampon phosphate)

PPT: Polyphénols totaux

UV: Ultraviolet



## Liste des tableaux

Tableau I : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique.....	13
Tableau 2. Composition chimique moyenne de l'épinard pour 100 g .....	18
Tableau 3 : Tests phytochimiques des extraits des parties aériennes de l'épinard.....	39
Tableau 4 : Teneurs moyennes en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	46

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Structure de base des flavonoïdes.....	7
<b>Figure 2.</b> Structure de base des poly phénols.....	7
<b>Figure 3.</b> Structure de base d'Alcaloïdes.....	8
<b>Figure 4.</b> <i>Spinacia oleracea</i> L.....	15
<b>Figure 5.</b> Fleurs de l'épinard.....	16
<b>Figure 6.</b> graine de l'épinard.....	17
<b>Figure 7.</b> Présentation de l'épinard.....	26
<b>Figure 8.</b> Partie aérienne de L'épinard séchée .....	27
<b>Figure 9.</b> Poudre végétale.....	27
<b>Figure 10.</b> Protocole de préparation par la décoction aqueuse .....	28
<b>Figure 11.</b> Protocole de préparation de la solution de l'infusion .....	28
<b>Figure 12.</b> Protocole de préparation d'extrait hydro alcoolique par décoction .....	29
<b>Figure 13.</b> Protocole de préparation de l'extrait chloroformique par décoction.....	29
<b>Figure 14.</b> Induction de l'hémolyse par Na Cl sur l'hématocrite à 10% .....	33
<b>Figure 15.</b> Induction de l'hémolyse par la température sur l'hématocrite à 10% .....	34
<b>Figure 16.</b> Induction de l'hémolyse par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur l'hématocrite à 10% .....	34
<b>Figure 17.</b> Schéma de l'effet anti-hémolytique de l'extrait de l'épinard ( <i>Spinacia oleracea</i> L.)..	36
<b>Figure 18.</b> Mise en évidence des flavonoïdes .....	40
<b>Figure 19.</b> Mise en évidence des terpénoïdes . .....	40
<b>Figure 20.</b> Mise en évidence des alcaloïdes .....	40
<b>Figure 21.</b> Mise en évidence des tanins .....	40
<b>Figure 22.</b> Mise en évidence des stérols.....	40
<b>Figure 23.</b> Mise en évidence des quinones.....	40
<b>Figure 24.</b> Mise en évidence des composés réducteurs .....	40
<b>Figure 25.</b> Mise en évidence des saponines .....	40
<b>Figure 26.</b> Mise en évidence des flavonoïdes.....	41

<b>Figure 27.</b> Mise en évidence des terpenoïdes.....	41
<b>Figure 28.</b> Mise en évidence des alcaloïdes.....	41
<b>Figure 29.</b> Mise en évidence des tanins.....	41
<b>Figure 30.</b> Mise en évidence des stérols.....	41
<b>Figure 31.</b> Mise en évidence des quinones.....	41
<b>Figure 32.</b> Mise en évidence des coumarines .....	41
<b>Figure 33.</b> Mise en évidence des saponines.....	41
<b>Figure 34.</b> Mise en évidence des composés réducteurs.....	42
<b>Figure 35.</b> Mise en évidence des composés réducteurs.....	42
<b>Figure 36.</b> Mise en évidence des flavonoïdes.....	42
<b>Figure 37.</b> Mise en évidence des terpenoïdes.....	42
<b>Figure 38.</b> Mise en évidence des alcaloïdes.....	42
<b>Figure 39.</b> Mise en évidence des tanins.....	43
<b>Figure 40.</b> Mise en évidence des coumarines.....	43
<b>Figure 41.</b> Mise en évidence des saponines.....	43
<b>Figure 42.</b> Mise en évidence des stérols.....	43
<b>Figure 43.</b> Mise en évidence des quinones.....	43
<b>Figure 44.</b> Mise en évidence des flavonoïdes .....	44
<b>Figure 45.</b> Mise en évidence des terpenoïdes.....	44
<b>Figure 46.</b> Mise en évidence des alcaloïdes.....	44
<b>Figure 47.</b> Mise en évidence des saponines .....	44
<b>Figure 48.</b> Mise en évidence des stérols.....	44
<b>Figure 49.</b> Mise en évidence des composé réducteurs.....	45
<b>Figure 50.</b> L'hémolyse induite par l'hypotonie .....	48
<b>Figure 51.</b> Hémolyse induite par la température.....	48
<b>Figure 52.</b> Hémolyse induite par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
<b>Figure 53.</b> L'effet protecteur des infusés de l'épinard vis à vis de l'hémolyse hypotonique.....	51
<b>Figure 54.</b> Effet protecteur des décoctés aqueux de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse hypotonique.....	51

<b>Figure 55.</b> Effet protecteur des extraits hydro-alcoolique de l'épinard vis à vis de l'hypotonie (NaCl).....	52
<b>Figure 56.</b> L'effet protecteur des extraits chloroformiques de l'épinard vis à vis de l'hypotonie induite par Na Cl.....	52
<b>Figure 57.</b> L'effet protecteur des infusés de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse induite par H2O2.....	53
<b>Figure 58.</b> . L'effet protecteur des décoctés aqueux de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse induite par H2O2.....	54
<b>Figure 59.</b> L'effet protecteur de l'extrait hydro-alcoolique de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse induite par H2O2.....	54
<b>Figure 60.</b> L'effet protecteur de l'extrait chloroformique de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse induite par H2O2.....	55
<b>Figure 61.</b> Effet protecteur de l'infusé de l'épinard contre la chaleur.....	56
<b>Figure 62.</b> Effet protecteur du décocté de l'épinard contre la chaleur.....	56
<b>Figure 63.</b> Effet protecteur De l'extrait hydro-alcoolique de l'épinard contre la chaleur.....	57
<b>Figure 64.</b> Effet protecteur de l'extrait chloroformique de l'épinard contre la chaleur.....	57

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé	

## Table des Matières

### Partie I. Synthèse bibliographique

#### Chapitre I. Plantes médicinales et phytothérapie

I.I.1 Plantes médicinales.....	4
I.I.1.1. Généralité.....	4
I.I.1.2. Définition.....	4
I.I.1.3. Origine des plantes médicinales.....	5
A. Les Plantes spontanées.....	5
B. Les plantes médicinales cultivées.....	5
I.I.2. Phytothérapie.....	5
I.I.2.1. Généralité.....	5
I.I.2.2. Types de phytothérapie.....	6
I.I.2.3. Phytochimie.....	6
I.I.2.3.1. Métabolite secondaire.....	6
A. Flavonoïde.....	6
B. Composés phénoliques.....	7
C. Alcaloïdes.....	7
I.I.2.3.2. Les extraits de plantes médicinales.....	8
A. Les extraits aqueux.....	8
B. Extrait par solvants éthanoliques ou hydro alcooliques.....	8
C. Extraits glycerinées.....	9
D. Autres formes galéniques des extraits.....	9

## Chapitre II. L'Hémolyse

I.II. I. Définition.....	10
I.II.2. Pathologie.....	10
I.II.2.1. Hyper hémolyse et les maladies associées.....	10
I.II.2.2. Anémies hémolytiques corpusculaires.....	10
I.II.2.3. Anémies hémolytiques non corpusculaire.....	11
I.II.2.4. Anémies résultantes d'une carence nutritionnelle.....	11
I.II.3. Les Anti-hémolytiques.....	12
A. Anti-hémolytiques classiques.....	12
B. Autres anti-hémolytiques.....	12

## Chapitre III. Présentation de L'épinard (*Spinacia oleracea* L.)

I.III .1. Généralité.....	14
I.III .2. Productions.....	14
I.III .3. Classification botanique.....	15
I.III. 4. Description Botanique.....	15
I.III .5. Composition chimique.....	17
I.III. 6. Usage en phytothérapie.....	19
I.III.7. Activités pharmacologiques des épinards.....	20
I.III. 7.1. Activité anti-oxydante.....	20
I.III.7.2. Effets anti-arthrose.....	20
I.III.7.3. Effet anti-inflammatoire.....	21
I.III.7.4. Activité anticancéreuse.....	21
I.III.7.5. Activité hépato-protectrice.....	22
I.III.7.6. Activité anti bactérienne.....	22
I.III.7.7. Effet protecteur contre l'infection COVID-19.....	22
I.III.8. Toxicité.....	23

## **Partie II. Expérimentale**

### **Chapitre I. Matériels et Méthodologies**

II.I. Matériels et Méthodes.....	26
II.I.1. Généralité.....	26
II.I.2. Matériels biologiques.....	26
II.I.3. Matériels de laboratoire.....	27
II.I.4. Méthodologies.....	27
II.I.4.1.Séchage et broyage du matériel vegetal.....	27
II.I.4.2.Préparation des extraits des feuilles de l'épinard.....	28
A. Préparation de la décoction en milieux aqueux.....	28
B. Préparation de tisane par infusion.....	28
C. Décoction en milieu hydro alcoolique (méthanol-eau 70/30).....	28
D. Décoction en milieu chloroformique.....	29
II.I.4.3. Les tests phytochimiques.....	30
A. Les flavonoids.....	30
B. Les terpénoïdes.....	30
C. Les alcaloïdes.....	30
D. Les tanins.....	30
E. Les coumarines.....	30
F. Les sterols.....	30
G. Les quinones.....	30
H. Les saponines.....	30
I. Les composés réducteurs.....	30
J. Dosage des polyphénols totaux.....	30
K. Dosage des flavonoids.....	32
II.I.4.4. Evaluation de l'activité anti-hémolytique de <i>Spinacia oleracea</i> L.....	32
A. Préparation de suspension érythrocytaire.....	33
B. Induction de l'hémolyse induite vitro.....	33
C. Effet protecteur (anti-hémolytique) de l'extrait vis-à-vis d'un stress hypotonique.....	35

D. Effet protecteur (anti-hémolytique) de l'extrait végétal vis-à-vis de l'hémolyse induite par.....	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	36

## **Chapitre II. Résultats et interprétations**

II. Résultats et Interprétations.....	39
II.I. Résultats et interprétations des tests phytochimiques.....	39
II.I.1. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveaux de l'extrait chloroformique..	40
II.I.2. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des infuses.....	41
II.I.3. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des décoctés aqueux.....	42
II.I.4. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des extraits hydro-alcooliques... .....	44
Interprétations.....	45
II.I.5. Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoids.....	46
II. 2. Résultats de l'activité anti-hémolytique.....	47
II. 2.1. Résultats de l'activité hémolytique induite par hypotonie, substance chimique et la chaleur.....	47
II. 2.2. Résultats de l'effet protecteur des extraits de l'épinard.....	49
A. Résultats de l'effet protecteur des extraits contre l'hypotonie.....	49
B. Résultats de l'effet protecteur des extraits contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
C. Résultats de l'effet protecteur des extraits de l'épinard contre la thermo-hémolyse.....	55
Discussion générale.....	59
Conclusion générale.....	62
Références bibliographiques.....	64
Annexe.	



# *Introduction*

## Introduction

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

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique, aujourd'hui les études scientifiques s'accroissent et approuvent leur efficacité et leur bienfaits incontestables pour notre santé. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**Lhuillier, 2007 ; Ghnimi, 2015**).

L'épinard est un légume important en raison de ses minéraux, protéines, vitamines A, B, C, antioxydant et potentiel d'absorption le plus élevé des radicaux oxygène. Cette plante a été recommandée en médecine traditionnelle pour les personnes atteintes d'anémie.

Dans cet axe de recherche globale sur la plante douée de propriétés thérapeutiques s'insère l'objectif de notre thème de mémoire est l'évaluation du pouvoir anti-hémolytique des parties aériennes de l'épinard d'une espèce de *Spinacia oleacera* L récoltée dans la région de Mostaganem. Les différents extraits des feuilles et de tiges de l'épinard ont été testés pour leur potentiel anti-hémolytique in vitro, en évaluant leur capacité à stabiliser l'intégrité des érythrocytes contre l'hémolyse induite expérimentalement.

Notre mémoire est structuré en deux parties :

✓ La première partie propose une mise au point bibliographique concernant les plantes médicinales et phytothérapie, une présentation de la plante étudiée (*S. Oleacera*) et finalement quelques notions sur hémolyse.

✓ La deuxième partie expérimentale ou nous avons réalisé comme premier chapitre, matériels et méthodologie, nous rapportons aussi l'évaluation de l'effet anti-hémolytique de cette plante médicinale vis-à-vis les globules rouges, en présence des facteurs hémolysants

✓ Le deuxième chapitre présentera les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale

**Partie 1.**

***Analyse bibliographique***

## Chapitre I. Plantes médicinales et phytothérapie

### I.I.1 Plantes médicinales

#### I.I.1.1 Généralité

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux de tête et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (**Tabuti, 2003**).

en Afrique, les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales, où plus de 80% de cette population s'en sert pour assurer les soins de santé en l'absence d'un système médical moderne(**Jiofack, 2010**).Malgré la place large qu'occupe la médecine moderne dans le monde, les soins primaires de la majorité des gens sont constitués par une médecine traditionnelle omniprésente dans la culture populaire (**Selles, 2012**). La médecine traditionnelle arabe est issue de deux courants majeurs; l'un, ayant reçu les influences des médecines indiennes et mésopotamiennes, l'autre, appelé la Médecine du Prophète. Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4 000 ans qui furent les premiers à tirer profit du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. Plus tard, la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas été les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates en particulier et les plantes médicinales en général (**Selles, 2012**).

#### I.I.1.2. Définition

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Chabrier, 2010**).

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est -à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Chabrier, 2010**)

### **I.I.1.3. Origine des plantes médicinales**

Elle porte sur deux origines à la fois. En premier lieu les plantes spontanées dites "sauvages" ou "de cueillette", puis en second les plantes cultivées.

#### **A. Les Plantes spontanées**

Elles furent les seules utilisées autrefois et représentent encore aujourd'hui un pourcentage notable du marché. Leur répartition dépend du sol et surtout du climat. Nous pouvons répertorier les principaux facteurs influençant leur développement ci-après. Les plantules se développent efficacement et naturellement dans le sol qui leur est le plus favorable. Aussi les conditions climatiques exercent une part importante sur la répartition des plantes médicinales. C'est en fait un ensemble de plusieurs facteurs qui constitue le climat et ceux-ci vont donc permettre un développement plus ou moins poussé de la plante jeune (**Chabrier, 2010**).

#### **B. Les plantes médicinales cultivées**

Les plantes médicinales sont cultivées pour plusieurs avantages en effet évidents:

- Disponibilité des plantes sans besoin d'aller dans la forêt pour détruire les espèces.
- Apports substantiels de revenus pour les paysans qui les cultivent.
- Disponibilité prévisible des plantes médicinales au moment voulu et en quantité voulue.
- Disponibilité et protection des plantes actuellement rares ou en voie de disparition dans la nature.

## **I.I.2 phytothérapie**

### **I.I.2.1. Généralité**

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phyto et thérapie qui signifie respectivement "plante" et "traitement » (**Wichtl M., Anton R., 2003**). La phytothérapie est donc une thérapeutique destinée à traiter certains troubles fonctionnels et certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes et de préparations à base de plantes (**Limonier S., 2018**).

La phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes dite plantes médicinales qui ont définies comme une " drogue végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ". Une drogue végétale est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (**Mohammedi, 2013**).

### **I.I.2.2 Types de phytothérapie**

On peut distinguer deux types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle par fois ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement c'est une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays.

- La pratique basée sur les avancées scientifiques et les recherches des principes actifs des plantes (phytochimies), cette phytothérapie assimilée aux médicaments. (**Moutsie et Fonteneau, 2008**).

### **I.I.2.3. phytochimie**

#### **I.I.2.3.1. Métabolite secondaire**

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (**Epifano .,Genovese , Menghini , Curini ,2007** ).

On appelle métabolite secondaire des composés bio synthétisés naturellement par les végétaux, qui ne participent pas directement à son développement. Ces métabolites sont responsables des fonctions périphériques essentielles à la survie de la plante (**SensriKh. El BAR., Z. 2017**).

#### **A. Flavonoïde**

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (**Yaoet al. 2004**).

Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux. Actuellement, environ de 4000 composés flavonoïdes sont connus (**Edenharder R., GrünhageD.(2003)**) .

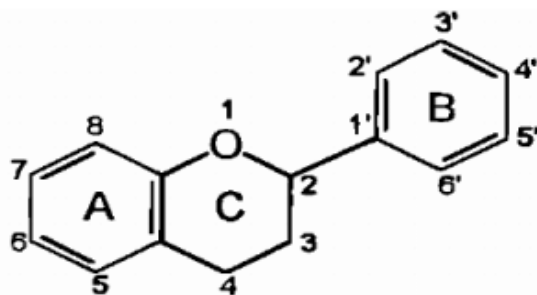


Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes.

### B. Composés phénoliques :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton,1993**).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie de molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga , Leighton ,2000**)

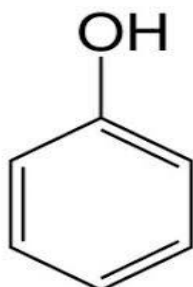


Figure 2 : Structure de base des poly phénols.

### C. Alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Sensri Kh. El BAR., Z. 2017.**). Ils représentent le groupe de substances naturelles d'intérêt thérapeutique le plus importante, en termes de nombre, de diversité structurale et de leurs activités pharmacologiques. Ils sont au coeur des phénomènes d'adaptation et de défense face aux pressions biotique (herbivore microorganisme) ( **Cherief W., & Messaoudene N.**)



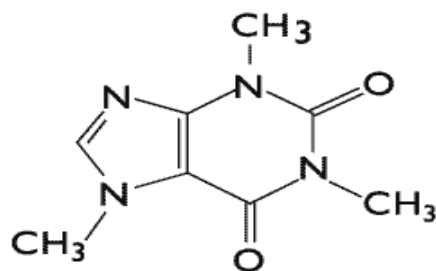


Figure 3 : Structure de base d'Alcaloïdes.

### I.I.2.3.2. Les extraits de plantes médicinales

#### A. Les extraits aqueux

\* **Les tisanes** : regroupent les infusions et les décoctions

- **Infusion** : C'est la méthode la plus utilisée en France. Elle consiste à recouvrir la drogue fragmentée d'eau potable bouillante et à laisser refroidir. Il existe autant de modes opératoires que d'ouvrages de phytothérapie traitant du sujet ( **Wichtl M., Anton R.2003**).L'infusion convient aux drogues fragiles étaux drogues riches en huiles essentielles (Pharmacopée française Xème édition). Le temps d'infusion est variable selon les plantes (de quelques minutes à 1 heure) (**Nogaret-Ehrhart, 2003**).

- **La décoction** : convient aux parties ligneuses de la plante comme les tiges, les racines et l'écorce. Il s'agit ici de plonger les parties de plante sèche à froid dans de l'eau et de porter le tout à ébullition pendant 10 minutes à 1h en fonction des plantes (**Potel, 2002**).

\* **La macération** : Il s'agit d'un processus d'extraction à température ambiante (15-20C°) le liquide employé peut être l'eau, alcool, parfois le vie le temps de macération dépend des propriétés intrinsèques de la plante la macération à l'eau ne doit pas se prolonger trop long temps pour éviter tout risque de fermentation ou de moisissure (**Potel, 2002**).

#### B Extrait par solvant éthanoïques ou hydro alcooliques

\* **Les teintures** : Sont des préparations alcooliques résultant d'un traitement extractif exercé par alcool éthylique sur les drogues sèches. On les prépare par macération (drogue+ solvant à froid) ; par lixiviation (passage plus ou moins rapide du solvant froid ou chaud à travers la poudre végétale). Les teintures correspondent au 1/5e de leur poids de drogue sèche (sauf les teintures héroïques qui sont au 1/10e). (**Odile , 2011**)

\* **Les teintures mères** : Actuellement, sont utilisés les teintures mères homéopathiques préparées à partir de drogues fraîches par macération 10 jours minimum (**selon la pharmacopée européenne**) dans de l'éthanol de titre différent selon les plantes (45 à 65° en général). Elles correspondent au 1/10e de leur poids de plante sèche (il faut donc tenir compte du degré de déshydratation de la plante).

\* **Les alcoolatures** : Ce sont des préparations résultant de l'épuisement par l'alcool des drogues fraîches. Les proportions employées sont à parties égales en poids de plantes fraîches et d'alcool à titre élevé. Les plantes fraîches sont mises à macérer pendant huit jours avec l'alcool dans un récipient clos. Après une compression on passe à une filtration. (**Fouchet et al, 2000**)

\* **Les suspensions intégrales de plantes fraîches (SIPF)** : Sont des cryobroyats composés de drogue fraîche suspension dans une solution hydro alcoolique. Elles sont obtenues à partir de la totalité de la drogue fraîche par un procédé original qui permet le blocage des réactions enzymatiques évitant ainsi tout risque de modification, ou dégradation des principes actifs. Il est indispensable de les diluer afin de débloquent les réactions enzymatiques et de diminuer le titre alcoolique (**Fouchet et al, 2000**)

### C. Extraits glycinés

La plante fraîche est cryobroyée puis les principes actifs hydrosolubles isolés par extractions successives dans l'eau et l'alcool de degré croissant. L'alcool est évaporé sous vide puis le résidu sec est mis en suspension dans le glycérol (**Bertrand, 2010**).

### D. Autres formes galéniques des extraits

Selon **Cazau-Beyret Nelly (2013)** plusieurs formes de préparations d'extraits peuvent être mises en œuvre pour l'obtention d'effet thérapeutique à partir d'une plante dont parmi :

\* **Les extraits secs pulvérulents** : Leur préparation se fait en trois phases : l'extraction des principes actifs (PA) par macération ou lixiviation dans l'eau ou l'alcool, La filtration et la concentration et en fin l'élimination du solvant par séchage.

\* **La poudre de plante** : Obtenue par simple broyage de la plante sèche, elle conserve le totum de la plante. Des gélules peuvent être fabriquées avec cette poudre.

## Chapitre II. L'Hémolytique

### I.II. I. Définition

L'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu cellulaire notamment l'hémoglobine (Hb). Le degré d'hémolyse peut être régulé soit par :

- \* Des facteurs intracellulaires qui peuvent être : l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine.
- \* Des facteurs extracellulaires : tels que le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononuclé phagocytaire (macrophages, monocytes et leurs cellules souches) (**Aguilar, 2007**). On peut distinguer deux types d'hémolyses, l'une est physiologique et l'autre est pathologique (hyper hémolyse) (**Lippi et al., 2011**).

### I.II.2. Pathologie

#### I.II.2.1. Hyper hémolyse et les maladies associées

L'hyper hémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des GR qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des hématies ou à un raccourcissement de leur durée de vie. Il peut se dérouler dans les vaisseaux (intra vasculaire) . L'hémoglobine libérée se lie alors à l'haptoglobine. Comme, il peut se manifester hors des vaisseaux (extravasculaires), notamment au niveau de la rate (**Béraud, 2014**). L'hyper hémolyse peut se produire par l'introduction d'agents chimiques tel que certains médicaments, capables de modifier l'intégrité cellulaire en induisant une réorganisation et des changements morphologiques qui résultent d'une cascade d'effets à partir de l'altération de la membrane lipidique conduisant finalement à la formation de sphéricités et par conséquent à la lyse des érythrocytes. (**Portier et al., 2007 ; Manaargadoo-Catin et al., 2016**). Un déséquilibre dans les proportions des radicaux libres générés et le répertoire antioxydant inhérent au système explique la diminution de la durée de vie des globules rouges pendant de nombreuses pathologies hyper hémolytiques (**Hebanni et al., 2014**)

#### I.II.2.2. Anémies hémolytiques corpusculaires

L'hémolyse pathologique se traduit souvent par des anémies hémolytiques. Ce sont des anémies congénitales par anomalies héréditaires des hématies qui peuvent affecter

➤ **La membrane des hématies** : Anomalies de structure des protéines membranaires telles que l'Anykrine et la protéine 3, conduisant au dysfonctionnement des ATP ase membranaires et à une augmentation de la perméabilité aux ions Na<sup>+</sup> (sphérocytose, stomatocytose).

➤ **L'Hémoglobine** : Ces anomalie qui causent les hémoglobinopathies, Peuvent être soit constitutionnelles de la synthèse de globine (diminution ou absence de la synthèse des chaines de globines CAS des  $\alpha$  ET  $\beta$  thalassémie) ou constitutionnelles de la structure de globine (CAS de la drépanocytose). Comme, elles peuvent être des anomalies acquises de la molécule d'hémoglobine, c'est le cas de la méthémoglobine qui est congénitale ou acquise, la forme acquise provient d'une exposition aux toxiques ou aux agents oxydants.

➤ **Les enzymes**: Il existe plusieurs formes de déficiences d'enzymes (enzymopathies) pouvant causer l'anémie hémolytique, la plus courante est la déficience en une enzyme nommée glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), un déficit de cet enzyme provoque un déficit en NADPH qui se répercute sur la régénération du glutathion réduit et par conséquent sur l'activité du glutathion peroxydase au niveau du globule rouge, ce déficit se traduit par un défaut des peroxydes, a l'état basale, cette anomalie est bien supportée mais la prise de facteurs déclenchant (agents chimiques ou certains médicaments anti inflammatoires) déclenche des crises hémolytiques.(Béraud, 2014)

### I.II.2.3. Anémies hémolytiques non corpusculaire

L'hémolyse est induite par une destruction directe des hématies après leur altération. Ces anémies correspondent à des maladies acquises, telles que les anémies hémolytiques immunologiques et toxiques qui sont la conséquence de l'action de divers produits toxiques comme certains médicaments.

### I.II.2.4. Anémies résultantes d'une carence nutritionnelle

➤ **Anémie ferriprive** : C'est la plus fréquente des anémies, l'anémie par carence martiale se développe par stades, au cours de la première étape, les besoins en fer sont supérieurs aux apports ce qui provoque l'épuisement progressif des réserves de fer dans la moelle osseuse, à mesure que les stocks diminuent, l'absorption du fer alimentaire augmente au cours des étapes ultérieures, la carence altère la synthèse des globules rouges, puis finit par provoquer une anémie. (Béraud, 2014).

➤ **Anémie par manque en vitamine B12 et en acide folique** : Cette anémie est particulièrement courante chez les personnes âgées (plus de 75 ans). Elle est provoquée plutôt

par un trouble d'absorption de la vitamine B12 au niveau intestinal qu'à une carence alimentaire (car les réserves sont importantes). Une carence en vitamine B12 et en acide folique affecte la moelle osseuse et est responsable d'une anémie macrocytaire mégalo-blastique (les globules rouges sont plus grand que la normale) (**Béraud, 2014**).

### **I.II.3. Les Anti-hémolytiques**

#### **A- Anti-hémolytiques classiques**

L'anémie hémolytique est un sujet relativement complexe qui demande obligatoirement une investigation spécialisée pour déterminer des traitements appropriés, il y a autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de substances synthétiques anti-hémolytiques qui réduit l'hyper-hémolyse, sont disponibles. Le choix du traitement se porte notamment sur la prescription de fer, de vitamine B12 et d'acide folique. (**Federici et al., 2007 ; Leporrier, 2008**).

➤ **Le fer** : Le rôle physiologique du fer est la synthèse de l'hème dans la mitochondrie. Le  $Fe^{2+}$  et la protoporphyrine vont donner l'hème, qui passe alors dans le cytoplasme. L'hème ensuite s'associe aux sous unités de globine  $\alpha$  et  $\beta$  pour former l'hémoglobine. Quand l'équilibre en fer est rompu (manque d'apport ou pertes élevées), l'organisme fait appel aux stocks de ferritine et d'hémosidérine. Lorsque ces stocks sont épuisés, on observe alors une diminution du fer plasmique ; l'érythropoïèse est ralentie, les érythroblastes s'appauvrissent en granules ferrugineux et les sidérolites disparaissent progressivement, l'anémie s'installe.

➤ **La vitamine B12 et B9 (cobalamine et acide folique)** : Ces deux vitamines dites anti mégalo-blastiques sont indispensables à la physiologie de l'hématopoïèse. En cas de carence de l'une de ces deux vitamines une hématopoïèse inefficace s'installe aboutissant à un état pathologique nommé « anémie mégalo-blastique » où les taux sanguins de plaquettes, de globules blancs et des globules rouges seront diminués. La conséquence commune aux modes d'action de la vitamine B12 et des folâtrés est d'intervenir au niveau cellulaire dans la synthèse de l'ADN, une carence de ces vitamines se traduira par un trouble cellulaire très particulier dans lequel la division cellulaire (ADN) sera affectée (**Dubost et Dupuis, 2011**).

#### **B .Autres anti-hémolytiques**

L'étude et la recherche de substances anti-hémolytiques d'origine végétale est en plein essor. En effet, des études entrepris ont montrés que les plantes constituent un réservoir de substances

à potentiel anti-hémolytique dont les mécanismes d'action restent dans l'ensemble à déterminer. Quelques exemples en sont cités dans le tableau (1)

**Tableau 1:** Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique

Matrice végétale	Tests utilisés	Effets	Références
Fleur de <i>Albutinus indicum</i>	Hémolyse induite par Na Cl	Activité Anti-hémolytique :70,24% à 1mg/ml d'extrait	Vidhya et Shobana, 2016
Feuilles, tige, fleur de <i>Gymnemas ylvestre</i>	Hémolyse induite par le H2O2	Activité anti hémolytique :IC50=29,83 g/ml	(James et Alewo 2014)
Fleur de <i>Cassia auriculata</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Activité Anti-hémolytique :64% à 500µg/ml d'extrait	(Rani et al.,2014)
Extrait de <i>Annona muricata</i>	Hémolyse par TritonX100	Activité Anti-hémolytique :85,7% à500 µg/ml d'extrait	(Muthu et Duraira, 2015)
Extraits de <i>Oryza sativa</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Effet Anti-hémolytique :63,77% à 500µg/ml	(Rahman, Eswaraiah et al., 2015)
Fruit de <i>Persea americana</i>	Hémolyse induite par le H2O2	Effet anti hémolytique IC50=0,0422mg/ml	( Nabavi et al.,2013)
Feuilles de <i>Piber betel</i>	Hémolyse induite par le H2O2	Activité Anti-hémolytique : 40.6% pour une concentration de 5mg/ml	(Chakraborty et Shah , 2011)

## Chapitre III.

### Présentation de L'épinard (*Spinacia oleracea* L.)

#### I.III.1. Généralité

L'épinard est un légume à feuilles vertes foncées originaire d'Iran. Il a d'abord été introduit en Chine au milieu du VII<sup>ème</sup> siècle. Ensuite en Europe dès le XII<sup>ème</sup> siècle. Dès le XIV<sup>ème</sup> siècle, l'épinard devient une culture maraîchère courante, il a quitté toutes les zones de culture pour être maintenant intégré dans toutes les flores actuelles comme espèce adaptée spontanée (**Diogon, 2002**)

L'épinard (*Spinacia oleracea* L.) est une plante herbacée annuelle, aujourd'hui cultivée dans toutes les régions tempérées du monde (**Munro et Small, 1998**). La plante d'épinards présente sous la forme d'une rosette, quand il est à l'état végétatif, avec des feuilles nettement pétiolées. Au moment de la floraison, il présente une hampe florale feuillée qui porte soit des fleurs femelles, soit des fleurs mâles : c'est une plante **dioïque** (**Diogon, 2002**). Les feuilles peuvent être froissées (cloquées), aplaties, fripées, semi-froissées ou lisses. Les graines d'épinard sont des fruits à une seule graine (**Munro et Small, 1998**). Sa racine pivotante est pourvue de nombreuses radicelles qui colonisent le sol latéralement, et peut descendre jusqu'à 45 cm de profondeur (**Chaux et Foury, 1994**).

#### I.III.2. Production

La production mondiale d'épinard est dominée par la Chine (76% des volumes) suivie de l'Indonésie, du Japon, de la Turquie et des Etats-Unis (**FAO, 2006**). Au niveau de la communauté européenne, la production totale de l'épinard cultivé est d'environ 400 000 tonnes. L'Italie occupe la première place avec 94 000 tonnes (environ 24%) ; suivie de la France avec 94 000 (environ 21%). Les autres principaux producteurs sont l'Espagne (54 000 tonnes, soit 14%), les Pays-Bas (51 000 tonnes, soit 13%), la Grèce (42 000 tonnes, soit 10%), la RFA (38 000 tonnes, soit 9%) et la Belgique (31 000 tonnes, soit 8%).

On distingue généralement deux types de production :

L'épinard de printemps et l'épinard d'automne. Auxquels s'ajoute une production minime d'été. En France, le commerce extérieur de l'épinard frais est marginal, en revanche, les échanges en sur gelés sont importants et très déficitaires. Dans la production commerciale, l'épinard se cultive pour les besoins du marché local, en vue de la mise en conserve et de la congélation (Munro et Small, 1998).

### I.III. 3. Classification botanique

L'épinard (*Spinacia oleracea* L.) est une plante cultivée de la famille des Chénopodiacées dont le cycle de développement est annuel. Le genre *Spinacia* comprend quatre espèces herbacées annuelles originaires de l'Asie du sud-ouest (Munro et Small, 1998). La répartition actuelle de l'épinard est essentiellement due à l'activité humaine et à son utilisation agronomique (Diogon, 2002). Sa classification botanique est la suivante :

**Règne :** Métaphytes

**Embranchement :** Spermatophytes

**Sous Embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Ordre :** Chenopodiales

**Famille :** Chenopodiaceae

**Genre :** *Spinacia*

**Espèce :** *Spinacia oleracea* L.



**Figure 4 :** *Spinacia oleracea* L

### I.III.4. Description Botanique

- **Cycle :** Annuelle.

- **Type :** Potagère.

- **Tige :** Dressée de 30 à 60 cm de haut, ronde, lisse, sifflée, succulente, parfois rougeâtre.

- **Feuilles :** Alternatives, les inférieures très longues pétiolées, diversement lobées avec des



lobes de forme triangulaire aiguë, lisses des deux côtés (Fujita et al., 2017).

**- Fleurs :**

→ **Fleurs mâles:** Sur les longues épines terminales du glomérat et sur les plus courtes de la tige axiale, très nombreuses, sessiles, calice à 4 parties, étamine 4, anthères jumelles, très grandes.

→ **Fleurs femelle:** Axillaires, sessiles, surpeuplées, calice à 2 pointes avec une corne en saillie de chaque côté, se transformant en épines lorsque la graine est mûre, effilés en blanc. Capsule à 1 cellule, 1 valve, armée, avec 2 cornes courtes opposées, et couronné du petit calice restant contient un ovaire sur un périanthe globuleux avec 2-4 dents au sommet.

**- Fruits :** ils sont composés de deux pointes divergentes et lisses.    **- Graines :** Verticale



**Figure 5 :** Fleurs de l'épinard (Verma, 2018).



**Figure 6** : graines de l'épinard

### **I.III .5. Composition chimique**

L'épinard est une excellente source de vitamines, de minéraux et des antioxydants. Il se distingue par une teneur élevée en  $\beta$ - carotène, acide folique, vitamine C, calcium, ions phosphore, sodium et potassium (Nonnicke, 1989; Dicoteau, 2000 In Prohens et Nuez ,2008). Avec un apport de 25 calories soit 105 joules aux 100 g, l'épinard fait partie des légumes frais les moins énergétiques. Il est en effet riche en eau (plus de 90%), et ne renferme, de ce fait, qu'une quantité limitée de substances énergétiques :

-Un peu plus de 3g de glucides aux 100g. Il est constitué, comme dans la plupart des légumes-feuilles, par une majorité de sucres peu courants : pentanes et hexoses, et dans une moindre proportion par du saccharose, du glucose et du fructose.

-Environ 2,4 g de protides. Abondants pour un légume frais, ils possèdent une valeur biologique satisfaisante : tous les acides aminés essentiels sont présents (avec néanmoins un léger déficit en tyrosine) .

- 0,3 g de lipides seulement. Présentes à l'état de traces. Mais on peut noter qu'ils ont pour constituant, en proportion intéressante, un acide gras relativement rare dans l'alimentation, l'acide linoléique : l'épinard en apporte 89 mg aux 100 g.

L'épinard fournit une quantité intéressante de minéraux (plus de 1,5 g aux 100 g), très diversement représentés. Le potassium arrive largement en tête. Le calcium atteint des valeurs élevées, de même que sodium, le fer et en magnésium. On y trouve aussi de très nombreux oligo-éléments, en particulier du sélénium, du cuivre, du zinc, de l'iode, etc. Les taux de plusieurs vitamines sont remarquablement élevés : la provitamine A (carotène), vitamine C, vitamine B9. Les autres vitamines du groupe B présentent en quantité appréciables, de même que la vitamine E et la vitamine K. Les fibres de l'épinard sont abondantes (4%), constituées en majorité par des celluloses et des hémicelluloses, qui forme des membranes cellulaires du végétale. La composition moyenne de l'Épinard est représentée dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Composition chimique moyenne de l'épinard pour 100 g net  
(Dupin et al., 1992).

Composés énergétiques (g)		Variations possibles	
Glucides 3,2		2,4 - 3,7	
Protides 2,4		2,3 - 2,5	
Lipides 0,30		0,3 - 0,4	
Eau 91,60		90 - 92	
Fibres alimentaires 4			
Apport énergétique 25 kcal			
Minéraux (mg)	Variations possibles (mg)	Vitamines (mg)	Variations possibles (mg)
Potassium 500	470-742	Provitamine A 4	2-9
Calcium 130	80-190	Vitamine C 50	15-120
Sodium 65	40-100	Vitamine B1 0,15	0,07-0,20
Magnésium 58	39-88	Vitamine B2 0,23	0,18-0,33
Phosphore 55	37-70	Vitamine B5 0,25	0,19-0,31
Chlore 54	32-76	Vitamine B6 0,22	0,18-0,31
Fer 4	2,8-6,6	Vitamine PP 0,60	0,4-1,7
Manganèse 0,76		Vitamine B9 0,14	0,08-0,20
Zinc 0,50	0,4-0,6	Vitamine E 0,35	
Cuivre 0,18	0,12-0,26		
Fluor 0,11			
Nickel 0,023			
Iode 0,020			
Sélénium 0,018			
Chrome 0,005			
Cobalt 0,002			
Bore 0,001			

### I.III. 6. Usage en phytothérapie

Grâce à son complexe riche en vitamines et minéraux, les feuilles vertes ont un effet bénéfique sur tous les systèmes corporels. **(Lacoste ,2014)**

- La vitamine A dans les verts améliore l'état de la peau, des cheveux et favorise le développement de l'immunité.
- La vitamine B2 contribue à augmenter la sensibilité à la lumière des yeux et améliore la sensibilité des analyseurs visuels aux nuances de couleur. Le manque de cette vitamine entraîne des problèmes de muqueuses et de peau.
- Une carence en acide folique entraîne une inhibition du développement et de la division des cellules tissulaires en raison d'une altération de la synthèse des protéines et des acides nucléiques.
- Les réactions redox, dans lesquelles l'acide ascorbique est impliqué, améliorent le fonctionnement du système immunitaire. La vitamine C améliore l'état des vaisseaux sanguins et des capillaires, prévenant la fragilité et la fragilité.
- Les propriétés anti-oxydantes de la vitamine E aident à stabiliser les membranes cellulaires. Le tocophérol est essentiel au fonctionnement normal du muscle cardiaque. Avec son manque, une hémolyse des érythrocytes et le développement de maladies du système neurologique sont possibles.
- L'anti-coagulant vitamine K est responsable de la régulation de la coagulation sanguine.
- Le potassium, étant un ion intracellulaire, est impliqué dans la normalisation de la pression artérielle et la conduction de l'influx nerveux.
- Le silicium améliore la synthèse du collagène en tant que composant de la structure glycosaminoglycane.
- Le fer contenu dans les épinards est l'un des constituants des protéines et des enzymes. L'oligo-élément régule les réactions redox et est impliqué dans le transport de l'oxygène et des électrons.

- Le manganèse fait partie des enzymes et des protéines impliquées dans les processus métaboliques des acides aminés.

Les scientifiques ont découvert que les épinards peuvent être utilisés pour prévenir le cancer. La composition chimique et vitaminique unique des feuilles améliore les défenses immunitaires du corps contre les cellules cancéreuses (**De vogel et al., 2005**)

### **I.III.7. Activités pharmacologiques des épinards**

#### **I.III. 7.1. Activité anti-oxydante**

**Rao et al., (2015)** ont comparé l'effet des feuilles fraîches et séchées en référence à la phyto-constituants, il n'y a eu aucun changement des constituants phytochimiques présents dans les produits frais et séchés des feuilles de l'épinards. L'effet anti-inflammatoire, laxatif et la propriété anti oxydante peut être due à la présence des glycosides tels que les coumarines, les anthroquinones, stéroïdes et flavonoïdes, respectivement. La teneur de la perte d'eau au séchage n'a aucun effet sur l'extraction valeurs des feuilles et des phyto-constituants. Alors les feuilles séchées peuvent être utilisées pour ses valeurs médicinales et peuvent être stocké jusqu'à son utilisation. Les propriétés anti oxydantes et stabilité des polyphénols d'épinards évaluée par **SUN et al., (2018)**, par deux méthodes communes, l'activité d'élimination des radicaux diphenyl-2- picrylhydrazyle et le pouvoir anti oxydant ferrique réducteur. Les résultats ont démontré que le polyphénol d'épinards avait une certaine activité anti-oxydante et sa capacité anti oxydante augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'échantillon. Le pH, la température, la lumière et les conservateurs, ont des effets différents sur leur stabilité antioxydante.

#### **I.III.7.2. Effets anti-arthrose**

Les feuilles d'épinards étaient utilisées traditionnellement, médicament pour les douleurs articulaires surtout pour l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. L'effet anti ostéoarthritiques et chondro-protecteurs des extrait d'épinards évalué chimiquement sur l'arthrose. Les résultats ont indiqué que l'extrait d'épinards agit comme un agent puissant antioxydant et un anti-inflammatoire (**Rao et al., 2015**). L'effet anti-arthrosique de l'extrait éthanolique de *S. oléracea* (SOE) a été évalué en in vivo par une injection intra-rotulienne d'iodoacétate monosodique (MIA) au niveau de l'articulation du genou induite par l'arthrose chez le rat, qui ressemble à l'arthrose observée chez l'homme dans la région du genou, où il y a une augmentation de l'inflammation et de la génération de radicaux libres. Les résultats ont indiqué que le traitement

par SOE évite la dégradation de la matrice extracellulaire et des composants des chondrocytes dans une région .L'extrait méthanolique d'épinards a été soumis à un test de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour détecter les flavonoïdes. Cet extrait a été utilisé pour évaluer l'effet de suppression de la satiété chez les rats femelles sprague dawley ayant accès à un régime alimentaire normal. L'effet du traitement SOE a été déterminé en surveillant chaque jour les changements de poids corporel, de prise alimentaire totale et de taux de glucose. fluoxétine est un médicament standard utilisé pour induire la satiété. Le traitement par SOE a montré une inhibition significative de la réduction de la prise de poids et de la prise alimentaire chez les animaux ce qui indique sa capacité de produire une atteinte de la satiété (**Panda et Shinde, 2017**).

#### **I.III.7.3. Effet anti-inflammatoire**

L'inflammation est une réponse immunitaire naturelle à un traumatisme ou à une infection. Les thérapies pharmacologiques actuelles contre l'inflammation efficaces, mais sont aussi associés à des effets secondaires indésirables (par exemple, vomissements, nausées, constipation et vertiges).Les propriétés anti-inflammatoires des épinards ont été évaluées chez plusieurs modèles des animaux. Un extrait méthanolique d'épinards peut améliorer les niveaux d'homocystéine (HCY), de paraoxonase (PON), de lécithine cholestérol acétyl transférase (LCAT), de protéine C-réactive (CRP) et de myéloperoxydase (MPO) dans l'inflammation induite par l'isoprotérénol chez les rats albinos mâles wistar, il provoque une activité protectrice de l'extrait due à la présence de composés bioactifs, comme la quercétine, la coumarine, la lutéine et la lutéoline et aussi il possédait un puissant effet anti-inflammatoire empêchant l'expression plus élevée de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1b (IL-1b) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) via l'activation du facteur nucléaire kappa-chaîne lumineuse amplificateur de la voie des cellules «B» activées (NF-kB) (**Vutharadhi et al., 2017**).

#### **I.III.7.4. Activité anticancéreuse**

Les régimes pauvres en légumes verts et riches en viande rouge sont associés à un risque accru de cancer du côlon. Dans des études sur les rats, l'hème alimentaire a induit une cytotoxicité colique et une hyper prolifération compensatoire des cellules épithéliales coliques qui ont augmenté les mutations endogènes et le risque de cancer du côlon. La chlorophylle dans les épinards pourrait empêcher la solubilisation de l'hème par la compétition de la liaison des

surfactants et des acides biliaires dans l'intestin grêle proximal. La chlorophylle aurait la capacité d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses humaines (De vogel *et al.*, 2005)

#### **I.III.7.5. Activité hépato-protectrice**

**Gupta et Singh, (2006)** ont utilisé un extrait alcoolique (SE) contre l'hépatosuppression induite par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>). Cela a été évalué par les marqueurs d'enzymes sériques, bilirubine sérique totale et niveaux de protéines totales avec des antioxydants hépatiques, acide ascorbique (vitamine c),  $\beta$ -carotène et enzyme du cytochrome P-450, alors que le LPO a été surveillé à la fois dans le sérum et le foie. Les résultats montrent que le potentiel hépato protecteur de *S. oléacea* contre l'hépatosuppression est un mécanisme lié à sa capacité de bloquer la bio activation CCl<sub>4</sub> par l'intermédiaire de P-450 par le biais d'inhibiteurs sélectifs des espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, *S. oléacea*, montrant une protection dans le foie, peut s'avérer une riche source d'antioxydants (**Gupta et Singh, 2006**).

#### **I.III.7.6. Activité anti bactérienne**

**Altemimi *et al.*, (2017)** montrent que l'extrait méthanolique de feuilles d'épinards fraîches lavées et coupées en petits morceaux a révélé une efficacité plus élevée contre les bactéries Gram-positives que les bactéries Gram-négatives. **Alborzi *et al.*, (2018)** a analysé l'efficacité de l'acide benzoïque et de l'acide éthylènediamine tétra acétique (EDTA) dans les feuilles non inoculées et les feuilles d'épinards inoculées avec *E. coli*, entre autres tests. Les auteurs ont déclaré que les réactifs mentionnés étaient capables d'empêcher la contamination croisée entre les feuilles inoculées et non inoculées. **Bahare *et al.*, (2019)** ont attribué l'activité antimicrobienne de l'extrait aux composés présents dans sa composition (défensives, flavonoïdes et composés phénoliques), qui peuvent endommager la paroi cellulaire bactérienne. Néanmoins, les auteurs n'ont pas signalé de corrélation entre l'activité antibactérienne des extraits et leur composition phytochimique

#### **I.III.7.7. Effets antidiabétiques**

L'activité antidiabétique des épinards due à la présence de kaempférol, quercitrine, apigénine et lutéoline, il est rapportée que les flavonoïdes constituent les principes biologiques actifs de la plupart des plantes médicinales hypoglycémiques et propriétés antidiabétiques (**Verma, 2018**)

#### **I.III.7.8. Effet protecteur contre l'infection COVID-19**

Les épinards sont de riches sources de protéines, de graisses, de glucides, de minéraux, d'antioxydants, de fibres et d'eau, tout en étant d'excellentes sources de  $\beta$ -carotène (provitamine

A), de thiamine (B1), de riboflavine (B2), de niacine, de pyridoxine (B6), l'acide pantothénique, l'acide folique (folacine), l'acide ascorbique et les vitamines E et K. Les épinards et les légumes à feuilles vertes constituent de bonnes sources de vitamine A.B .C et anti-oxydants, ces ressources alimentaires sont particulièrement importantes pour les personnes déjà affectées par le COVID-19 pour lutter contre l'infection. (**Tougan et Théwi., 2020**).

### **I.III. 8. Toxicité**

Malgré les avantages évidents des épinards pour la santé humaine, la surutilisation de la plante peut nuire à l'organisme. (**Mathilde L 2020**). La consommation incontrôlée de feuilles fraîches peut provoquer une indigestion et une diarrhée.

Le produit contient de l'acide oxalique. Cette substance est dangereuse en cas d'acidité élevée, de gastrite chronique et d'ulcère gastroduodéal.

Pour les personnes présentant une violation de l'équilibre eau-sel, les feuilles d'épinards sont contre-indiquées sous quelque forme.

Les légumes verts d'épinards sains peuvent être dangereux pour la santé humaine avec une intolérance à l'acide ascorbique.

Avec une coagulation sanguine accrue ou la prise d'anticoagulants, vous devez arrêter d'utiliser les feuilles de la plante, afin de ne pas interférer avec l'action des médicaments.



**Partie II.**

**Expérimentale**

# Chapitre 1.

## *Matériels et Méthodologie*

## II.I. Matériels et Méthodes

### II.I.1. Généralité

Notre travail a été fractionné en deux parties d'études : les tests photochimiques et l'activité anti-hémolytique. Le protocole expérimental a été effectué au laboratoire de biochimie (3) et la lecture des résultats au spectrophotomètre a été réalisée au laboratoire de microbiologie (1) à l'université Abdel Hamid Ibn Badis de Mostaganem.

Notre projet d'étude de fin de cycle universitaire rentre dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, il traite l'effet des extraits des parties aériennes de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) sur l'activité anti-hémolytique. Le choix de cette espèce végétale (l'épinard) pour notre étude est en relation avec son usage multiple à savoir, dans le domaine alimentaire, médicinale et cosmétique. De plus l'épinard est très utilisé dans l'alimentation quotidienne dans le monde entier notamment en Algérie vue sa disponibilité et son faible coût qui arrange chaque consommateur.

### II.I.2. Matériels biologiques

#### - Le matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des parties aériennes de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.). Les feuilles ont été triées, lavées puis séchées à l'ombre à température ambiante pendant près de 2 jours (jusqu'à stabilisation du poids sec). Une fois sèches, ces feuilles sont broyées puis stockées à l'abri de la lumière. La poudre végétale est réservée pour les tests phytochimiques et l'activité anti-hémolytique

#### Classification de l'épinard

Règne	Métaphytes
Embranchement	Spermatophytes
S/ Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Chenopodiales
Famille	Chenopodiaceae
Genre	<i>Spinacia</i>
Espèce	<i>Spinacia oleracea</i> L.



Figure 7 . Présentation de l'épinard

**- Le sang**

Le sang humain utilisé provient de volontaires sains, non-fumeurs, n'ayant pas suivi de médication (pas de traitement anti-inflammatoires). Les échantillons sont récupérés dans des tubes héparines, puis conservés à 4°C. De préférence d'utiliser le sang frais comme échantillon de test disponible le même jour du protocole expérimental

**II.I.3. Matériels de laboratoire**

Les réactifs	Verreries et appareils
Méthanol- Chloroforme- Réactif de Mayer-Hcl- KI- NH <sub>4</sub> OH-Andhydre acétique- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Liqueur de Fehling A et B - Eau distillé- KCl- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaCl- Folin	Tubes à essai- éprouvettes graduée- flacons- bécher- entonnoir-papier filtre- balance, bain marie- centrifugeuse-UV- micropipette- plaque chauffante plus agitateur. Tubes héparines -Spectrophotomètre-  Etuve

**II.I.4. Méthodologies****II.I.4.1. Séchage et broyage du matériel végétal**

Après un séchage à l'air libre et à l'obscurité, les feuilles de L'épinard (*Spinacia oleracea* L) sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène.



**Figure 8.** Partie aérienne de L'épinard séchée

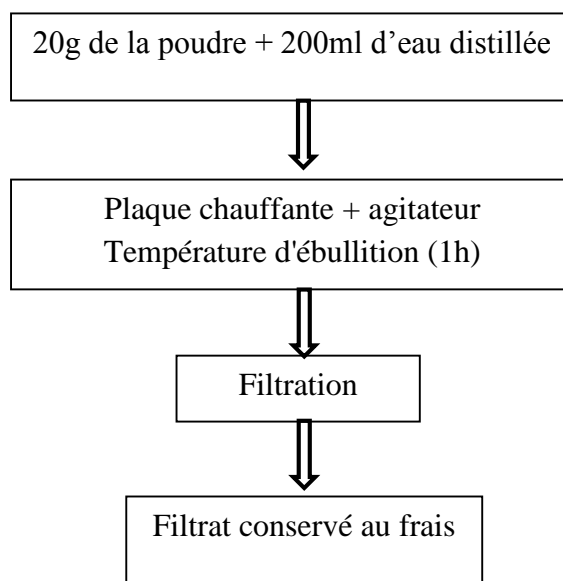


**Figure 9.** Poudre végétale

## II.I.4. 2. Préparation des extraits des feuilles de l'épinard

### A. Préparation de la décoction en milieux aqueux

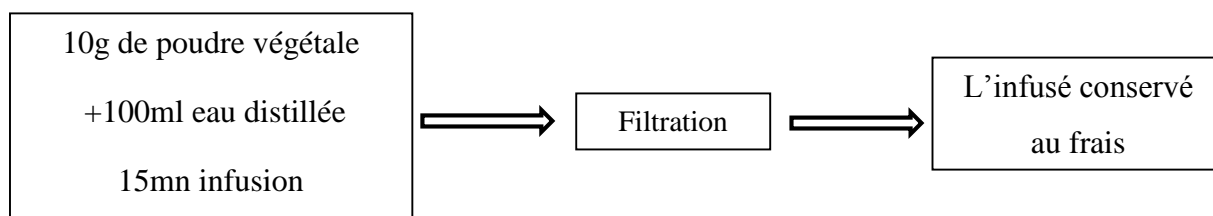
- Mélanger 20 g du matériel végétal séché et broyé avec 200 ml d'eau distillée
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure, dans une plaque chauffante avec agitateur.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.



**Figure 10 :** Protocole de préparation par la décoction aqueuse

### B. Préparation de tisane par infusion

- Introduire 10 g de poudre végétale dans 100 ml de l'eau distillée bouillie
- Laisser infuser pendant 15 mn ensuite filtré la préparation et conserver dans des flacons propres au réfrigérateur.

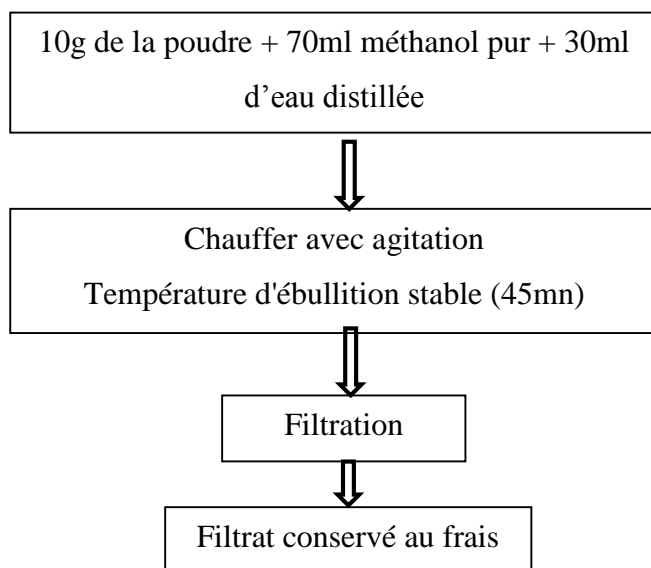


**Figure 11 :** Protocole de préparation de la solution de l'infusion

### C. Décoction en milieu hydro alcoolique (méthanol-eau 70/30)

- Mélanger 10 g du matériel végétal avec 70 ml de méthanol et 30 ml d'eau distillée

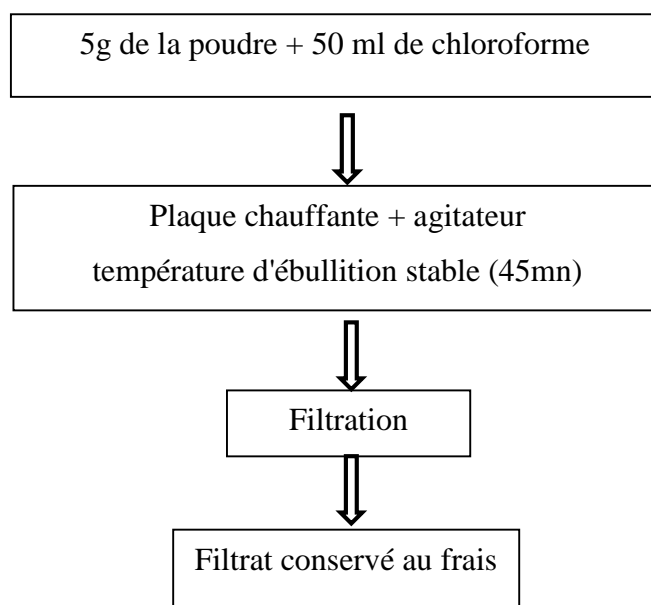
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 45 mn, dans une plaque chauffante avec agitateur.
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat.



**Figure 12 :** Protocole de préparation d'extrait hydro alcoolique par décoction

#### D. Décoction en milieu chloroformique

- Mélanger 5 g du matériel végétal avec 50 ml de chloroforme
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 45 mn, dans une plaque chauffante avec agitateur puis filtrer le mélange et récupérer le filtrat



**Figure 13 :** Protocole de préparation de l'extrait chloroformique par décoction

### II.I. 4. 3. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait hydro-alcoolique, l'infusé, le décocté et l'extrait chloroformique de la partie aérienne de L'épinard. La mise en évidence des constituants chimiques est basée sur la coloration de l'extrait déjà traitée par des réactifs révélateur spécifiques pour chaque groupe chimique. Le taux des composés chimiques de l'extrait testé est estimé en fonction de l'intensité de la coloration

#### A. Les flavonoïdes

Ajouter à 2ml d'extrait de plante, quelques gouttes de HCl 37% et 0,5g de  $MgCl_2$ . Le test positif est marqué par l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes. (Karumi et al, 2004)

#### B. Les terpénoïdes

-Mélanger 1 ml de chloroforme et 1.5 ml de  $H_2SO_4$  avec 2.5 ml d'extrait. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

#### C. Les alcaloïdes

2.5 ml d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 1 ml d'extrait puis incubés au bain- marie pendant 10 min.

##### \* Réactif de Mayer

Prendre 1,4ml de  $H_2Cl_2$  dans 60 ml d'eau distillé puis ajouter à 5g de KI 10ml d'eau distillé. Mélanger les deux préparations et ajuster le volume total à 100ml.

##### \*Réactif de Wagner

Dans 75ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de  $I_2$ . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée. La solution d'extrait déjà préparée est divisée en deux parties. -Ajoute le réactif de Mayer à une partie et le réactif de Wagner à l'autre partie L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

#### D. Les tanins

15 gouttes de  $FeCl_3$  1% sont ajoutées à 5 ml d'extrait. Après 2mn d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue noirdative ou verte

#### E. Les coumarines

Préparer une solution avec 1ml de la solution d'extrait avec 1 ml d'eau chaude. La solution

obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et le deuxième est traité avec 0.5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%. L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette). L'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence des coumarines. (**Bruneton, 1999**).

#### **F. Les stérols**

- Ajouter à 1 ml d'extrait 2.5 ml d'anhydride acétique et 10 gouttes d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrée. Les stérols sont révélés par une coloration violacée virant au vert.

#### **G. Les quinones**

- Quelques gouttes de  $\text{Na OH}$  à 1% sont ajoutées à 1ml de l'extrait. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyede, 2005**).

#### **H. Les saponines**

- Ajouter 1 ml d'eau distillée à 2 ml de solution d'extrait - Agitation pendant 1 minute L'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes et dont l'épaisseur égale ou dépasse 1 cm. indique la présence des saponines

#### **I. Les composés réducteurs**

1 ml de l'extrait est mis au contact avec 0.5 ml de Liqueur de Fehling (A et B) le mélange est porté chauffé au bain marie à  $100^\circ\text{C}$ . Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (**Trease et Evans, 1987**)

#### **J. Dosage des polyphénols totaux**

Dans le but d'évaluer quantitativement le contenu en composés phénoliques de l'extrait de L'épinard (*Spinacia oleracea* L.), un dosage des PPT par la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteu mise au point par SINGLETON et ROSSI en 1965 a été réalisé. Un volume de 200  $\mu\text{l}$  de l'extrait ou d'acide gallique a été préparé à une concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$  puis additionné de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au dixième). Après 4 minutes, 800 $\mu\text{l}$  de la solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 mg/ml) sont ajoutées afin de stabiliser la réaction. Après agitation, le mélange réactionnel est incubé pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Une fois l'incubation arrivée à son terme, une lecture des densités optiques (DO) est effectuée à 760 nm. Le protocole que nous avons appliqué est basé sur la réduction en milieu alcalin des constituants du réactif de Folin, qui sont un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ces derniers sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques, en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (**Boizot et Charpentier, 2006**). Cela donne au mélange une couleur bleue dont l'intensité de la couleur



est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans l'échantillon analysé. L'absorbance est mesurée à 760 nm. Les valeurs des concentrations sont déduites par extrapolation à partir de la droite de la courbe d'étalonnage établie à l'aide de la solution de référence d'acide gallique à des concentrations allant de 10 à 100 µg/ml. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g). La solution mère de l'échantillon à doser ainsi que la gamme étalon sont préparées le même jour et dans les mêmes conditions opératoires.

### **K. Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) citée par **Djeridane et al., (2006)**. Le principe du dosage est basé sur la capacité des flavonoïdes à chélater via leurs groupements hydroxyles (OH) libre l'ion Al<sup>3+</sup> et former un complexe jaunâtre- (**Quettier et al., 2000**). 1ml de la solution d'extrait végétale à 1mg/ml est mélangé avec 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> à 2%. Après 10min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 448nm

La concentration des flavonoïdes dans les différents extraits de l'épinard ce fait à l'aide des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine par gramme de matière Sèche (mgEQ/gMS).

### **II.I.4.4. Evaluation de l'activité anti-hémolytique de *Spinacia oleracea* L**

L'étude de la protection de la membrane érythrocytaire présente un intérêt crucial dans le traitement de certaines pathologies hémolytiques.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de la capacité des extraits déjà préparés de *Spinacia oleracea* L à empêcher l'hémolyse des globules rouges humains (GRh), induite par un stress osmotique, thermique et par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'exposition des globules rouges à certains paramètres physicochimiques telles que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactives oxygénées, les températures élevée, provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique et par conséquent la libération de l'hémoglobine qui sera alors doser par spectrophotométrie d'absorbance visible

L'utilisation des globules rouges est motivée par le fait qu'ils soient admis comme modèle cellulaire en recherche scientifique et qu'ils partagent des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment celle du lysosome (**Shobana et Vidhya, 2016**).

### A. Préparation de la suspension érythrocytaire

La suspension érythrocytaire a été préparée suivant les étapes décrites par **Hebbani et al, (2014)** Du sang fraîchement prélevé sur des tube héparine est centrifugé à 3000 tour /minutes durant 15 min, après élimination du surnageant le culot est lavé 3 fois par Solution physiologique puis suspendu à nouveau dans ce même volume que le surnageant éliminé. Après le culot est suspendu à nouveau dans une solution de tampon phosphate salé (PBS) à 0,2M, PH = 7,4 (1 volume du culot et 9 volume de PBS, un hématoците à 10 %).

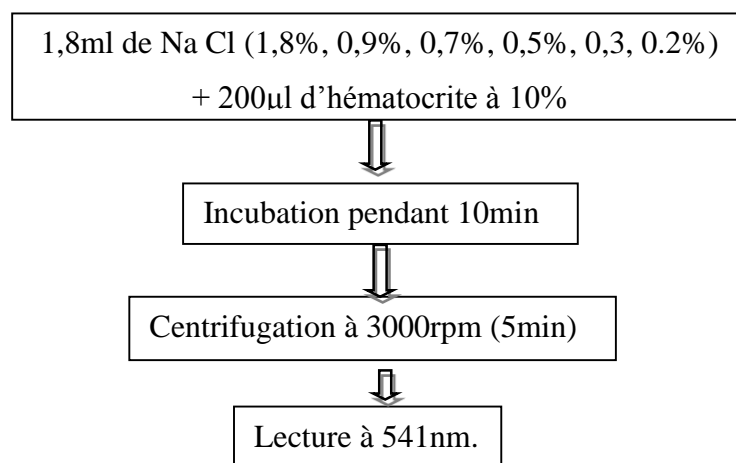
### B. Induction de l'hémolyse induite vitro.

Pour tester l'effet anti hémolytique de notre extrait de L'épinard, des tests d'hémolyse induits sur le modèle érythrocytaire par une création d'un milieu hypotonique, la température élevée, et par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été mis aux points. Ces tests correspondent aux témoins positifs de l'hémolyse.

#### ➤ Test d'hémolyse induit par l'hypotonie

Dans ce volet de notre étude, nous avons appliqué le protocole de **Freitas et al. (2007)** qui consiste à générer un stress osmotique par une variation des concentrations en NaCl, utilisées allant de 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.7 % , 0.9 % et 1.8%

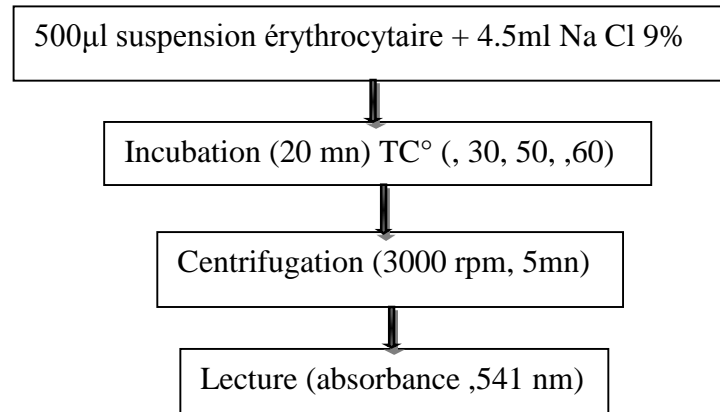
- 1,8 ml de Na Cl à différentes concentrations est ajoutés à 200µl de la suspension de GR à 10% d'hématocrite. La préparation a été mélangée, homogénéisée, incubée à température ambiante pendant 10 min, ensuite centrifugée à 3000T/mn pendant 5min. La densité optique du surnageant a été mesurée à 541nm



**Figure 14** : Induction de l'hémolyse par Na Cl sur l'hématocrite à 10%

➤ **Test de thermo-hémolyse.**

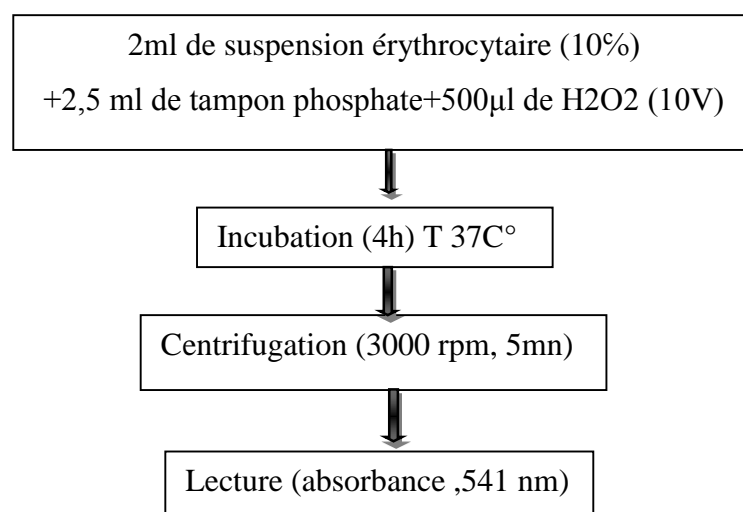
- 500 µl de la suspension érythrocytaire à 10% ont été mélangés avec 4,5ml de Na Cl à 9%
- Le mélange est incubé pendant 10 et 20 mn à différentes températures (30°C, 50°C, 60°C),
- Après la centrifugation, les absorbances sont mesurées à 541nm.



**Figure 15 :** Induction de l'hémolyse par la température sur l'hématocrite à 10%

➤ **Test d'hémolyse induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

- Selon le protocole décrit par James et Alewo (2014).
- 2ml de suspension érythrocytaire (10 %) ont été mélangés avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, PH=7,4)
- 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V) ont été ajoutés au mélange
- Le mélange a été incubé pendant 4 heures à 37°C, puis centrifugé à 3000 tpm (10 min), l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 541nm.



**Figure 16 :** Induction de l'hémolyse par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'hématocrite à 10%

### C. Effet protecteur (anti-hémolytique) de l'extrait vis-à-vis d'un stress hypotonique

L'exposition de l'érythrocyte à un stress hypotonique aboutit à la lyse de sa membrane qui s'accompagne par le relargage de l'hémoglobine. Cette partie d'étude consiste à traiter la suspension érythrocytaire par l'extrait de L'épinard (*Spinacia oleracea* L.) avant l'induction de l'hémolyse et d'évaluer l'activité anti hémolytique au spectrophotomètre. Le taux d'hémolyse de l'extrait végétal est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse induite

- 200 µl de la suspension érythrocytaire à 10 % est mélangé avec 1.8 ml de tampon phosphate (pH 7.4). Une solution à concentrations variables en Na Cl citées précédemment est ajoutée, où chaque concentration est combinée à des concentrations variables de l'extrait (solution brute (100%), 25%, 50 % ,75%

La préparation est incubée à la température ambiante pendant 10 mn. Après centrifugation, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 541nm et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = (\text{Do1} - \text{Do2}/\text{Do1}) \times 100$$

**Do1**= Densité optique de la solution hypotonique des globules rouges sans l'extrait

**Do2** = Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges avec l'extrait

#### ➤ Effet protecteur (anti-hémolytique) de l'extrait vis-à-vis de la thermo-hémolyse.

L'évaluation de l'activité protectrice de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress thermique est réalisée in vitro par la méthode spectrophotométrique décrite par **Sakat et al. (2010)**.

- 4,5 ml d'extrait végétal à différentes concentrations déjà citées est dissout dans un tampon phosphate (pH 7.4 ; Na Cl )

.- 500 µl de suspension érythrocytaire sont ajoutés puis l'incubation pendant 20min à différentes températures (30C°, 50C°, 60C°) a été réalisée.

- Après incubation, les tubes sont immédiatement refroidis à l'eau de robinet, puis centrifugés pendant 10 minutes et l'absorbance du surnageant est estimée à 540 nm.

Parallèlement, un control positif a été réalisé en remplaçant l'eau physiologique par 5 ml d'eau distillée provoquant ainsi une hémolyse totale (100 %). Le pourcentage de protection contre l'hémolyse induite par la chaleur est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = 100 - (\text{Do échantillon} / \text{Do contrôle}) \times 100$$

#### D. Effet protecteur (anti-hémolytique) de l'extrait végétal vis-à-vis de l'hémolyse induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajouter à 500µl de l'extrait 2ml de suspension érythrocytaire puis incuber 1mn à la température ambiante

- Ajouter 2,5ml de tampon phosphate et 500µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Centrifuger ensuite lire l'absorbance du surnageant

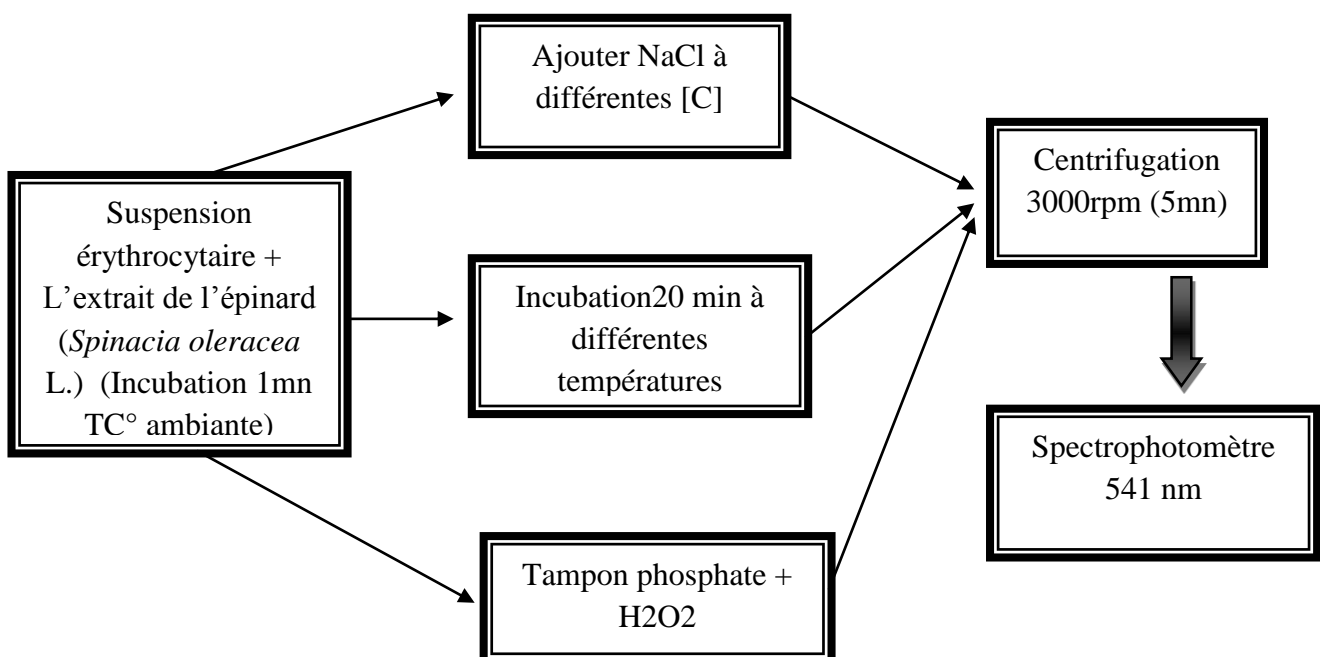
Le résultat du pourcentage de l'activité anti-hémolytique est calculé selon l'équation

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = (\text{Do1} - \text{Do2} / \text{Do1}) \times 100$$

**Do1** = Densité optique de la suspension érythrocytaire traitée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans l'extrait

**Do2** = Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges avec l'extrait

Le protocole expérimental de l'effet anti-hémolytique de l'extrait de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) est résumé dans le schéma suivant (figure 17)



**Figure 17:** Schéma de l'effet anti-hémolytique de l'extrait de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.)

# Chapitre 11.

## Résultats et interprétations

## II. Résultats et Interprétations

### II.1. Résultats et interprétations des tests phytochimiques

Dans le but de mettre en évidence la composante en métabolites secondaire de l'épinard, des tests phytochimiques ont été effectués sur différents extraits des parties aériennes de la plante à savoir, l'extrait d'infusion et de décoction dans le milieu aqueux, la décoction en milieu méthanolique et la décoction en milieu chloroformique. Ces tests ont été révélés en se basant sur le degré de la coloration dont l'intensité indique une présence importante du métabolite secondaire. Le tableau (3) et les figures (18 jusqu'au 49) regroupent l'ensemble des résultats des tests phytochimiques, Les légendes Te et Ts correspondent au témoin et les tests respectivement

**Tableau 3 :** Tests phytochimiques des extraits des parties aériennes de l'épinard

Les tests Phytochimiques		Les extraits			
		décoction hydro alcoolique	Extrait aqueux infusion	Décoction chloroformique	Extrait aqueux Décoction
Les flavonoïdes		-	-	-	-
Les terpénoïdes		+	+++	-	+++
Les alcaloïdes	Mayer	-	-	+++	-
	Wagner	-	+	+++	+
Les tanins		+-	-	+++	-
Les stérols		-	+++	+	-
Les coumarines		-	-	-	+
Les quinones		-	+	-	++
Les composés réducteurs		+-	-	+	-
Les saponines		+-	-	-	-

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

## II. 1.1. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveaux de l'extrait chloroformique

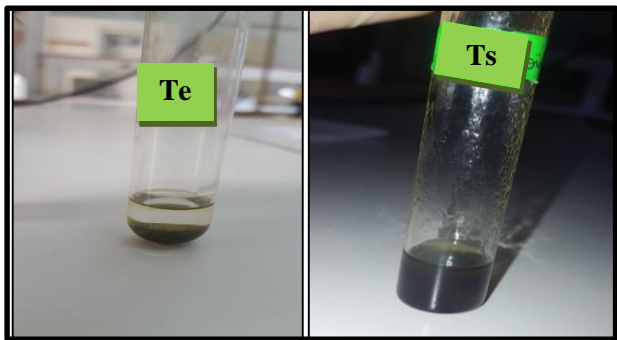


Figure 18 : Mise en évidence des flavonoïdes

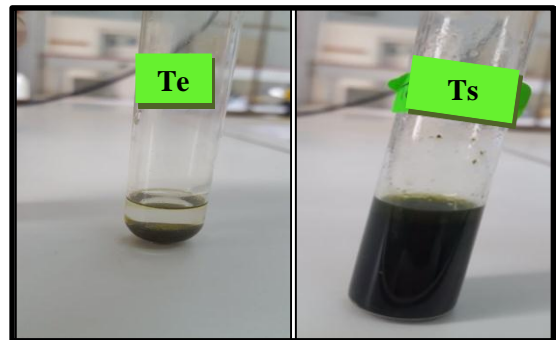


Figure 19: Mise en évidence des terpénoïdes

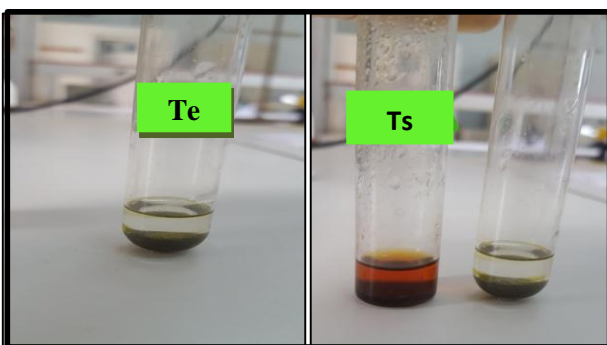


Figure 20 : Mise en évidence des alcaloïdes

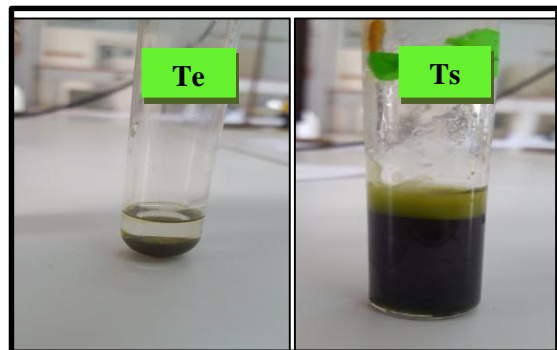


Figure 21 : Mise en évidence des tanins

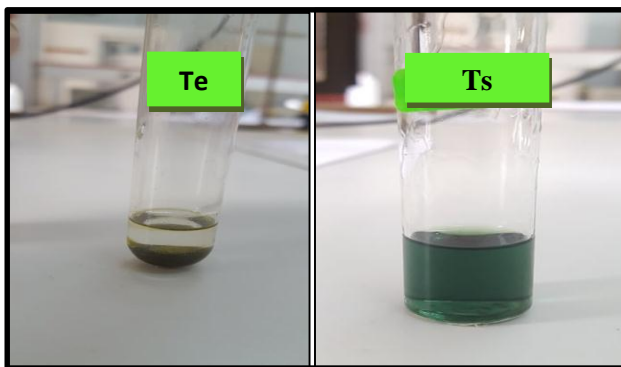


Figure 22 : Mise en évidence des stérols

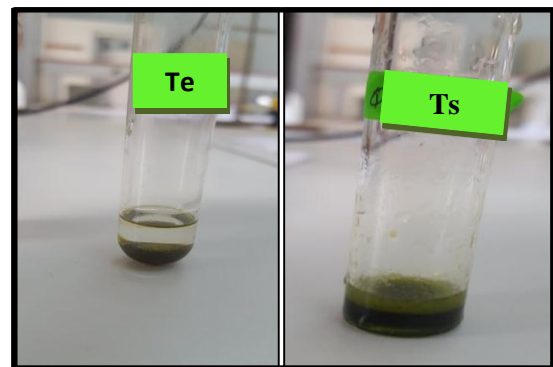


Figure 23 : Mise en évidence des quinones

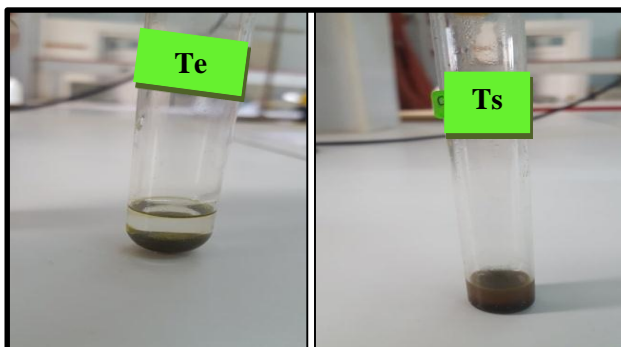


Figure 24 : Mise en évidence des composés Réducteurs

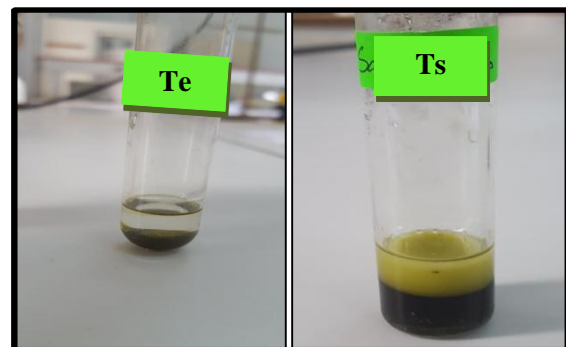


Figure 25 : Mise en évidence des saponines



## II. I. 2. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des infusés

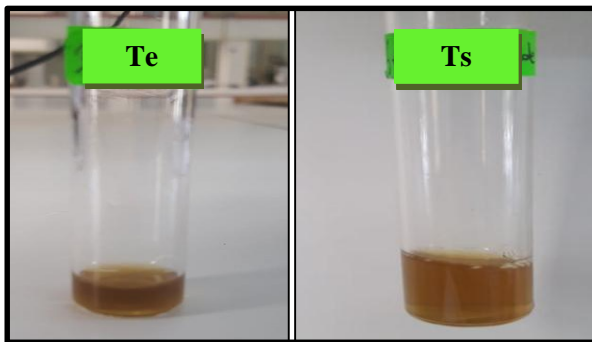


Figure 26 : Mise en évidence des flavonoïdes

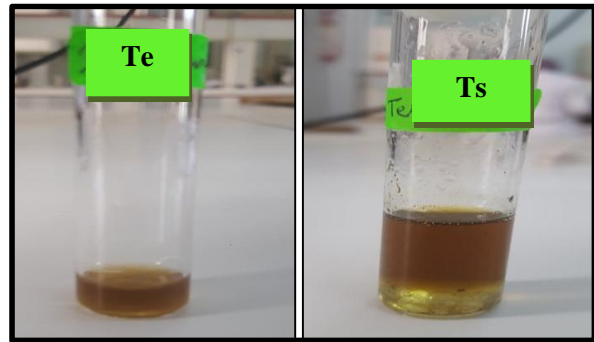


Figure 27 : Mise en évidence des terpénoïdes

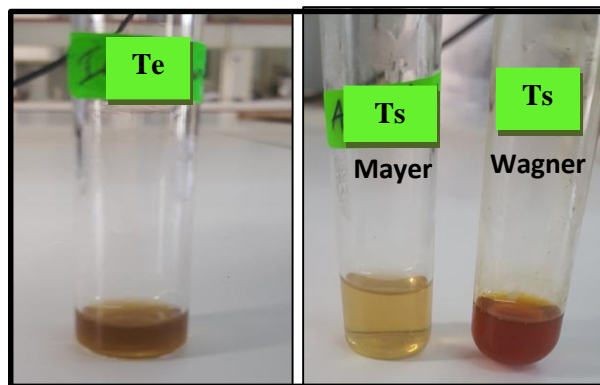


Figure 28: Mise en évidence des alcaloïdes

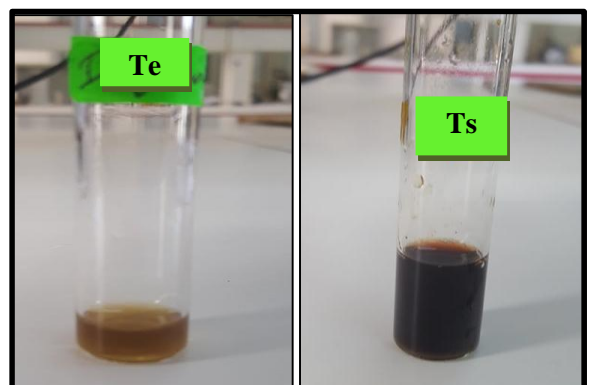


Figure 29 : Mise en évidence des tanins

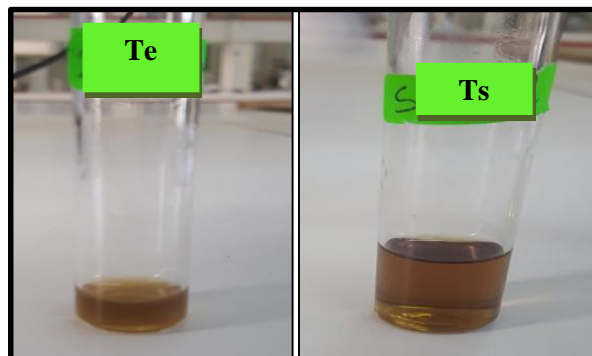


Figure 30 : Mise en évidence des stérols

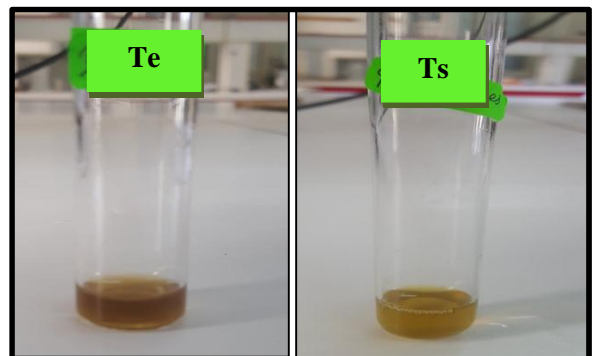


Figure 31 : Mise en évidence des quinones

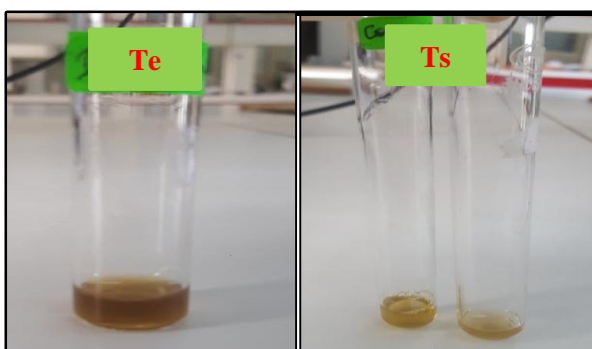


Figure 32 : Mise en évidence des coumarines

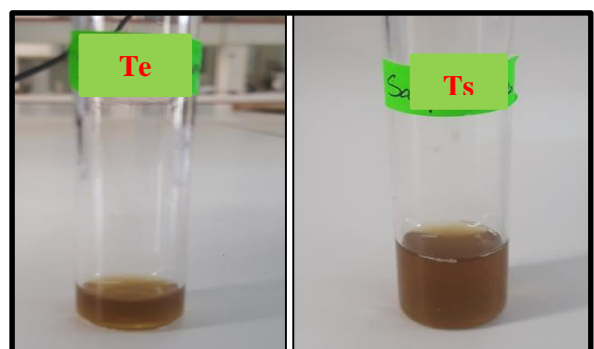
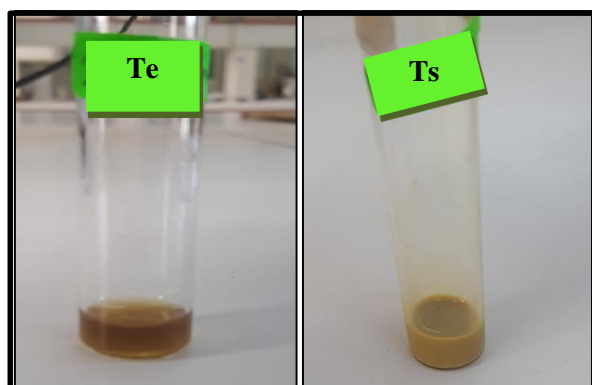
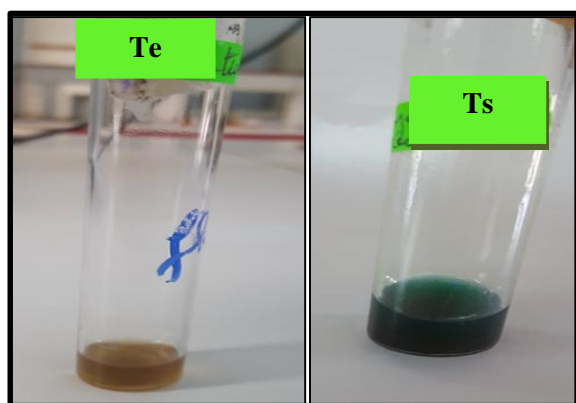


Figure 33 : Mise en évidence des saponines

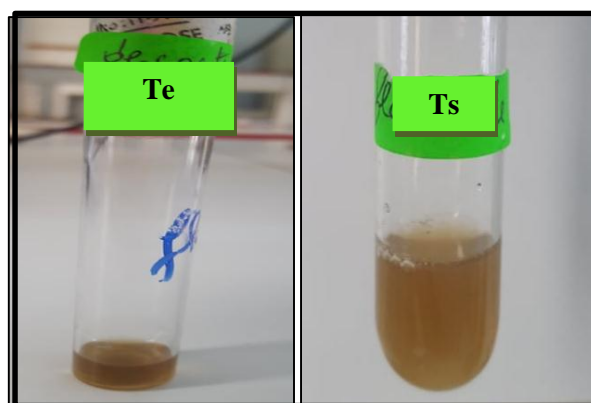


**Figure 34 :** Mise en évidence des composés réducteurs

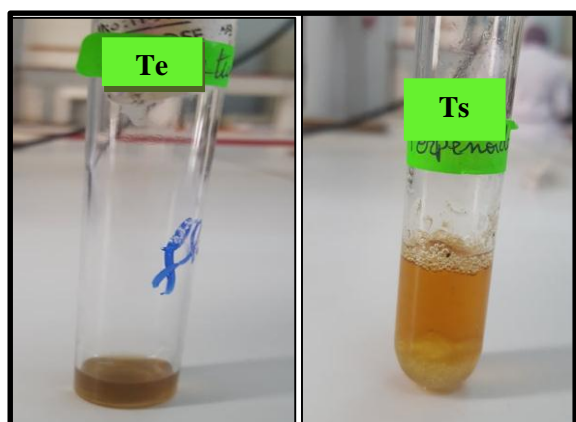
### II.I. 3. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des décoctés aqueux



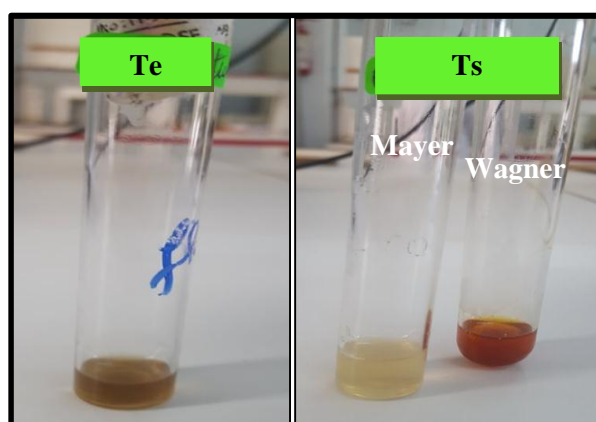
**Figure 35:** Mise en évidence des composés réducteurs



**Figure 36 :** Mise en évidence des flavonoïdes



**Figure 37 :** Mise en évidence des terpénoides



**Figure 38 :** Mise en évidence des alcaloïdes

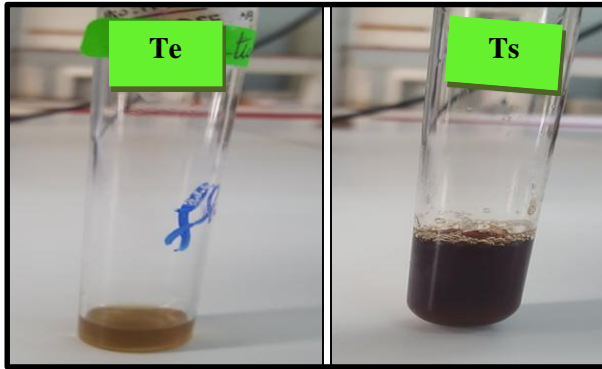


Figure 39 : Mise en évidence des tanins

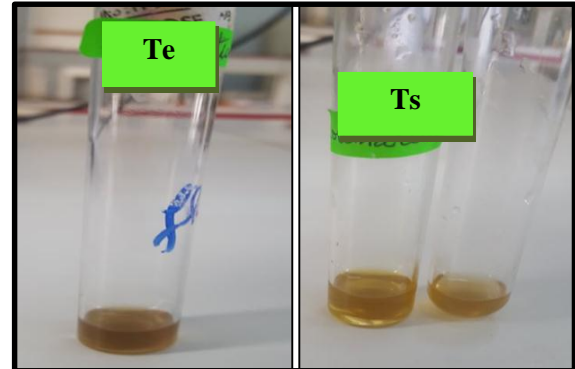


Figure 40 : Mise en évidence des coumarines

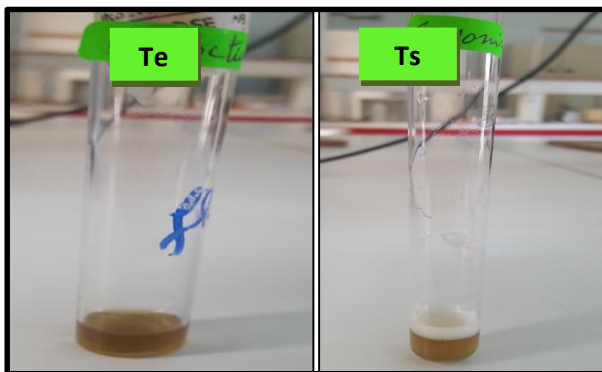


Figure 41 : Mise en évidence des saponines

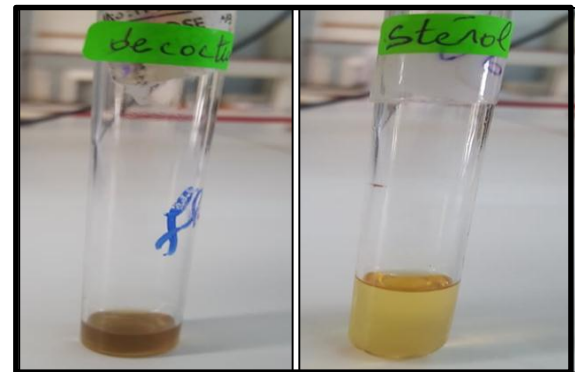


Figure 42 : Mise en évidence des stérols

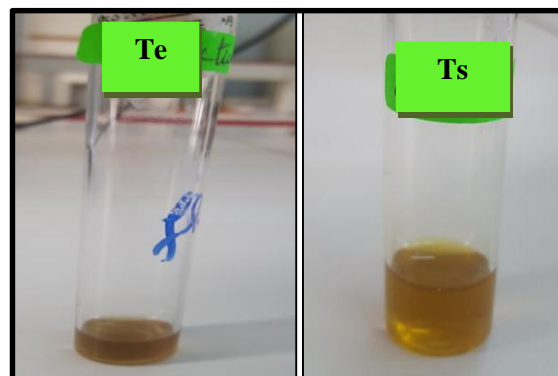
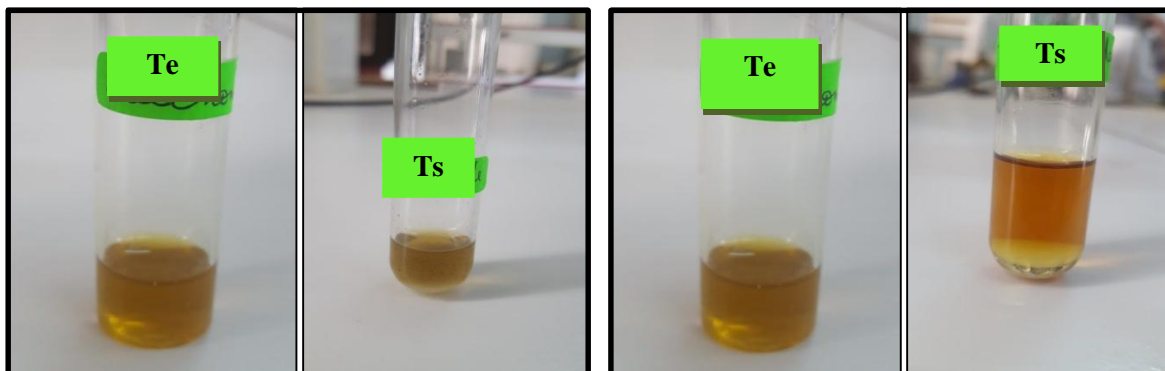
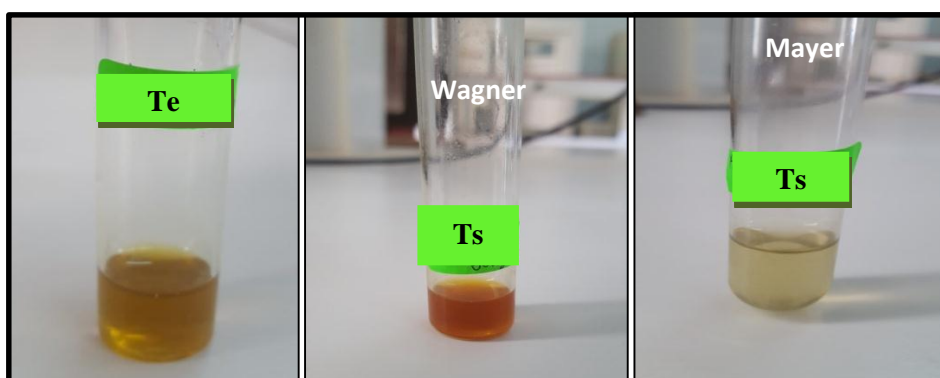
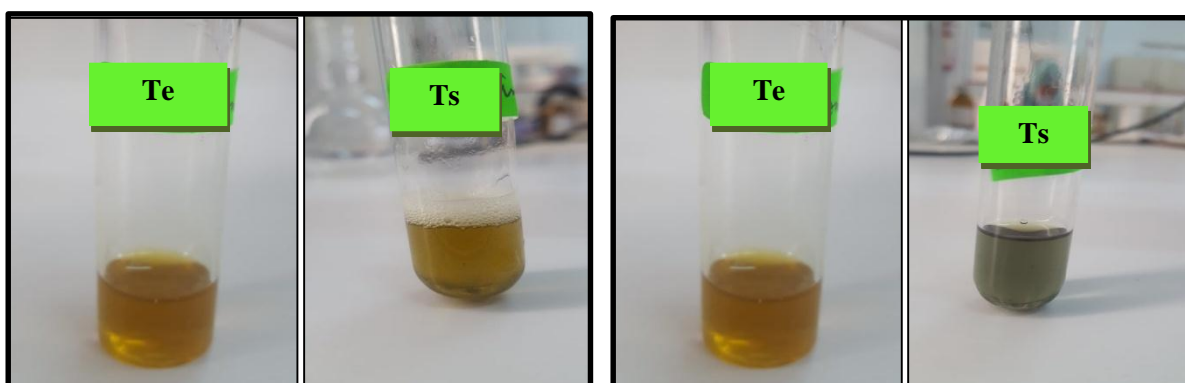
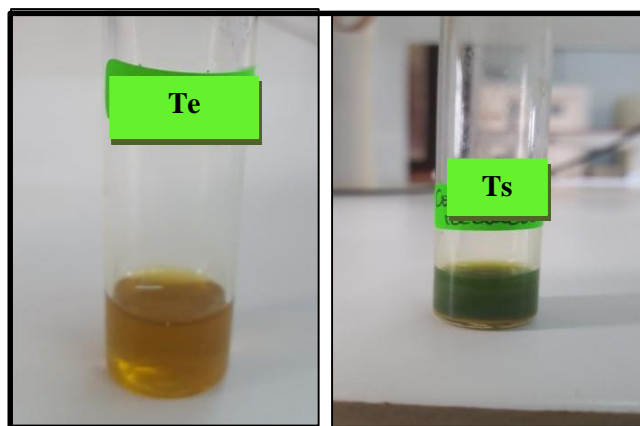


Figure 43 : Mise en évidence des quinones

**II.I. 4. Mise en évidence des composés phytochimiques au niveau des extraits hydro-alcooliques****Figure 44** : Mise en évidence des flavonoïdes **Figure 45** : Mise en évidence des terpénoïdes**Figure 46** : Mise en évidence des alcaloïdes**Figure 47** : Mise en évidence des saponines**Figure 48** : Mise en évidence des stérols



**Figure 49** : Mise en évidence des compose réducteurs

## Interprétations

D'après le screening phytochimique des parties aériennes de *Spinacia oleracea*, nous avons remarqué que la présence des métabolites secondaires varie selon le type d'extrait dont il existe une affinité du solvant à extraire la substance chimique et selon le révélateur spécifique pour chaque paramètre phytochimique.

Les terpénoïdes ont été révélés dans la plus part des extraits préparés excepté l'extrait chloroformique, ils sont majoritairement présents dans les extraits d'infusion et décoction. (Tableau 3) (Figures 27, 37, 45). Les alcaloïdes sont présent très positivement dans l'extrait chloroformique avec les deux tests (Mayer et Wagner) (Tableau 3)( Figures 20) et l'extrait d'infusion et décoction avec le test de wagner (Tableau 3) ( Figures 28 et 38). Pour Les stérols, ils sont mieux révélés dans l'infusé aqueux et le décocté chloroformique (Tableau 3) (Figure 22 et 30) par rapport aux autres extraits. Tandis que les tanins ont été mieux détectés dans l'extrait chloroformique (Tableau 3) (Figure 21) et légèrement dans l'extrait hydro-alcoolique. Pour les saponines, ils sont considérés comme absents à cause du volume de la mousse qui est inférieur à 1 cm pour trois types d'extraits (infusé, décocté aqueux et décocté alcoolique) (tableau 3) ; (figure 25 et 33 et 41).Cependant ils sont révélés positivement dans l'extrais hydro-alcoolique (figure 47)

Le test des coumarines nécessite la présence des UV pour une meilleure révélation cependant par manque de ce paramètre au niveau de laboratoire, nous avons constaté sa présence au niveau de la décoction aqueuse (Tableau3) (Figure 40). Concernant les quinones, nous avons noté que les extraits aqueux par infusion et décoction ont données une bonne révélation par apport à l'extrait hydro alcoolique et chloroformique (Tableau 3)



Le screening phytochimique ce n'est qu'un test qualitatif pour apprécier la composante globale des métabolites secondaires d'une plante. Ce test dépend des révélateurs appropriés et des conditions expérimentales. C'est pour cela qu'il est nécessaire de confirmer les tests qualitatifs par des tests quantitatifs et par des techniques de séparation des molécules bioactives et purification de la composante en métabolites secondaires (Expl : HPLC). Vu le manque des révélateurs et la disponibilité des produits chimiques qui revient d'un stock ancien, il nous a été intéressant d'effectuer un dosage des polyphénols totaux et de flavonoïdes afin de vérifier les résultats des tests phytochimiques. Ces tests nous seront utiles pour discuter l'activité anti-hémolytique des extraits de l'épinard

### II.I.5. Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits bruts des parties aériennes de l'épinard ont été déterminées par la méthode colorimétrique. Les résultats obtenus et exprimés en mgEqAG/gMS pour les polyphénols totaux et en mgEqQ/gMS pour les flavonoïdes (Tableau 4) montrent que la partie aérienne de la plante étudiée contient des teneurs appréciables en métabolites secondaire de type polyphénoliques

**Tableau 4 : Teneurs moyennes en polyphénols totaux et en flavonoïdes**

<b>Extraits</b>	<b>Les polyphénols totaux mgEqAG/gMS</b>	<b>Les flavonoïdes mgEqQ/gMS</b>
<b>Infusion aqueuse</b>	7.68 ± 0,09	04,22 ± 0,19
<b>Décoction aqueuse</b>	8.85± 0,07	05,62 ± 0,06
<b>Décocté Méthanolique</b>	10.07.± 0,12	6,88 ± 0,48
<b>Décocté Chloroformique</b>	8.43± 0,44	5,53 ± 0,0

Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes sont considérablement révélées pour l'ensemble des extraits avec des valeurs qui diffèrent selon le type d'extraction des parties aérienne de *Spinacia oleracea*. Les valeurs moyennes des polyphénols totaux enregistrées sont comprises entre 8.43 et 10.07 mgEqAG/gMS . Pour les flavonoïdes les teneurs varient de 04,22 et 6,88 mgEqQ/gMS (Tableau 4). Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et flavonoïde ont été enregistrées dans l'extrait hydro-méthanolique avec les valeurs de 10.07 mgEqAG/gMS et 6,88 en mgEqQ/gMS respectivement (Tableau 4).

## II. 2. Résultats de l'activité anti-hémolytique

### II. 2.1. Résultats de l'activité hémolytique induite par hypotonie, substance chimique et la chaleur

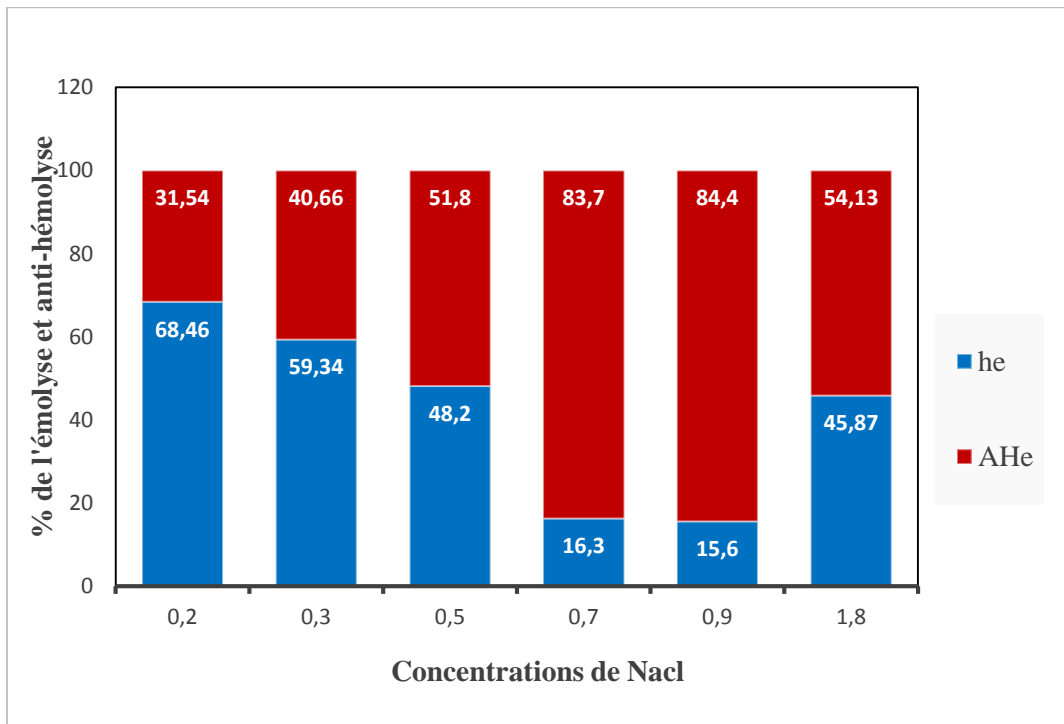
Ces tests ont été réalisés par l'utilisation de Na Cl comme hémolysant hypotonique du sang avec des différentes concentrations (0,2% 0,3% 0,5% 0,7% 0,9% 1,8%) ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme un hémolysant par sa forte oxydation et les différentes températures (30°, 50°, 60°) comme un facteur de la dégradation des protéines. Ces tests ont été utilisés sur la suspension érythrocytaire en absence de l'extrait. Les résultats seront utilisés pour l'étude de la protection de l'extrait de l'épinard contre l'hémolyse induite. Les figures (50, 51 et 52) présentent l'ensemble des résultats

❖ D'après les résultats obtenus sur l'effet de l'hypotonie (figure 50), nous avons observé que à des concentrations de Na Cl dans le milieu de suspension des globules rouges entre 0,7% à 0,9 % l'hémolyse est très faible ce qui correspond au milieu pratiquement isotonique. Par contre, pour des concentrations de Na Cl inférieures à 0,7% (milieu hypotonique), l'hémolyse tend à être complète à des faibles concentrations de 0,2% et 0,3% pour atteindre un taux de 68,46% et 59,34 % respectivement. Pour les concentrations supérieures à 0,9% (milieux hypertonique) le taux d'hémolyse diminue.

❖ Les résultats de l'effet de la chaleur sur les globules rouges montrent que l'hémolyse augmente en fonction de la température élevée. En effet à la température 50C° le taux d'hémolyse est de 65,6 % pour atteindre un taux maximal de 88% à 60 C°. L'effet de la température sur l'hémolyse est probablement dû à la dénaturation des protéines membranaires de GR par la chaleur ce qui aboutit à la libération de l'hémoglobine dans le surnageant.

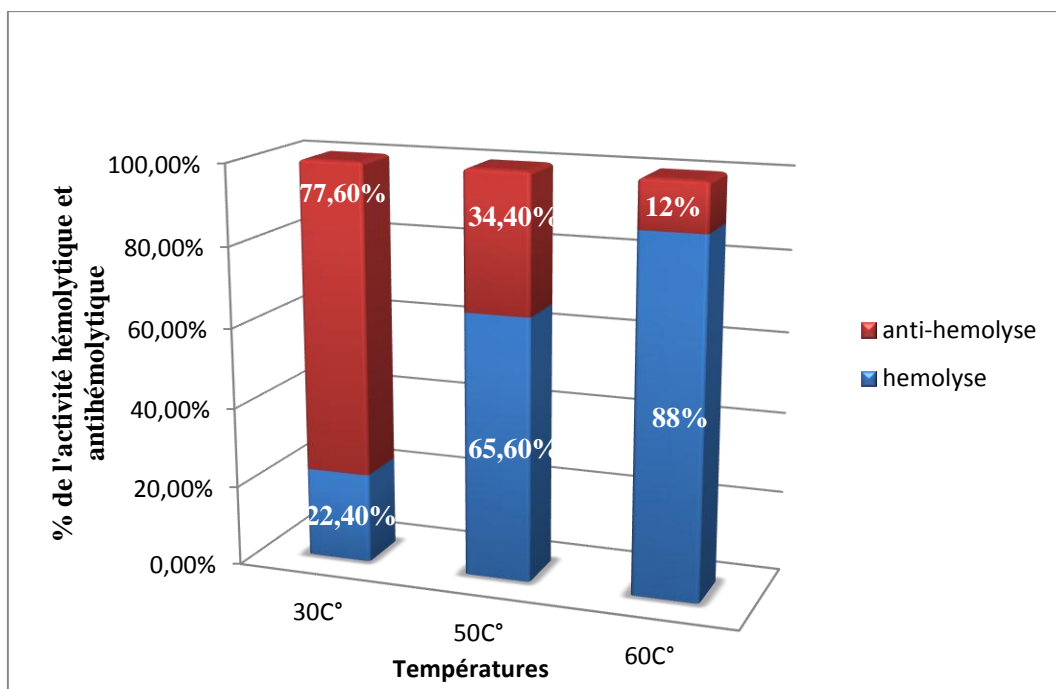
❖ Le traitement de la suspension érythrocytaire par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a donné une hémolyse très marquée qui est de 82,33% (Figure 52).

➤ **Hémolyse induite par NaCl**



**Figure 50 :** L'hémolyse des érythrocytes induite par l'hypotonie

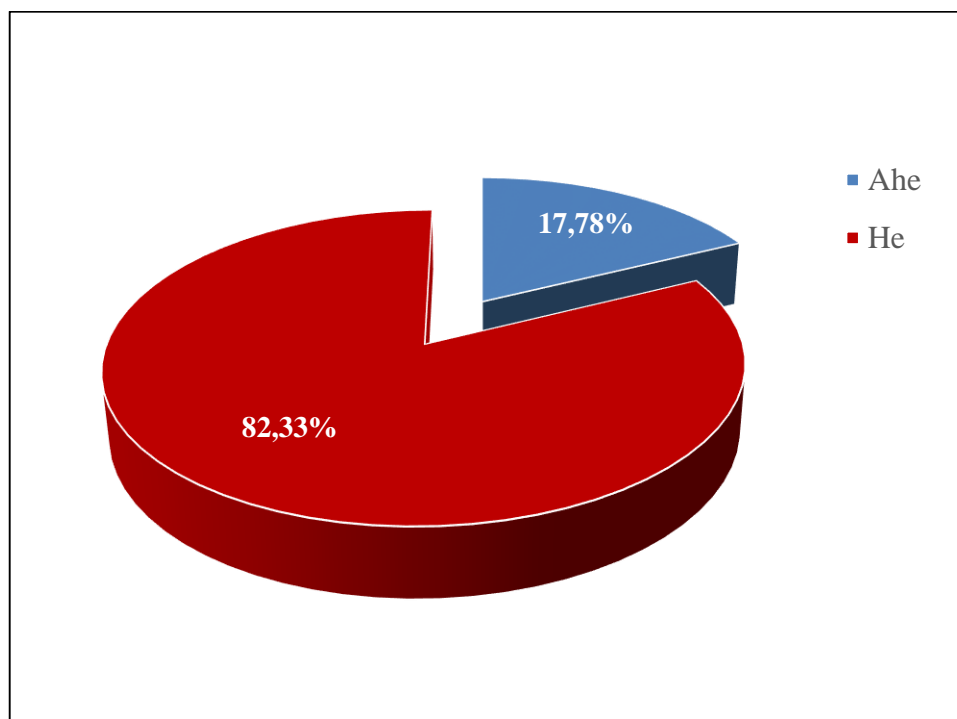
➤ **Hémolyse induite par la température**



**Figure 51 :** Hémolyse des érythrocytes induite par la température



➤ **Hémolyse chimique induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**



**Figure 52 :** Hémolyse des érythrocytes induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## II. 2. 2. Résultats de l'effet protecteur des extraits de l'épinard

### A. Résultats de l'effet protecteur des extraits contre l'hypotonie

Les taux de la protection de l'épinard des cellules érythrocytaires contre un phénomène hémolytique ont été calculés à base des valeurs de la densité optique (DO) qui met en évidence la fuite de l'hémoglobine au niveau du surnageant. En termes de comparaison, plusieurs paramètres en été inclus à savoir, l'évaluation de l'activité hémolytique et anti-hémolytique du sang, induite par des agents hémolysants, ainsi que les témoins positifs et négatifs dont les formules sont représentées dans la partie méthodologie. Les résultats sont résumés dans les figures (53, 54, 55 et 56).

❖ D'après les résultats (Figure 53), l'activité anti-hémolytique des infusés de l'épinard diffère selon les dilutions de l'extrait végétal et vis-à-vis des concentrations de Na Cl. Nous avons noté une protection de l'extrait à 75% contre l'hémolyse induite par l'hypotonie avec un taux de protection de 32,86%. dépassent celle du témoin (induction des GR par Na Cl) dont le taux de l'activité anti-hémolytique est de 31,54% . Cette protection diminue légèrement pour les infusés dilués à 50% et 25% et cela dans la phase hypotonique la plus forte (0,2%) dont les

pourcentages de l'activité anti-hémolytique sont de 30,6 et 28% pour les extrait dilués à 50 et 25% respectivement. Une protection importante a été enregistré à la dilution 75% de l'extrait infusion vis-à-vis de de la concentration 0,3 % de Na Cl pour un taux de protection de 53%. Concernant l'extrait brut, il présente la plus faible protection des GR contre l'hémolyse hypotonique.

❖ Les résultats de la figure (54) montrent que le décocté brut des parties aériennes de l'épinard n'a pas révélé une protection contre l'hypotonie maximale (0,2% NaCl). Nous avons noté une faible activité anti-hémolytique qui est inférieure à celle enregistrées chez le témoin. les taux sont 23 ; 23,7% et 24,4% pour les extraits 25% , 50% et 75% respectivement contre 31,54% témoin. Même remarque a été enregistrée concernant le décocté brut

❖ Les taux de protection des extraits hydro-alcooliques de l'épinard contre l'hémolyse hypotonique maximale et qui sont mentionnés dans la figure (54) révèle des pourcentages de protection inférieurs de ceux du témoin : 20,2 ; 22,8 ; 24,2 et 26,4 % pour l'extrait brut , Les dilution 25, 50% et 75% respectivement. Ces valeurs sont proportionnelles aux résultats de l'induction de l'hémolyse par l'hypotonie. Nous avons remarqué que l'activité anti-hémolytique est meilleurs que celle des décoctés

❖ Pour l'hypotonie maximale (0,2%, Na Cl) le décocté chloroformique de l'épinard ne présente aucune protection contre l'hypotonie (Figure 56). L'ensemble des taux de l'activité anti-hémolytique calculés sont inférieurs au ceux du témoin. Ces taux sont similaires aux valeurs de l'extrait Hydro-alcoolique

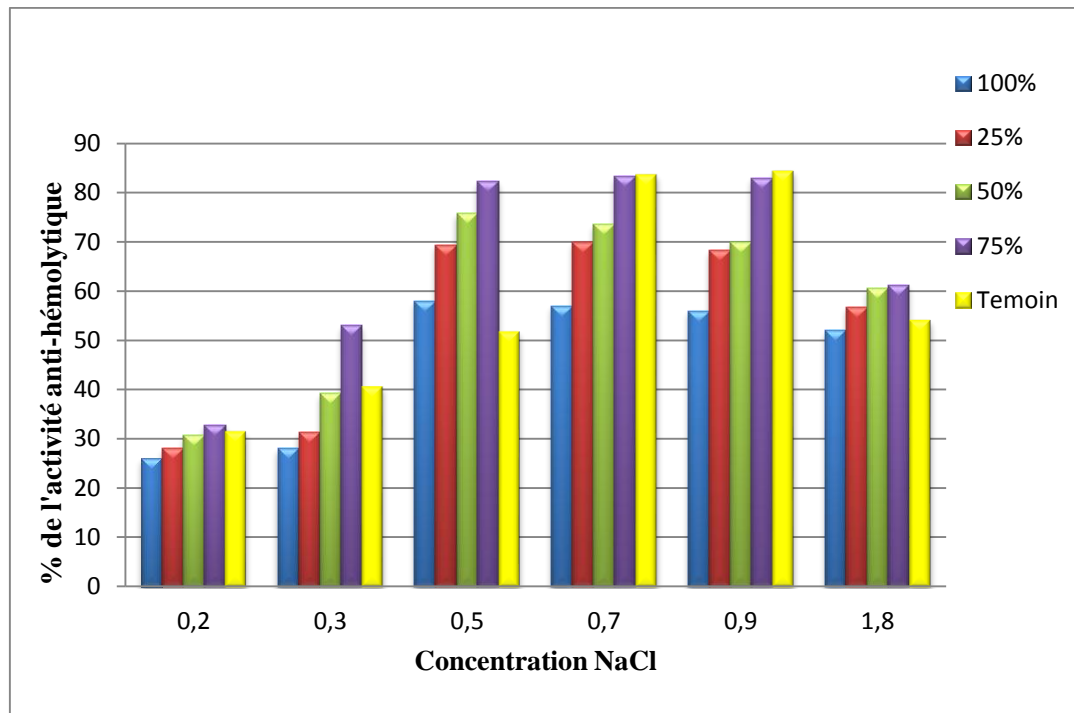


Figure 53 : L'effet protecteur des infusés de l'épinard vis à vis de l'hémolyse hypotonique

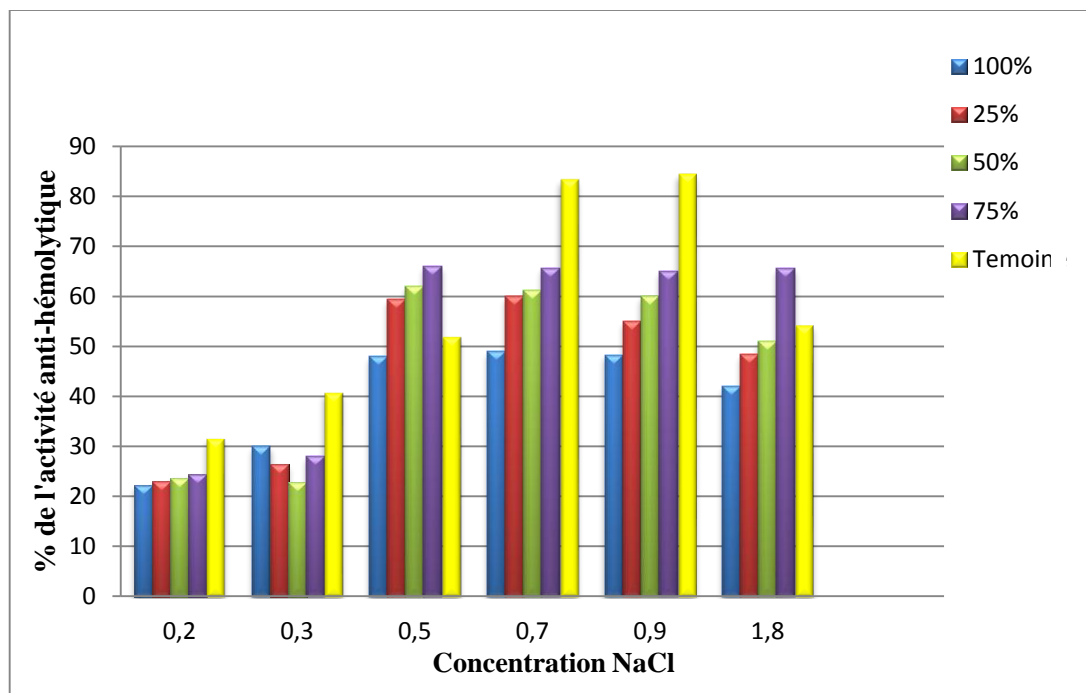
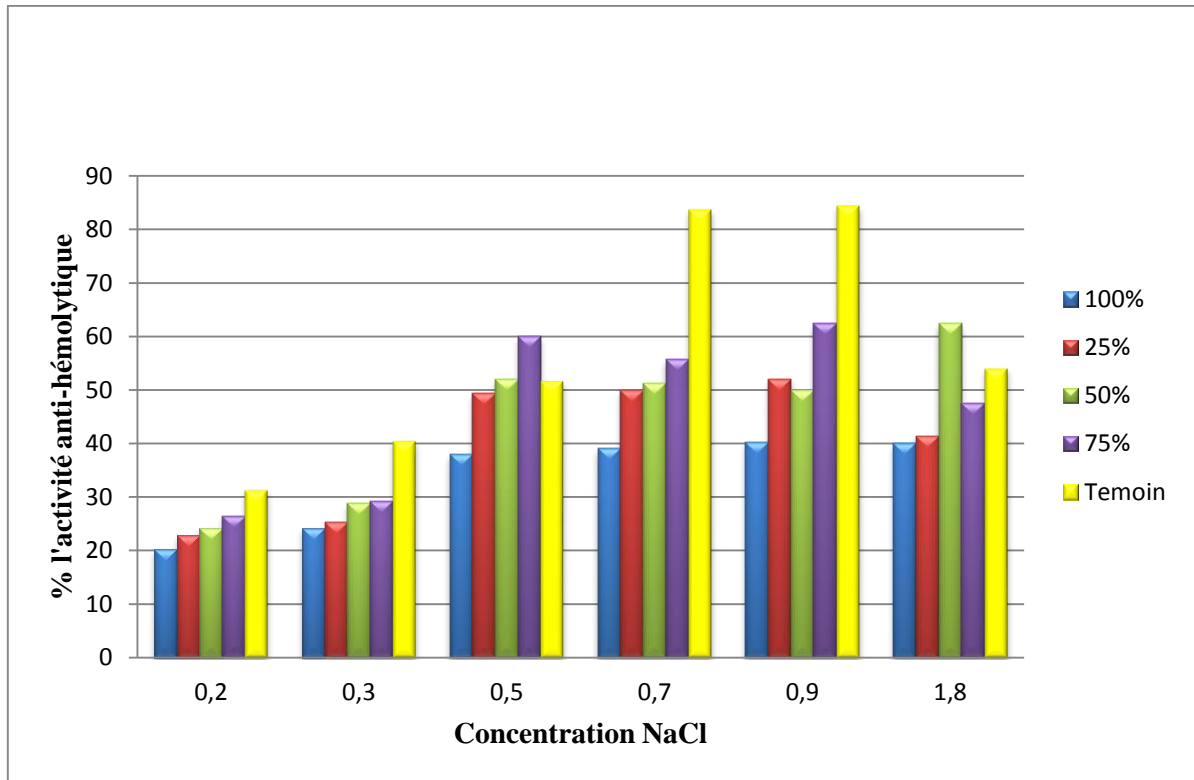
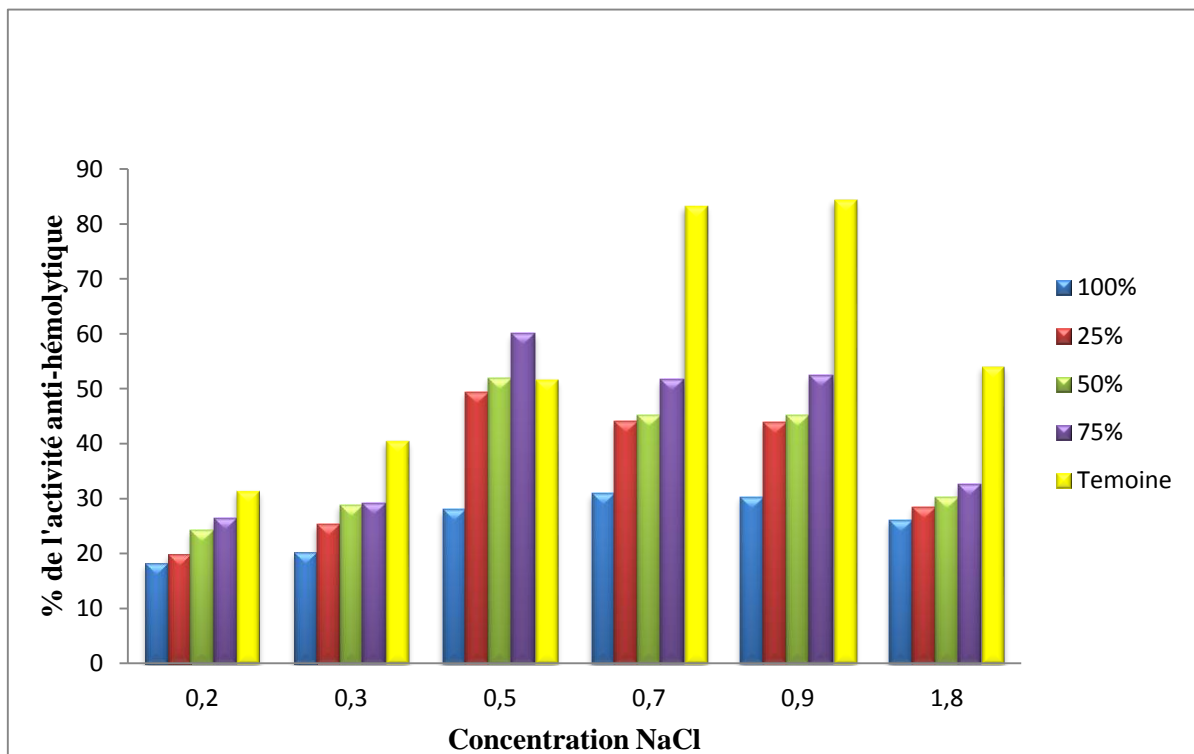


Figure 54 : Effet protecteur des décoctés aqueux de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse hypotonique



**Figure 55** : Effet protecteur des décoctés hydro-alcooliques de l'épinard vis à vis de l'hémolyse hypotonique



**Figure 56** : L'effet protecteur des décoctés chloroformiques de l'épinard vis à vis de l'hémolyse hypotonique

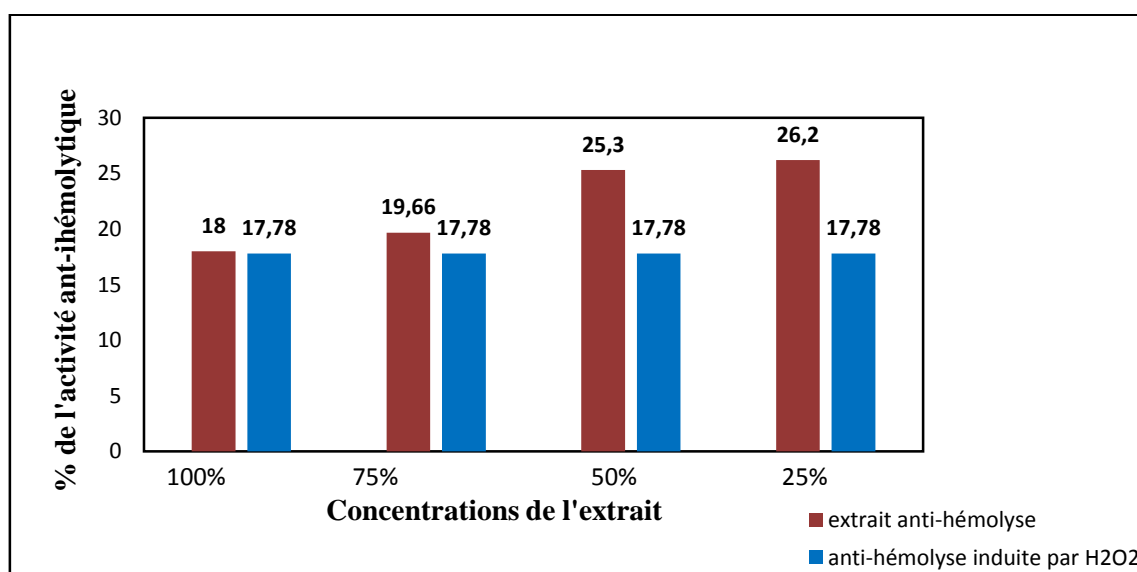
### B. Résultats de l'effet protecteur des extraits contre H2O2

❖ D'après les résultats (Figure 57), l'effet protecteur des infusés des parties aériennes contre H2O2 est élevé pour les dilutions de 25% avec un taux de protection de 26,2 % contre 17,78% pour le témoin, suivi des dilutions ,50% et 75% .L'extrait brut n'a pas révélé une protection

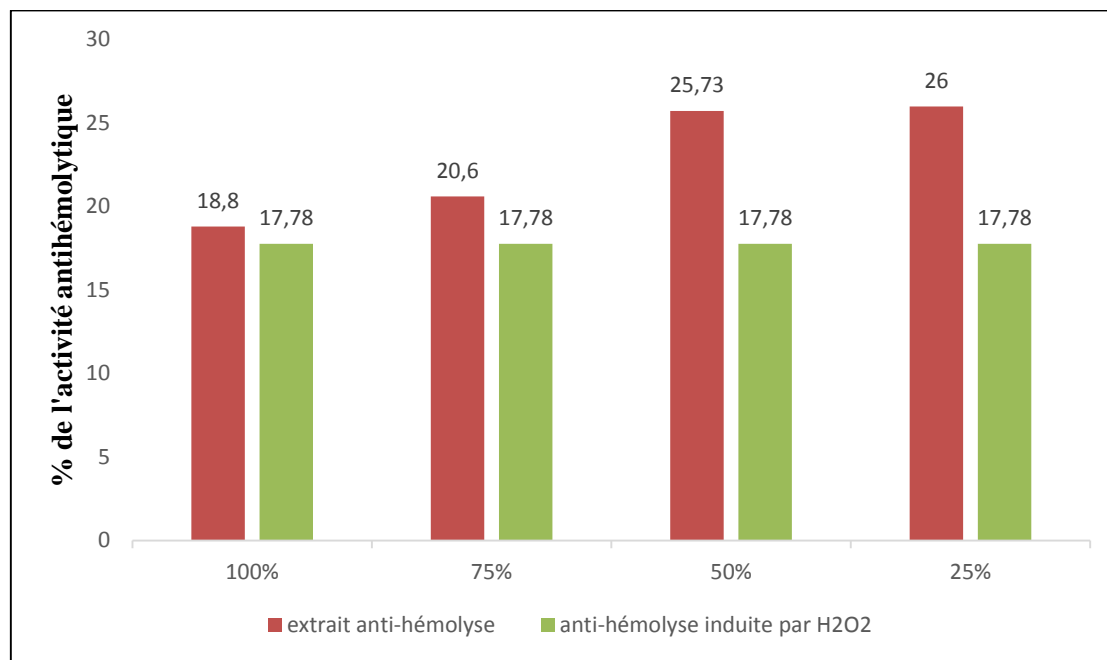
❖ L'extrait aqueux de décoction a donné une protection positive contre l'hémolyse induite par H2O2 pour l'ensemble des extraits (Figure 58). L'activité anti-hémolytique la plus élevée est enregistrée à la dilution de 25% pour un taux de protection de 26% .La valeur minimale est autour de la dilution de 75% et qui présente un taux de protection de 18,8% contre 17 ,78 % pour le témoin. D'une manière générale les résultats de la protection du décocté végétale sont proches de la protection des infusés

❖ Concernant l'extrait hydro-alcoolique, l'activité anti-hémolytique est positive pour l'ensemble des dilutions avec un maximum à des dilutions de 25% suivie de 50% et 75% dont le taux de protection est de 27% ; 26,3% et 22,6% respectivement (Figure 59). Cela montre que l'épinard peut diminuer l'effet toxique de H2O2 vis-à-vis des érythrocytes

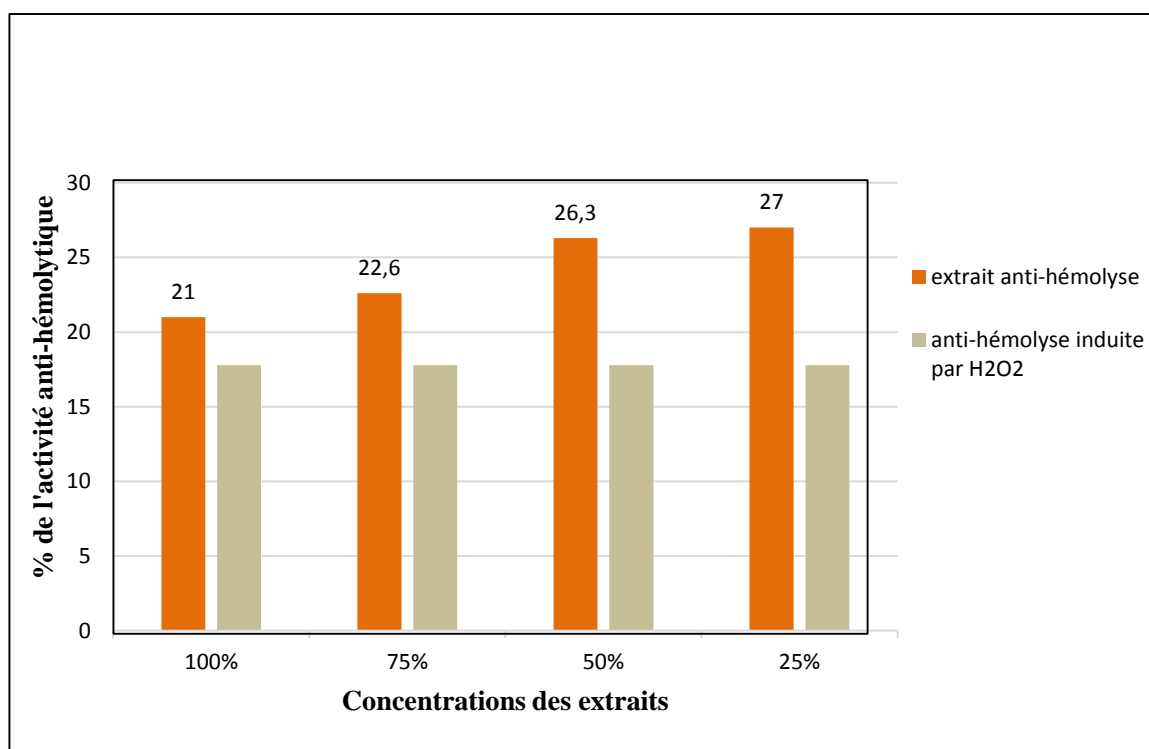
❖ L'extrait brut chloroformique a donné une activité anti-hémolytique inférieure à celle enregistrée par H2O2 sans extrait (Figure 60) indiquant une légère cytotoxicité, cela est peut être lié à la dose de l'extrait qui a créé le poison



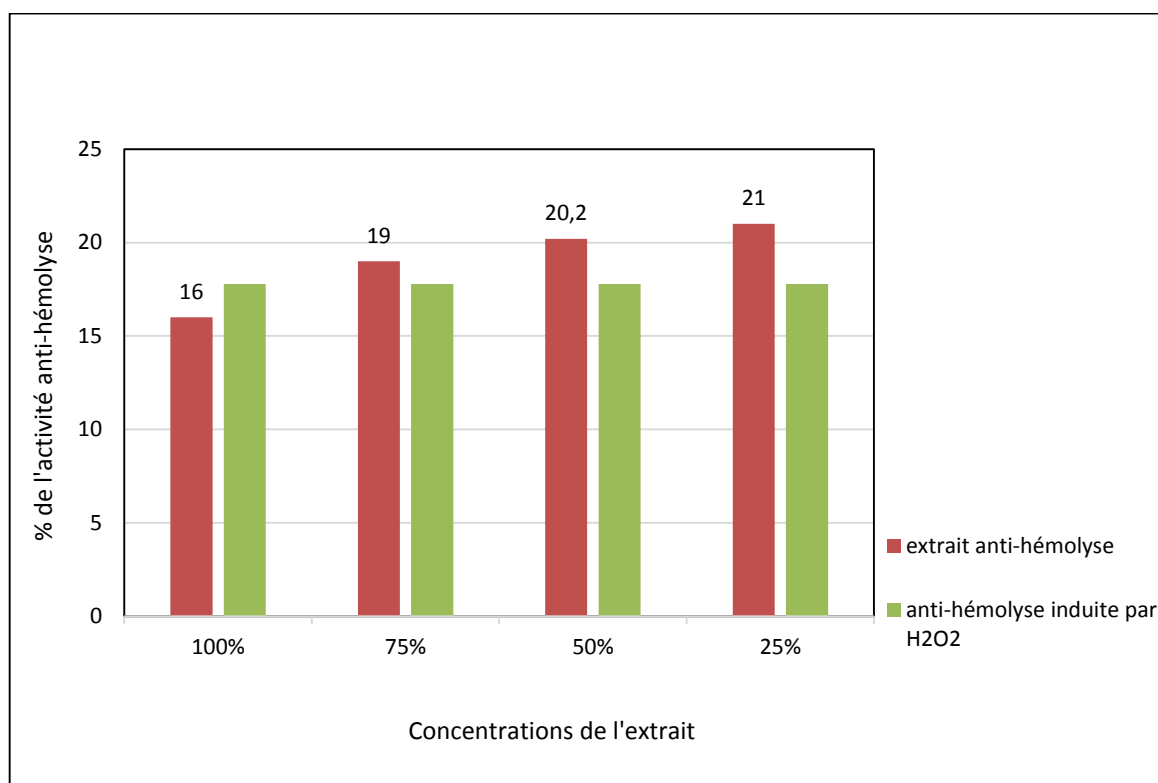
**Figure 57** : L'effet protecteur des infusés de l'épinard contre l'hémolyse induite par H2O2



**Figure 58** : L'effet protecteur des décoctés aqueux de l'épinard contre l'hémolyse induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Figure 59** : L'effet protecteur de l'extrait hydro-alcoolique de l'épinard contre l'hémolyse induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

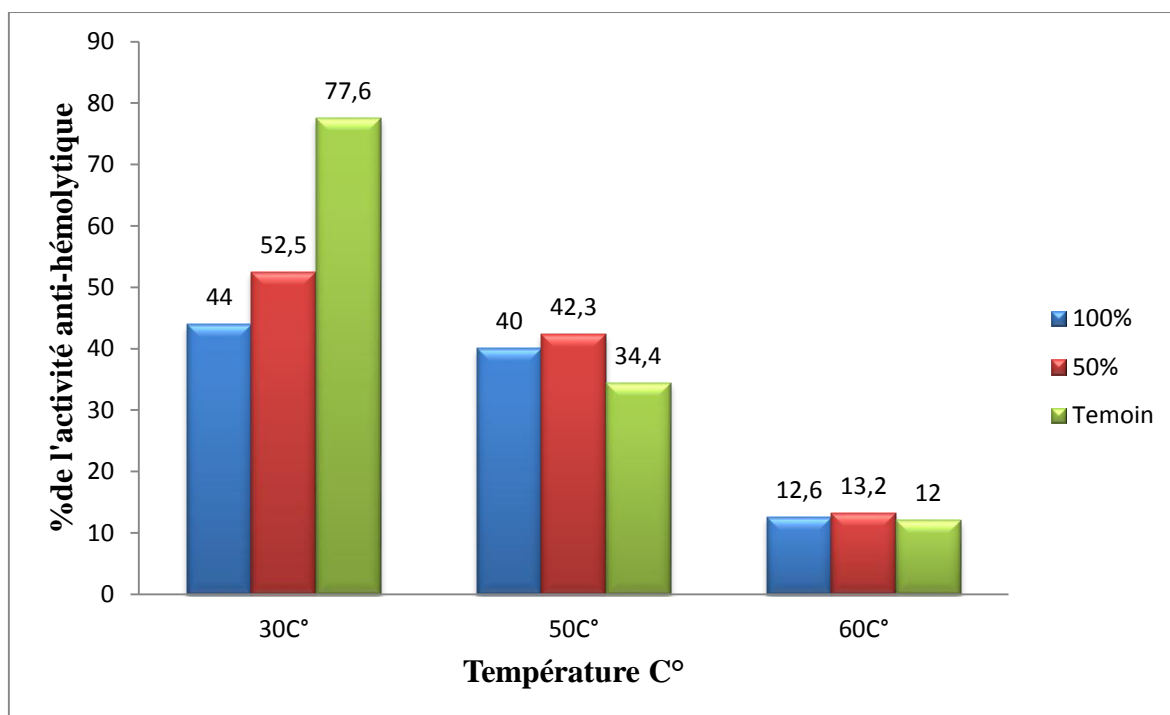


**Figure 60** : L'effet protecteur de l'extrait chloroformique de l'épinard vis-à-vis de l'hémolyse induite par H2O2

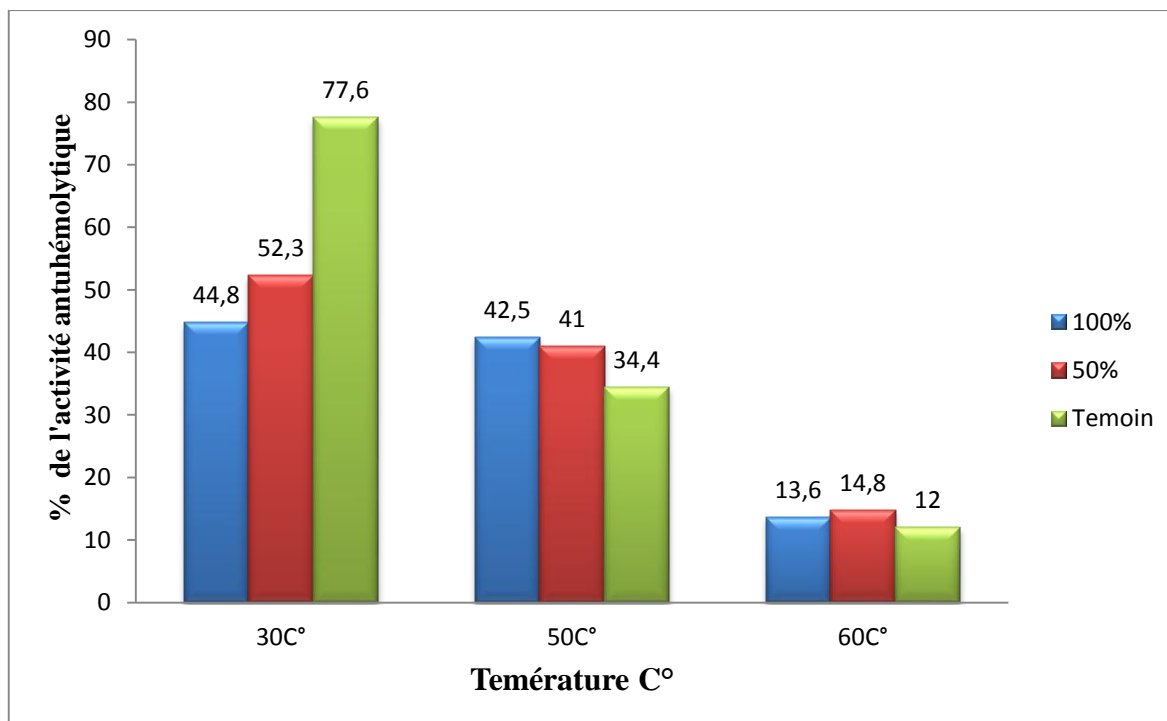
### C. Résultats de l'effet protecteur des extraits de l'épinard contre la thermo-hémolyse

Dans ce test l'effet hémolysant est induit par exposition de l'échantillon érythrocytaire contenant l'extrait végétal à des différentes températures (30 C°, 50 C°, 60 C°). Un témoin sans extrait est préparé. Les résultats sont regroupés dans les figures (61, 62, 63 et 64)

Les résultats de l'activité anti-hémolytique en présence des extraits de l'épinard contre la chaleur indiquent que quelque soient les dilutions pour l'ensemble des extraits, à la température 60 C° l'activité anti-hémolyse est faible et les valeurs du taux minimal de protection sont : 12,6% 13,6% ; 12,8% et 12,6% pour les extraits, infusion décoction ; hydro-alcoolique et chloroformique respectivement. A 30 C° la protection de l'épinard n'est pas inhibée vis-à-vis de la chaleur (Figures 61, 62, 63 et 64).

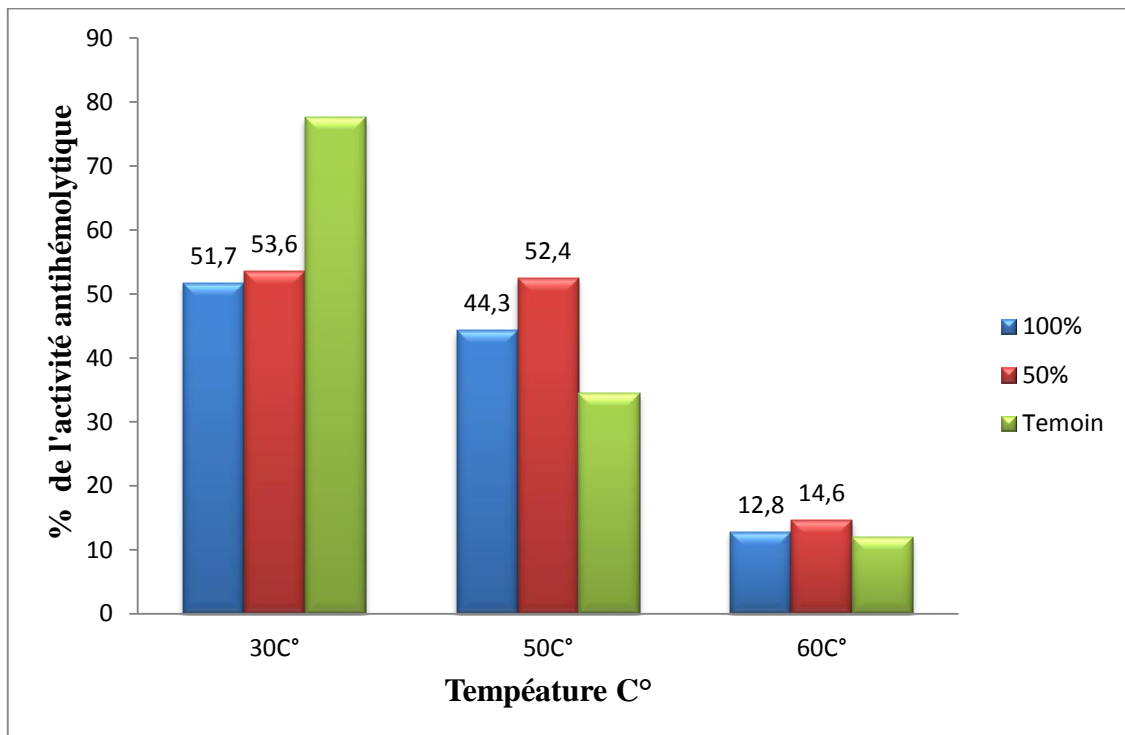


**Figure 61 :** Effet protecteur de l'infusé de l'épinard contre la chaleur

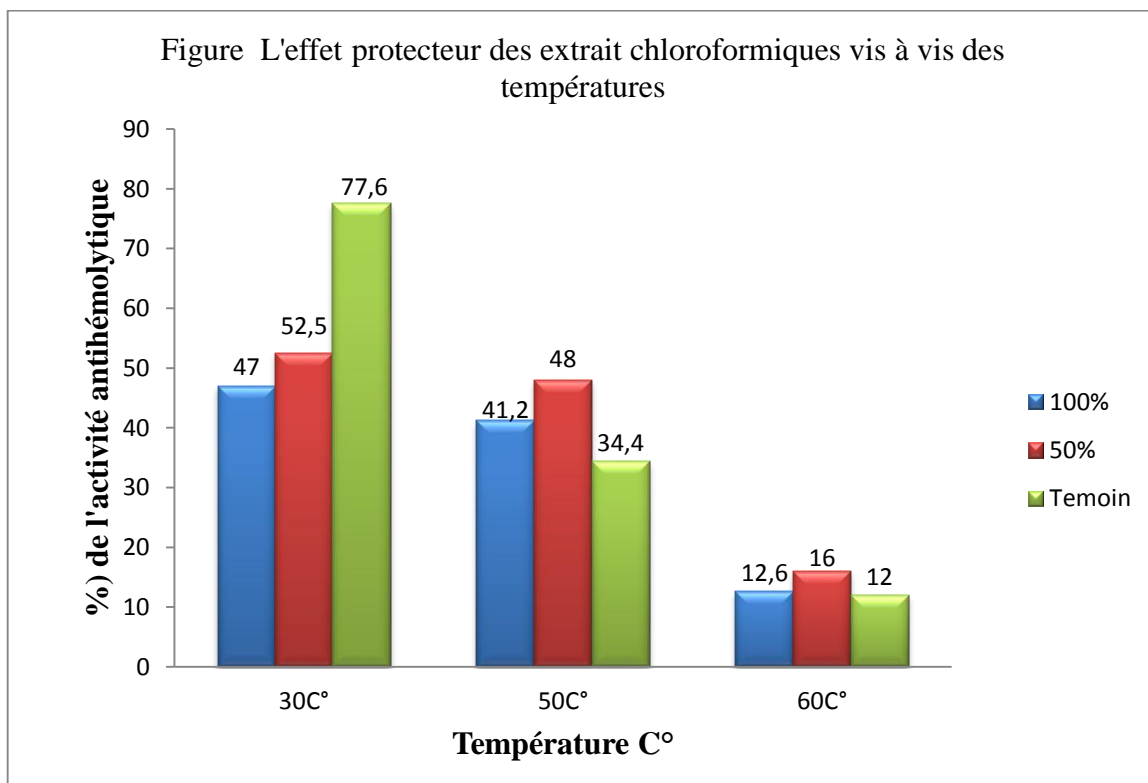


**Figure 62 :** Effet protecteur du décocté de l'épinard contre la chaleur





**Figure 63 :** Effet protecteur de l'extrait hydro-alcoolique de l'épinard contre la chaleur



**Figure 64 :** Effet protecteur de l'extrait chloroformique de l'épinard contre la chaleur

# Discussion générale

## Discussion générale

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative des extraits de plantes. Les conditions optimales ont été respectées concernant plusieurs paramètres tels que le diamètre de la poudre et le type du solvant : le broyage et le tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum de poudre fine. Le type d'extraction était varié entre l'infusion, la décoction, l'extraction alcoolique et par solvant chloroformique dans le but d'extraire le maximum de métabolites secondaires.

✚ L'analyse du criblage phytochimique des parties aériennes de l'épinard (*Spinacia oleacea*) a mis en évidence une richesse en molécules bioactives notamment les terpénoïdes, les alcaloïdes, tanins, composés réducteurs les stérols et les saponines. Grace à sa richesse minérale et phytochimique, les feuilles de l'épinard sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme, rafraîchissantes, antipyrétiques, diurétiques, maturantes, laxatives, digestibles, antihelmenthiques, utiles dans la concrétion urinaire, inflammation des poumons et des intestins, mal de gorge, douleur dans les articulations (**Metha et Belemkar, 2014**)

L'étude quantitative des extraits de l'épinard, par dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes. Le choix du dosage de ces substances réside dans le fait que la majorité des activités biologiques des plantes leur sont attribuées. Les polyphénol totaux ainsi que les flavonoïdes sont révélés positivement pour l'ensemble des extraits testés. Selon **Cabrac et al., (2012)** La teneur ainsi que la composition des extrais végétaux en composés phénoliques sont étroitement liées à la diversité des activités biologiques exprimées par les extraits végétaux. Il est rapporté que les flavonoïdes constituent les principes biologiques actifs de la plupart des plantes médicinales hypoglycémiques et propriétés antidiabétiques (**Verma, 2018**)

✚ La protection de l'épinard contre l'hémolyse du sang soumis à un stress osmotique, oxydatif et thermique a été vérifiée dans les extraits des parties aériennes. L'activité anti-hémolytique diffère selon le type d'extrait et la dilution, d'une manière générale les résultats ont révélés que l'épinard peut diminuer l'effet toxique de l'hypotonie du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la chaleur des érythrocytes humaines.

Un milieu hypotonique est un milieu dont la pression osmotique est plus faible que la pression intracellulaire ; ce déséquilibre induit une diffusion de l'eau vers l'intérieur de la cellule (milieu hypertonique) à travers la membrane. L'entrée massive d'eau dans l'hématie entraîne

son gonflement puis son éclatement et la libération de son contenu cytoplasmique notamment l'hémoglobine c'est le phénomène d'hémolyse. Ce dernier est observé à des concentrations en NaCl inférieures à 0,3%. Même résultat a été noté chez Citrus (**Larab et Makhoulf 2017**) et la mauve (**Aberrane et Mehalla 2019**) contre l'hémolyse hypotonique. **Chopade et al., 2012** a démontré que l'incorporation des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans la membrane des érythrocytes améliore la stabilité de ces dernières contre la lyse hypotonique

✚ Concernant la protection contre la toxicité par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour la majorité des extraits l'activité anti-hémolytique est positive notamment pour les dilutions de 25% et 50%. **Omale James et al, 2014** a révélé une activité anti hémolytique importante des extraits de *Gymnema sylvestre* contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le peroxyde d'hydrogène peut causer une toxicité par le radical hydroxyle : selon **Kose et Dogan (1995)**, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine libérant ainsi les ions Fe<sup>2+</sup> ce qui génère par la réaction de fenton le radical hydroxyle OH, plus puissant contribuant ainsi à la peroxydation lipidique.

✚ Les résultats de l'activité anti-hémolytique en présence des extraits de l'épinard contre la chaleur indiquent que quelque soient les dilutions pour l'ensemble des extraits, à la température 50°C la protection est améliorée. même remarque pour citrus et *Malva silvestris* L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la chaleur peut s'expliquer par l'interaction de l'extrait avec les protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation (**Lepock et al., 1989**). D'après **Gershfeld et Murayama (1988)** les érythrocytes exposés à des températures relativement élevées, se déforment progressivement pour devenir sphériques. Ainsi la perturbation de leurs membranes diminue leur capacité à résister à l'hémolyse

Plusieurs études ont été rapportés sur l'utilisations traditionnelles de l'épinard, citant les travaux de **Altemimi et al., (2017)** qui ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'épinard fraîches provoque une efficacité antibactérienne. Ainsi que les travaux de **Rao et al., (2015)** qui confirment que l'extrait de *S. oléacea* agit comme un agent puissant antioxydant, un anti-inflammatoire et anti-arthrosique. Les scientifiques ont découvert que les épinards peuvent être utilisés pour prévenir le cancer. La composition chimique et vitaminique unique des feuilles améliore les défenses immunitaires du corps contre les cellules cancéreuses (**De vogel et al., 2005**)

# Conclusion générale

### Conclusion générale

Le monde végétal reste toujours une source importante des principes actifs dotés de diverses propriétés thérapeutiques, le vif objectif de cette étude était la mise en évidence des composés phytochimiques et l'estimation in vitro de l'activité anti-hémolytique des extraits actifs de la partie aérienne d'une plante médicinale : *Spinacia Oleracea* L.

Pour se faire, dans un premier temps le screening phytochimique effectué, nous a permis de mettre en évidence que :

- cette plante est riche en tanins, flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes et stérols.
- elles sont dépourvues des saponines excepté le décocté chloroformique.
- Les coumarines sont présents au niveau de la décoction aqueuse.
- les quinones sont présents au niveau des extraits aqueux par infusion et décoction.

En ce qui concerne l'activité anti-hémolytique, celle-ci a été évaluée selon trois tests ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Na Cl, Température) :

❖ les résultats révèlent que l'épinard possède une activité anti-hémolytique la plus élevée est enregistrée à la dilution de 25% à un taux de protection de 26% dans l'extrait aqueux de décoction (positive) . Concernant l'extrait hydroalcoolique, l'activité anti-hémolytique est positive pour l'ensemble des dilutions avec un maximum à la dilution de 25% suivie de 50% et 75% dont le taux de protection est de 27% ; 26,3% et 22,6% respectivement. Pour l'extrait brut chloroformique a donné une activité anti-hémolytique inférieure à celle enregistrée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans extrait indiquant une légère cytotoxicité, cela est lié peut être à la dose de l'extrait qui a créé le poison .

❖ tandis que, contre l'hémolyse hypotonique (induite par le Na Cl) l'extrait de l'infusé de l'épinard dilué à 75% a révélé une protection à avec un taux de protection de 32,86%. dépassent celle du témoin. Les taux de protection des extraits hydro-alcooliques de l'épinard contre l'hémolyse hypotonique maximale révèle des pourcentages de protection inférieurs de ceux du témoin : 20,2 ; 22,8 ; 24,2 et 26,4%. Pour l'extrait brut., il présente la plus faible protection des GR contre l'hémolyse hypotonique

❖ Les résultats de l'activité anti-hémolytique en présence des extraits de l'épinard contre la chaleur indiquent que quelque soient les dilutions pour l'ensemble des extraits, à la température 60 C° l'activité anti-hémolyse est faible et les valeurs du taux minimal de protection sont : 12,6% ; 13,6% ; 12,8% ; 12,6% pour les extraits ,infusion décoction ; hydro-alcoolique ; chloroformique respectivement. A 30 C° la protection de l'épinard n'est pas inhibée vis-à-vis de la chaleur.

Les résultats obtenus suggèrent que les composants des extraits de *Spinacia Oleracea* pourraient être le principal constituant anti-hémolytique. En effet, le dosage des composés polyphénoliques par méthode colorimétrique a montré que la partie aérienne de *Spinacia Oleracea* est très riche en polyphénols et flavonoïdes. Ces derniers sont étroitement liés à l'activité anti-hémolytique de l'épinard exprimée par les extraits végétaux

***En perspectives,***

*Des analyses phytochimiques et biologiques plus détaillée seront nécessaire pour isoler et caractériser les composés actifs responsables des effets de stabilisation de la membrane pour mieux comprendre les mécanismes d'action exacts de ces activités*

# Références bibliographiques



Références bibliographiques

A

**AGUILAR M. (2007).** Erythrocytes -MB7 : Hématologie. Faculté de médecine ; Montpellier, France.

**Alborzi, S., Bastarrachea, L., Ding, Q.,Tikekar, R. V.(2018).** Inactivation of escherichia coli O157:H7 and Listeria innocuaby benzoic acid, ethylene diamine tetra acetic acid and their combination in model wash water and simulated spinach washing. *Journal of Food Science*, 83, 1032-1040.

**Altemimi, A., Lakhssassi, N., Abu-Ghazaleh, A., Lightfoot, D. A.(2017).** Evaluation of the antimicrobial activities of ultrasonicated spinach leaf extracts using RAPD markers and electron microscopy. *Archives of microbiology*, 199, 1417-1429.

B

**Bahare, S., Tugba, B.T.,Ozleyen, A., Gregorio, P.,Stefano, D.A., Jovana,R., Rabia, N.,Nosheen, A., Fhatuwani, X.,Labanca, F.,Milella, L., Nunziatina, D.T., Henrique, D., Coutinho.,JavadSharifi-Rad Deepa, R., Verma.,Martorell, M., Natália, M.(2019).** Plants of the genus Spinacia: From bioactive molecules to food and phytopharmacological applications. *Trends in food science & technology* ;88. 260-273.

**Béraud, J.(2014).** Le technicien d'analyses biomédicales, 2ème édition, P. 628-650, ISBN: 978-2-7430-1299\_1.

**Bertrand B. (2010)** .Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition. Editions de Terran (Collection Le Compagnon Végétal; N:01): 12 p.

**Boizot N. et Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra. 79-82

**BOIZOT N. et CHARPENTIER J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra. 79-82.

**Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales.P : 483-560.

### C

**Cazau-Beyret N. (2013)**-Prise en charges des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie:195 p.

**Chabrier, J.Y., (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie.Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1- 165P.

**Chakraborty, D., et B, Shah (2011).** "Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3(3): 192-199.

**Chaux C. et Foury C., (1994).** Productions légumières-Tome 2 : Légumes feuilles, tiges, fleurs, racines, bulbes. Editions Tec et Doc. Paris, 639.

**Cherief W., & Messaoudene N.** Etude comparative de l'activité antibactérienne de *Castrum nocturnum*, (Master en biologie, université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem).

### D

**De Vogel, J., Jonker-Termont, D.S., Van Lieshout, E.M., Katan, MB., Van der Meer, R.(2005).**Légumes verts, viande rouge et cancer du côlon: la chlorophylle prévient les effets cytotoxiques et hyperprolifératifs de l'hème dans le côlon du rat. *Carcinogenesis* ;26 ( 2), 387 à 393.

**Dicoteau, D.R. (2000).** Vegetable Crops. 221-237 Prentice Hall.

**Diogon T., (2002).** Isolement et caractérisation de messagers codant pour des peroxydases chez *Spinacia oleracea*. Thèse de Doctorat en science, 167p.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. *Food Chemistry*,97: 654-660.

**Dubost, É.; et A, Dupuis (2011).** "La prise en charge des anémies par carence." Actualités pharmaceutiques hospitalières 7(26): 10-17.

**Dupin H., Cuq J-L., (1992).** Alimentation et nutrition humaine, ESF Paris, 1533. Dykes L. et Rooney L-W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J. Cereal Sci.*, 44: 236-251.

### E

**Edenharder R., Grünhage D.(2003)** . Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.

**Ekaterina, K . (2019)** . Épinard : ses effets sur la santé

<https://sant.e.journaldesfemmes.fr > fiches-nutrition > 2593...>

**Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.

### F

**Federici, L., N, H, Loukili., J, Zimmer., S, Affenberger., F, Maloisel., E, Andrés. (2007).** "Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature." *La Revue de médecine interne* 28(4): 225-231.

**Fleurentin J., (2008).** Plantes médicinales tradition et thérapeutique, éditions Ouest France, France B.U. Santé Nantes : 104-105 p.

**Fouché JG, Marquet A, Hambuckers. (2000).** Les plantes observation du monde des plantes .Sart-Tiliman.

**Freitas M.V., Netto rde C., Da Costa Huss J.C., DE Souza T.M., Costa J.O., Firmino C.B. et Penha-Silva N. (2007).** Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 219–224.

**Fujita, N., Ayukawa, Y., Fuke, M., Teraoka, T., Watanabe, K., Arie, T., Komatsu, K. (2017).** Rapid sex identification method of spinach (*Spinaciaoleracea* L.) in the vegetative stage using loop-mediated isothermal amplification. *Planta*. 245(1), 221-226.

### G

**Ghimi, W. (2015).** Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: Ricinus communis et Jatropha curcas. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (Doctoral dissertation).

**Gupta, R.S., Singh, D.(2006).**Amelioration of CCl<sub>4</sub> – induced hepato suppression by spinacia oleracea L. leaves in wister albino rats. *Pharmacology online* 3, 267-278.

**Gupta, R.S.,Rakhi Sharma, T .(2006).**Une revue des plantes médicinales présentant activité antifertilité chez les hommes.*Éclat de produit naturel* ; vol. 5 (5), 2006, p. 389-410.

### H

**Hebbani, A, V., V, D, Reddy., V, Nallanchakravarthula. (2014).** "In Vitro Anti-hemolytic Activity of Terminalia arjuna (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract." *Ind. J. Adv. Chem. Sci* 3: 02-108.

### J

**James O et Alewo I M. (2014).**In vitro anti-hemolytic activity of Gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)induced hemolysis in human erytheocytes,2(7) :1-9p.

**James, O., et I, M, Alewo. (2014).** "In vitro antihemolytic activity of gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced haemolysis in human erythrocytes." *Am.J. Phytomed. Clin. Ther* 2: 861-869.

**Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongzossie, E.,Nkongmeneck, B.A., Mapongmetsem, P.M., et Tsabang, N., (2010).** Ethnobotanical uses of medicinals plants of two ethnoecological regions of Cameroon —*International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2 (3): 60-79.

### K

**Karumi Y ,Onyeyili P A, Ogugbuaja V O ,(2014).**identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M.blasmia* (baume du pomme) .*Journal of médecine and scientific.*4(3) :179-182p.nigeria.ISSN 1682-4474.

### L

**Lacoste, S. (2014).** Ma bible de la phytothérapie : Le guide de référence pour se soigner avec les plantes. Leduc.s Éditions, 648 p.

**Leporrier, M. (2008).** "Anémies hémolytiques auto-immunes." *Hématologie* 14(6): 432-441.

**Lhuillier, A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae) (Doctoral dissertation).

**Li, B., B, Smith., M, Hossain. (2006).** "Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzymeassisted extraction method." *Separation and Purification Technology* 48(2): 189-196.

**Limonier S., (2018).** La phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie, département bio-ingénierie pharmaceutique, Aix, Marseille université.

**LIPPI G., AVANZINI P., PAVESI F., BARDI M., IPPOLITO L., ALOE R. et FAVALORO E.J. (2011).** Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemia medica*: 21, 297-305.

### M

**Manaargadoo-Catin, M., A. Ali-Cherif., J, Poignas., C, Perrin. (2016).** "Hemolysis by surfactants—a review." *Advances in colloid and interface science* 228: 1-16.

**Mathilde , L.( 2020).** Épinards : Effets secondaires, contre-indications, bienfaits et conseils <https://umvie.com> > epinard-effets-secondaires-risques-

**Mohammedi Z.,(2013).**Etude phytochimique et Activités biologiques des quelques plante médicinales de la Région Nord et sud ouest de l'Algérie .Thèse de doctorat en biologie .Tlemcen ;170p.

**Moutsie, (2008)**-L'ortie, une amie qui vous veut du bien , l'encyclopedie d'utovie, Edition d'utovie.

**Munro D-B., et Small E. (1998).** Les légumes du Canada. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario) Canada : 437p.

**Muthu, S., et B, Duraira (2015).** "Inhibitory effect of hydroethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hemolysis in vitro." *Int J Pharm Pharm Res* 2:207-213.

## N

**Nabavi, S, F., S, M, Nabavi., W, Setzer., S, A, Nabavi., S, A, Nabavi., M, A, Ebrahimzadeh. (2013).** "Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits." *Fruits* 68(3): 185-193.

**Nogaret-Ehrhart A.S. (2003).**La phytothérapie Se soigner par les plantes., Edition Eyrolles :19-36 p

**Nonnecke I-L. (1989).** Vegetable production. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.  
Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. and Takahara Y., 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata* *Phytochem*, 33: 557 – 561.

## O

**Oloyde O I.(2005).**Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*.*Pakistan journal of nutrition* ;4(6) :379-381p.

## P

**Panda, V., Shinde, P. (2017).** Appetite suppressing effect of *Spinaciaoleraceain* rats: involvement of the short term satiety signal cholecystokinin.*Appetite*;113, 224-230.

**Portier, K., N, Kirschvink., N, Fellmann., J, Coudert., P, Legeux. (2007).** Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, Université de Liège.

**Potel A M .(2002)-** Les plantes médicinales au Sénégal (commune de Nguékokh, zone de la Petite Côte) Extraits du rapport du stage, sciences naturelles, effectué à Nguekokh : 22 p.

**Prohens J. and Nuez F., (2008).** Handbook of plant breeding Vegetables I. Ed. Springer, 189-236. 426p.

## Q

**Quettier-Deleu, C. Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C et Luyckx, M. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42

## R

**Rahman, H., M, C, Eswaraiah., A, M, Dutta. (2015).** "In-vitro anti-inflammatory and antiarthritic activity of *Oryza sativa* var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam)." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 15(1): 115-121.

**Rani, A, A., S, M, J, Punitha., M, Rema. (2014).** "Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in vitro study." *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* 4: 57-60.

**Rao, K.N.V., Tabassum, B., Babu, S.R., Yaja, A.,Banji, D.(2015).** Preliminary phytochemical screening of *spinaciaoleracea* L. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.* 4, 532-551.

## S

**Sakat S., Juvekar A.R. et Gambhire M.N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacology and Pharmacological Sciences.* 2(1):146-15.

**Selles, C., (2012).** Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacycluspyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux. ; 202-230.

**Sensri Kh. El BAR., Z. (2017).** Etude, Comparative de la composition chimique des feuilles de la plante *Hedera hélix* L. Algérienne et Allemande, mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master, Université des Frères Mentouri Constantine.

**Shobana Ser Vidhya R.(2016)** .Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *abutilon indicum*(linn.).world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 5(5) :1182-1196p.

### T

**Tabuti, J.R.S., et, dhillion, S., (2003).** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda:plants, use and administration. *J. Ethnopharmacology* 88: 19-44.

**Tougan, U.P., Théwis, A.(2020).**Covid-19 and food security in sub-saharan africa: implications and proactive measures to mitigate the risks of malnutrition and famine. *International journal of progressive sciences and technologies* ; Vol. 20 No. pp. 172-193.

**Trease E,Evans W C ,(1987).**pharmacognosy.nilliaire tinadali.london 13th edition :67-62p.

### U

**Urquiaga I, Leighton F. (2000).**Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile. *Biol. Res.* vol.33 n.2 Santiago.

### V

**Verma, S. (2018).** A study on medicinal herb *spinacia oleraceae* Linn: *amaranthaceae*. *Journal of drug delivery and therapeutics*; 8(4):59-61.

**Vutharadhi, S., Jolapuram, U., Kodidhela, L.D.(2017).**Nutraceutical inherent of *Spinaciaoleracea*Linn. methanolic leaf extract ameliorates isoproterenol induced



myocardial necrosis in male albino wistar rats *via* mitigating inflammation. *Biomed. Pharmacother* ;85, 239-247.

### W

**Wichtl M., Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. TEC & DOC.

### Y

**Yao. L .H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S.(2004)** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant.Food Human.Nutrition*, 59: page 113-122.

# *Annexe*

## 1- induction au Na Cl

**Tableau : Pourcentage (%) de l'hémolyse et anti-hémolyse induite par la concentration**

Concentration	0.2%,	0.3%	0.5%	0.7 %	0.9 %	1.8%
Extrait brut						
Hémolyse	68.46	59.34	48.2	16.3	15.6	45 .87
Anti-hémolyse	<b>31.54</b>	<b>40 ,66</b>	<b>51 .8</b>	<b>83.7</b>	<b>84.4</b>	<b>54.13</b>

**Tableau : (%) du test anti hémolyse des l'extraits infusion (induction de l'hypotonie Na Cl).**

Concentration de l'extrait (1)	0.2%,	0.3%	0.5	0.7%	0.9 %	01.8 %
100 %	<b>26.5</b>	<b>28</b>	<b>58</b>	<b>57</b>	<b>56</b>	<b>52</b>
<b>25 %</b>	<b>28</b>	<b>31.3</b>	<b>69 4</b>	<b>70</b>	<b>68.3</b>	<b>56.8</b>
<b>50 %</b>	<b>30.6</b>	<b>39.2</b>	<b>75. 8</b>	<b>73.6</b>	<b>70</b>	<b>60.5</b>
<b>75 %</b>	<b>32.86</b>	<b>53</b>	<b>82.3</b>	<b>83.3</b>	<b>83</b>	<b>61.2</b>
<b>Témoin</b>	<b>31.54</b>	<b>40.66</b>	<b>51.8</b>	<b>83.7</b>	<b>84.4</b>	<b>54.13</b>

**Tableau : (%) du test anti hémolyse des l'extraits Décoction en milieux aqueux (induction de l'hypotonie Na Cl)**

Concentration de l'extrait (2)	0.2%,	0.3%	0.5%	0.7%	0.9%	1.8%
100 %	22.2	30	48	49	48.3	42
<b>25 %</b>	<b>23</b>	<b>26.3</b>	<b>59.4</b>	<b>60</b>	<b>55</b>	<b>48.4</b>
<b>50 %</b>	<b>23.7</b>	<b>22.8</b>	<b>62</b>	<b>61.2</b>	<b>60</b>	<b>51</b>
<b>75 %</b>	<b>24.4</b>	<b>28</b>	<b>66</b>	<b>65.7</b>	<b>65</b>	<b>65.6</b>
<b>Témoin</b>	<b>31.54</b>	<b>40.66</b>	<b>51.8</b>	<b>83.7</b>	<b>84.4</b>	<b>54.13</b>

**Tableau : (%) du test anti hémolyse des l'extraits Décoction en milieu hydro alcoolique (induction de l'hypotonie Na Cl)**

Concentration de l'extrait (3)	0.2%,	0.3%	0.5%	0.7%	0.9%	1.8%
100 %	20.2	24.2	38	39	40.3	40
<b>25 %</b>	<b>22.8</b>	<b>25.3</b>	<b>49.4</b>	<b>50</b>	<b>52</b>	<b>41.4</b>
<b>50 %</b>	<b>24.2</b>	<b>28.8</b>	<b>52</b>	<b>51.2</b>	<b>50</b>	<b>42</b>
<b>75 %</b>	<b>26.4</b>	<b>29.2</b>	<b>60</b>	<b>55.7</b>	<b>62.4</b>	<b>47.6</b>
<b>Témoin</b>	<b>31.54</b>	<b>40.66</b>	<b>51.8</b>	<b>83.7</b>	<b>84.4</b>	<b>54.13</b>

**Tableau :** (%) du test anti hémolyse des l'extraits Décoction en milieu chloroformique (induction de l'hypotonie Na Cl)

<b>Concentration de l'extrait (4)</b>	0.2%,	0.3%	0.5%	0.7%	0.9%	1.8%
100 %	18.2	20.2	28	30.9	30.3	26
<b>25 %</b>	<b>19.8</b>	<b>25.3</b>	<b>49.4</b>	<b>44</b>	<b>43.8</b>	<b>28.5</b>
<b>50 %</b>	<b>24.2</b>	<b>28.8</b>	<b>52</b>	<b>45.2</b>	<b>45.2</b>	<b>30.2</b>
<b>75 %</b>	<b>26.4</b>	<b>29.2</b>	<b>60</b>	<b>51.7</b>	<b>52.4</b>	<b>32.6</b>
<b>Témoin</b>	<b>31.54</b>	<b>40.66</b>	<b>51.8</b>	<b>83.7</b>	<b>84.4</b>	<b>54.13</b>

### Induction par la température

**Tableau :** Pourcentage (%) de l'hémolyse et anti-hémolyse induite par la température

Température	<b>30°</b>	<b>50°</b>	<b>60°</b>
Extrait brut			
Hémolyse	22.4%	65.6%	88%
Anti-hémolyse	<b>77.6%</b>	<b>34.4%</b>	<b>12%</b>

**Tableau :** Les Pourcentage (%) anti-hémolytique de l'infusé contre la chaleur

[C] de l'extrait	<b>30°</b>	<b>50°</b>	<b>60°</b>
<b>100 %</b>	44	40	12.6
<b>50 %</b>	52.5	42.3	13.2
<b>Témoin</b>	77.6	34.4	12

**Tableau :** Les Pourcentage (%) anti-hémolytique du décocté hydro-alcoolique contre la chaleur

[C] de l'extrait	<b>30°</b>	<b>50°</b>	<b>60°</b>
<b>100 %</b>	51.7	44.3	12.8
<b>50 %</b>	53.6	52.4	14.6
<b>Témoin</b>	77.6	34.4	12

**Tableau: Les Pourcentage (%) anti-hémolytique du décocté chloroformique contre la chaleur**

<b>[C] de l'extrait</b>	<b>30°</b>	<b>50°</b>	<b>60°</b>
<b>100 %</b>	47	41.2	12.6
<b>50 %</b>	52.5	48	16
<b>Témoin</b>	77.6	34.4	12