



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie

UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Pharmaco-toxicologie

Par

KIRIA DOUAA

&

BOUCHACHI RAHMA

Thème :

Activité Cytotoxique par Test de l'Hémolyse de l'Huile de *Ricinus communis* L

Soutenue le 26/ JUN/2023

devant le jury composé de :

Présidente	HAMMADI. K	Pr	Université de Mostaganem
Encadrante	KRIBI. S	MCB	Université de Mostaganem
Examinatrice	BELARBI. A	MCA	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023



Remerciements



Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, Le clément la miséricorde de nous avoir donné la force et la patience de mener le fruit de notre carrière d'étude.

A notre chère Encadrante

Mme **Kribi Soraya**

Pour ses aides, ses encouragements et ses conseils judicieux durant toute la période de notre travail.

Aux membres du jury

Nous remercions particulièrement **Mme Hammadi Keira** Pour avoir accepté de présider le jury

Nous tenons également à présenter nos plus vifs remerciements à **Mme Belarbi Amaria**


qu'elle nous a faite en acceptant d'examiner ce

Travail. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

A nos enseignants

Nos profondes reconnaissances s'adressent à tous les enseignants du département de Biologie qui ont contribué à notre formation tout le long de notre cursus universitaire.

Nous remercions aussi les membres du laboratoire de biochimie pour leur gentillesse et leurs soutiens.



Dédicaces

Dieu tout Puissant merci pour le pouvoir et le courage que vous m'a donné pour compléter ce travail.

A mes très chères parents ma mère **Fouzia** et mon père **Chafik** en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur sacrifice et leur soutien tous au long de mes études, aucun mot ne pourra exprimer ma gratitude et mon estime pour vous.

Que dieu leur prête santé.

A mes très chers grands-pères **Djamila** et **Amar** cher frère, et mes sœurs
Pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille

A l'encadrant Mme **Kribi Soraya**

A mon binôme, **Kiria Douaa**

Rahma



Dédicaces

Avant toute, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience

Je dédie ce travail à :

À mes très chères parents, ma mère **Souad** et mon père **Larbi** pour le soutien et les encouragements qu'il m'ont fournis tout au long de cette période, Et leurs aide pour moi à surmonter les difficultés que j'ai rencontrées lors de cette memoire

A mes très chères sœurs **Maroua** et **Hidayat**, et mon cher frère **Walid** Pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille

A l'encadrant Mme **Kribi Soraya**

A mon binôme, **Bouchachi Rahma**

Et à tous ceux qui m'ont aidé dans ce modeste travail.

Douaa

Résumé

Notre étude a pour objectif de tester la cytotoxicité de *Ricinus communis* L sur les érythrocytes humaines ainsi que quelques paramètres phytochimique ont été évalués

L'extraction aqueuse des parties aériennes par infusion et décoction a été réservée au criblage phytochimiques de la plante. L'huile des graines a été extraite par entrainement à la vapeur d'eau (soxhley) en présence d'un solvant qui est l'hexane. Les résultats des tests phytochimiques ont révélé la présence des métabolites secondaires notamment les tanins et les saponines pour les deux types extraits. Le test de l'hémolyse des graines du ricin a été appliqué sur les hématies pour une durée de 90mn et les résultats montrent que l'huile végétale possède un effet hémolytique plus élevé pour les extraits brut avec un pourcentage d'hémolyse de 66.88% après 45mn et 62.3% après 30 mn. Pour les dilutions de 50% les valeurs sont autour de 47.49 et 53.32 après 15mn et 45 mn d'incubation respectivement.

La toxicité du ricin sur les globules rouges augmente avec les concentrations des extraits et le temps d'incubation

Mots clés : *Ricinus communis* ; Extraits aqueux ; L'huile végétale ; Hémolyse

Abstract

Our study aims to test the cytotoxicity of *Ricinus communis* L on human erythrocytes as well as some phytochemical parameters have been evaluated.

The aqueous extraction of the aerial parts by infusion and decoction has been reserved for the phytochemical screening of the plant. The seed oil was extracted by steam distillation (soxhley) in the presence of a solvent which is hexane. The results of phytochemical tests revealed the presence of secondary metabolites including tannins and saponins for both types of extracts. The castor seed hemolysis test was applied to the red blood cells for a period of 90 minutes and the results show that vegetable oil has a higher hemolytic effect for the crude extracts with a hemolysis percentage of 66.88% after 45 mins and 62.3% after 30 mins. For the 50% dilutions the values are around 47.49 and 53.32 after 15 min and 45 min of incubation respectively.

The toxicity of castor on red blood cells increases with the concentrations of the extracts and the incubation time

Keywords: *Ricinus communis* ; Aqueous extracts ; vegetable oil ; Hemolysis

ملخص

تهدف دراستنا إلى اختبار السمية الخلوية لـ *Ricinus communis* L على كريات الدم الحمراء البشرية بالإضافة إلى بعض المعايير الكيميائية النباتية التي تم تقييمها.

تم حجز الاستخراج المائي للأجزاء الهوائية عن طريق التسريب و ديكوتيون للفحص الكيميائي النباتي. تم استخلاص زيت البذور عن طريق التقطير بالبخار (soxhley) في وجود مذيب وهو الهكسان. أظهرت نتائج الاختبارات الكيميائية النباتية وجود مستقلبات ثانوية تشمل التانينات والصابونين لكلا النوعين من المستخلصات .

تم تطبيق اختبار انحلال الدم لبذور الخروع على خلايا الدم الحمراء لمدة 90 دقيقة وأظهرت النتائج أن الزيت النباتي له تأثير انحلاي مرتفع بالنسبة للمستخلصات الخام بنسبة انحلال دم 66.88% بعد 45 دقيقة و 62.3% بعد 30 دقيقة . بالنسبة للتخفيفات بنسبة 50% ، تكون القيم حول 47.49 و 53.32 بعد 15 دقيقة و 45 دقيقة من الحضانة على التوالي.

تزداد سمية الخروع على خلايا الدم الحمراء بتركيز المستخلصات وزمن الحضانة

الكلمات المفتاحية : نبات الخروع ؛ مستخلصات مائية ؛ زيت نباتي ؛ انحلال الدم

Liste des abréviations

Ab : Absorbance

°C : degré Celsius

DO : Densité optique

g: Gramme

Hv : Huile végétale

M : Masse

mg EAG/g : milligramme équivalent d'acide gallique par gramme

mg/ml : Milligramme par kilogramme

MHe : la masse d'huile extraire en g

ml : millilitre

Mn : Minute

Nm : Nanomètre

PBS : Phosphate Buffered Saline

PPT : Polyphénols totaux

R : Rendement

µg/ml : Microgramme par millilitre

µl : Microlitre

UV : Ultraviolet

Liste des Figures

N°	Titres des Figures	Pages
01	Représentation schématique d'une presse à vis (AlSofi et <i>al</i> 2020)	10
02	Principe d'extraction par CO ₂ supercritique à partir du diagramme de phases (Benaissi, 2013).	11
03	Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet	12
04	Les feuilles de <i>R. communis L</i>	14
05	(A) Les graines de <i>R. communis L</i> et (B) <i>Les fruits de R. communis L</i>	14
06	Les globules rouges	18
07	Présentation du <i>Ricinus communis L.</i> (A : Feuilles et raméaux B : Graine)	23
08	Préparation de l'échantillon du ricin. (A : feuille séché B : broyage des feuilles)	24
09	Protocole de préparation de la solution d'infusion	25
10	Protocole de préparation de la solution de décoction	25
11	l'extraction de l'huile de <i>Ricinus communis</i> (A : Soxhley B : le rota-vapeur	28
12	Schéma d'extraction de l'huile à partir des graines de rici	29
13	Mise en évidence des flavonoïdes	33
14	Mise en évidence des alcaloïdes	33
15	Mise en évidence des saponines	34
16	Mise en évidence des tanins.	34
17	Mise en évidence des anthocyanes.	35
18	% de l'effet hémolytique de l'huile brut du ricin vis à vis des hématies	36
19	%de l'effet hémolytique de l'huile (dilution à 50%) du ricin vis à vis des hématies	37
20	%de l'effet hémolytique de l'huile dilution à 75%) du ricin vis à vis des hématies	37

Liste des tableaux

N°	Titres des Tableaux	Pages
01	Classification de <i>Ricin communis</i> L. (Linné, 1753).	13
02	Mmatériels et produit chimique de laboratoire utilisés	25
03	Tests phytochimiques des feuilles de <i>Ricinus communis</i> (Extrait aqueux par infusion et décoction).	32
04	Teneur en polyphénols (μg EAG/mg d'extrait)	35

Remerciement	
Les dédicaces	
Résumé	
Liste des abréviations	
Listes des Figures	
Liste des Tableaux	

Table des Matières

Partie synthèse bibliographique

Chapitre 1. Plantes médicinales

Introduction.....	1
1. 1. Généralités.....	4
1. 2. Définition des plantes médicinales.....	4
1. 3. L’histoire des plantes médicinales.....	4
1. 4. L’action des plantes médicinales.....	5
1. 5. Les métabolites primaires.....	5
1. 6. Les métabolites secondaires.....	6
1.7. Composition chimique des huiles végétales.....	9
1. 8. L’extraction d’huile végétale.....	10
1. 8. 1. L’extraction mécanique par pressage.....	10
1. 8. 2. L’extraction par solvant.....	10
1. 8. 3. L’extraction par fluides supercritiques.....	11
1. 8. 4. L’extraction par Soxhlet.....	11
1. 8. 5. Extraction par voie biologique.....	12

Chapitre 2. Présentation du Ricin « *Ricinus communis* »

2. 1. Généralités.....	13
2. 2. Classification taxonomique.....	13
2. 3. Caractéristiques botaniques.....	13
2. 3. 1. Une partie aérienne.....	14

2. 3. 2. Une partie souterraine.....	15
2. 4. Origine et Habitat.....	15
2. 5. Composition chimique.....	15
2. 6. Propriété pharmacologique.....	16
2.7. Toxicité du ricin.....	16

Chapitre 3. Généralité sur l'hémolyse

3. 1. Généralité sur le sang.....	17
3. 2. Les globules rouges.....	17
3. 3. Morphologie normale et la forme pathologique du globule rouge.....	18
3. 4. La membrane du globule rouge.....	19
3. 5. Définition de l'hémolyse.....	19
3. 6. Pathologie.....	20
3. 6. 1. Hyper hémolyse et les maladies associées.....	20
3. 6. 2. Anémies hémolytiques corpusculaires.....	20
3. 6. 3. Anémies hémolytiques non corpusculaire.....	21
3.6. 4. Anémies résultantes d'une carence nutritionnelle.....	21

Partie Expérimentale

Chapitre 1. Matériel et méthodes

1. Matériels et méthodes.....	23
1. 1. Objectif de l'étude.....	23
1. 2. Matériel biologique.....	23
1. 3. Matériel de laboratoire.....	24
1. 4. Méthodes.....	24
1. 4. 1. Les tests phytochimiques.....	24
1. 4. 1. 1. Préparation de la matière végétale.....	24
1. 4. 1. 2. Préparation des extraits aqueux.....	25
1. 4. 1. 3. Protocole expérimental des tests phytochimiques.....	26
1. 4. 2. Les Tests de l'activité hémolytique.....	37
1. 4. 2. 1. Extraction d'huile de ricin.....	27

A. Traitement des graines.....	27
B. Extraction de l'huile végétale par soxhlet.....	28
1. 4. 2.2. Protocole expérimental des tests hémolytiques.....	29
A. Préparation de la solution tampon (PBS) Phosphate Buffered Saline à Ph 7.2.....	29
B. Evaluation de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges.....	30

Chapitre 2. Résultats et interprétations

2. Résultats et interprétations.....	32
2.1. Résultats sur l'extraction.....	32
2. 2. Résultats des tests phytochimiques.....	33
2. 3. Résultat de l'activité hémolytique de l'huile de ricin.....	36
 Conclusion	 38
Références bibliographiques.....	40



Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En effet, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires.

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

La notion de dose est déterminante. Certaines plantes utilisées à visé thérapeutique peuvent à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme (**Fourasté, 2000**), Il est donc nécessaire d'identifier la partie de la plante utilisable. En effet, le principe actif d'une plante toxique peut être réparti sur toute la plante ou dans une ou plusieurs de ses parties : la racine, les baies ou les feuilles (**Soulaymani, 2010**).

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

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

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

Parmi les plantes toxiques *le Ricinus communis*, appartient à la famille des Euphorbiacées qui est d'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent essentiellement par leur latex blanc, irritant la peau. Le ricin est originaire d'Afrique tropicale, il s'est répandu un peu partout dans le monde, là où le climat le permettait. On le retrouve aussi sous des climats subtropicaux, mais également sous les climats tempérés.

Cette plante est communément appelée en Algérie sous le nom de « Kharouaa », qui est la cause de plusieurs intoxications survenant surtout en période de maturation des graines due à la présence des glycoprotéines hautement toxique. C'est dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel consiste à étudier la toxicité cytologique de l'huile de ricin sur les hématies humaines par des tests de l'activité hémolytique. Quelques métabolites secondaires ont été évalués qualitativement.

Notre mémoire est articulé en deux parties distinctes :

La première partie propose une mise au point bibliographique concernant les plantes médicinales, une présentation de la plante étudiée (*Ricinus communis* L) 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 hémolytique de cette plante vis-à-vis les globules rouges, Quelques paramètres phytochimiques ont été évalués Le deuxième chapitre présentera les résultats obtenus avec leurs interprétations qui seront suivis d'une conclusion générale.



Partie.

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Les plantes médicinales

1. 1. Généralités

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature pour traiter et soigner des maladies (Sanago, 2006). L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement une région d'intérêt auprès du public, selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.,2003) environ 65- 80% de la population mondiale a recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne.

1. 2. Définition des plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante dont les organes (les feuilles l'écorce ou fruits...etc.) possèdent des vertus curative et parfois toxiques selon son dosage. (Messaudi, 2008), Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée à l'état frais ou sous la forme desséchée (Fouché et al, 2000). L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication de médicaments (Mohammedi, 2013).

Il existe une définition officielle des plantes médicinales, c'est ceux qui ont une inscription à la pharmacopée. Selon le code de la santé publique la pharmacopée les considère comme médicaments, leur vente est le monopole des pharmaciens et des herboristes. Donc on appelle une plante médicinale toute plante ayant des propriétés thérapeutiques. Actuellement et Grace aux progrès scientifiques la thérapeutique à beaucoup évoluée et a utilisé la plante comme matière première pour la production des médicaments (Chevallier, 2001).

1. 3. L'histoire des plantes médicinales

L'homme a toujours utilisé les plantes à des fins thérapeutiques. L'emploi de ces plantes est très valorisé dans toutes les traditions médicales, il y a deux cents ans encore les moyens thérapeutiques naturels étaient les seuls remèdes dont disposait l'humanité. Leur utilisation et leurs effets ont donc été minutieusement étudiés, documentés et développés. (Grünwald et Jänicke, 2006). Les soins par les plantes, aussi appelées phytothérapie, est une science millénaire très ancienne basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. Il est très difficile d'établir avec précision l'origine de la première utilisation des plantes par les humains comme thérapie car toutes les cultures les ont utilisées à un moment de leur histoire comme source de traitement ; La phytothérapie a été pendant des

siècles, utilisées par les chamans, les druides et les prêtres dans leurs pratiques mystiques et c'est au fil des siècles que l'homme a su exploiter les vertus thérapeutiques des plantes (Iserin et al, 2001)

1. 4. L'action des plantes médicinales

Dans les cas extrêmes, l'action de la médecine moderne soulage les partis de manière indéniable et sauve de nombreuses vies. Un article apparu dans la presse en 1993, décrivant la situation catastrophique dans laquelle se trouvaient un hôpital de Sarajevo, la capitale bosniaque assiégée, signalait que les médecins, totalement dépourvus de médicaments, étaient contraints d'utiliser une plante très répandue en Europe, la valériane (*Valeriana officinalis*), comme analgésique et anesthésiant pour soigner les blessés.

Cette plante, efficace pour soulager l'anxiété et la tentions nerveuse, possède des principes actifs à effets sédatifs, dont le mécanisme d'action n'est pas encore connu. Les médicaments chimiques peuvent enrayer les infections bien plus efficacement que bien d'autres traitements. De même, les techniques chirurgicales modernes augmentent les chances de vaincre ou de soigner des maladies et des blessures graves. (Botrel et al. 2007).

1.5. Les métabolites primaires

Les premiers produits de photosynthèse sont des substances de bas poids moléculaires tels : lessucres ; les acides gras et les acides aminés.

❖ Les lipides

Sont des substances naturelles, constituées d'esters, d'un alcool ou d'un polyol et d'acides gras. Ce sont des substances hydrophobes et parfois amphiphiles, solubles dans les solvants organiques polaires et apolaires et sont non volatils. Ils rentrent dans les constituants de structures cellulaires tels : les glycolipides, les phospholipides membranaires, ils savent aussi être des éléments de revêtement comme les cires ou les cutines, toutefois aussi des substances de réserves, sources d'énergies (Bruneton, 1999).

❖ Les glucides

Ce sont des composés universels du monde vivant, chez les végétaux parfois appelés hydrates de Carbone (ce sont des composés organiques carbonylés poly hydroxylés). Ils représentent pour les végétaux : Un moyen de stockage de l'énergie solaire, ils forment le groupe le plus important, sous forme de polymères (amidon) ; Des éléments de soutien, ils participent à la structure du végétal (cellulose...) ; constituants de métabolites (les enzymes, acides nucléiques ...) ; Des précurseurs des autres métabolites (Bruneton, 1999).

❖ Les protéines

Constituées principalement d'acides aminés, elles jouent un rôle fonctionnel (les enzymes) et un rôle dans la structure du végétal. Le rôle diététique des protéines végétales est loin d'être négligeable mais également leur utilisation en pharmacie aussi bien dans le domaine médicale ou industriel (chimique ou agroalimentaire) (Bruneton, 1993)

1. 6. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des organismes vivants, contrairement aux métabolites primaires. Ils sont plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons, mais on les découvre également chez certains groupes animaux. (Gravot, 2009). Les métabolites secondaires présentent une infinie variété de substances, dont le rôle dans la plante est encore souvent mal connu. Un grand nombre de ces métabolites secondaire présente des propriétés pharmacologique intéressantes par fois exploitées dans un but thérapeutiques, soit après extraction à partir de la plante, (morphine du pavot, quinine de quinquina...etc) soit directement, on utilise alors la plante ou une préparation simple issue de la plante (poudre, teinture, extrait...etc). (Bénédicte, 2007)

❖ Les alcaloïdes

Initialement définis comme des substances naturelles azotées à réaction basique fréquente issus d'acides aminés. D'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe : leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative, pour certains auteurs, ils sont issus du seul règne végétal. En général, ils portent le nom du végétal qui les contient (Kunkele et Lobmeyer, 2007). Tous les alcaloïdes ont une action physiologique intense, médicamenteuse ou toxique. Très actifs, les alcaloïdes ont donné naissance à de nombreux médicament (Ali-Delille, 2013). Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont bio-synthétiquement formés à partir D'un acide aminé. Ces éléments caractérisent ce que l'on peut appeler les alcaloïdes vrais. Le plus souvent, Les pseudo-alcaloïdes présentent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

Les alcaloïdes possèdent des effets thérapeutiques variés : Action dépressive (morphine, scopolamine...) ou stimulante (caféine, strychnine) sur le système nerveux centrale ;Action sympathomimétique (éphédrine) ou sympatholytique (yohimbine, certains alcaloïdes de l'ergot de seigle), parasymphatomimétique (physostigmine, pilocarpine), anti cholinergique (atropine, hyoscyamine) ou ganglioplégique (nicotine, spartéine) sur le système nerveux autonome ;

Action anti tumorale (vinblastine, ellipticine) ; Action curarisante, anesthésique locale (cocaïne) ; Action antifibrillante (quinidine) ; antipaludique (quinine) et amibicide (émétine). Ce qui conduit à une large utilisation des plantes à alcaloïdes dans différents traitements soit sous forme de préparations galéniques ou comme matières premières pour les extractions industrielles, mais un usage qui reste délicat suite à leurs puissants effets (Bruneton, 1999)

❖ Les tanins

C'est un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (Hopkins, 2003). Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent avec les réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Il existe deux catégories : les tanins condensés (proanthocyanidols) et les tanins hydrosolubles (tanins galliques et ellagiques) qui diffèrent par leur structure chimique et l'origine biogénique. Cette substance possède en outre des propriétés antiseptiques mais également antibiotiques, astringentes, anti-diarrhéiques, anti-inflammatoires, hémostatiques et Vasoconstrictrices (diminution du calibre des vaisseaux sanguins). Les plantes contenant du tanin sont par exemple le chêne (Kunkele et Lobmeyer, 2007).

La majorité des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir de former des complexes avec les macromolécules particulièrement avec les protéines (enzymes digestives et autres, protéines fongiques ou virales). Il en est de même des problèmes qu'ils peuvent poser dans l'industrie agroalimentaire (trouble dans les bières), ou en agriculture (valeur nutritive des fourrages, formation des acides humiques). Par voie externe, ils imperméabilisent les couches externes de la peau et des muqueuses protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels également. Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlures.

❖ Les flavonoïdes

Ils sont à l'origine de la coloration des feuilles, fleur, fruit ainsi que d'autres parties végétales. Les trois groupes principaux existants sont les flavanols, flavonones et flavones (Kunkele et Lobmeyer, 2007). Les flavonoïdes sont des antibactériennes (Wichtl et Anton, 2003). Les propriétés des flavonoïdes sont aujourd'hui largement étudiées dans le domaine médical : activité antivirale, anti tumorale, anti inflammatoire, anti allergique et anticancéreuse (Bessas et al, 2008), antioxydants d'où leur usage pour le maintien d'une bonne circulation, veinotrope et protecteurs capillaires, hepatoprotecteurs et antithrombotiques

Les flavonoïdes lato sensu sont des pigments presque universels des végétaux. Quasiment toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, tel les flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols), les anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (Bruneton, 1999). Retrouvés généralement dans les plantes vasculaires où ils peuvent se localiser différentes parties de la plante telle les racines, tiges, feuilles, fleurs et les fruits (Laurant-Berthoud, 2013). Plus de 4 000 des flavonoïdes, ont une origine biosynthétique commune et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane. Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut être ouvert et re-cyclisé en un motif furanique (Bruneton, 1999). Se répartissant en plusieurs classes de molécules, les plus importantes sont les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les anthocyanes et les chalcones

❖ **Les phénols**

Sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, ils sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Wichtl et Anton, 2003). Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (Iserin et *al*, 2001).

❖ **Les terpènes**

Les terpènes présentent un vaste groupe de produits naturels largement répandu dans le règne végétal et animal, renfermant des molécules très volatiles. Les terpènes ont une structure de base non aromatique renfermant uniquement du carbone, De l'oxygène ainsi que de l'hydrogène. Les terpènes et stéroïdes ont une structure de base non aromatique, ils ont aussi un point commun essentiel formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonnées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène (Bruneton, 1999)

❖ **Les saponosides**

Appelés aussi saponines, vient du latin « sapo » qui signifie savon et « oside » qui signifie sucre, ce sont des substances glycosidiques végétales, ayant la particularité de se mousser en présence de l'eau et ce par leur effet tensioactif (par diminution de la tension superficielle entre les particules d'eau). Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives, ils se dissolvent dans l'eau

en formant des solutions moussantes. C'est d'ailleurs sur leur tensioactivité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines drogues qui en referment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.), saponis (le savon), pendant longtemps, constitué dans nos régions un détergent ménager d'usage courant tout comme l'ont été, sous les tropiques, les fruits de divers « savons indiens » (*sapa* + *India* ->*Sapindus*) : *S. sapanaria* L., *S. marginatus* Willd. La plupart des saponosides possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, principalement les poissons ; Leur propriété hémolytique leur permet d'interagir avec les stérols de la membrane érythrocytaire, cette interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions le sodium et l'eau entrent, le potassium fuit, la membrane éclate, permettant ainsi la fuite de l'hémoglobine. Mais aussi assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique (Bruneton, 1999).

❖ Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont définies ainsi à la pharmacopée européenne (2008) « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Ce sont des molécules à noyau aromatique, à caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique. On trouve ces molécules dans les organes sécréteurs. Les huiles essentielles jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirent les insectes pollinisateurs ; Elles sont utilisées pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, et soulagent les problèmes intestinaux), elles sont largement utilisées par l'homme dans ses pratiques pour se parfumer, aromatiser la nourriture et pour se soigner. Elles possèdent de nombreuses propriétés biologiques utilisées comme antiseptiques et antimicrobiens dans diverses infections (Iserin et al, 2001) .

1.7. Composition chimique des huiles végétales

Des chaînes d'acides gras variables comportent un nombre pair d'atomes de carbone, allant de 4 à 22 (Zhang et al 1999). Dans le règne végétal, cinq acides gras sont prédominants . Ce sont les acides gras saturés : palmitique (C16 :0) et stéarique (C18 :0) et insaturés : oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2) et α -linoléique (C18 :3). Quant au degré d'insaturation, il peut concerner jusqu'à six doubles liaisons.

1. 8. L'extraction d'huile végétale

L'extraction d'huile se fait par plusieurs techniques, selon la teneur en huile : pressage mécanique et/ou extraction par solvant. Les graines dites « riches » en huile sont tout d'abord triturées par pressage mécanique. Ce procédé permet la récupération d'une huile de très grande qualité, mais reste toutefois incomplet (20 % de matière grasse résiduelle dans le tourteau de pression) et demande d'être finalisé par une extraction solide/liquide à l'aide de l'hexane. Les graines végétales classées « pauvres » en huile (Salager, 1979) sont directement traitées par extraction au solvant après les prétraitements présentés précédemment. Cette dernière méthode d'extraction permet une récupération quasi complète de l'huile contenue dans tout type de graine.

1. 8. 1. L'extraction mécanique par pressage

L'extraction mécanique par pressage est la méthode la moins couteuse et la moins invasive. Son principe repose sur l'expulsion de l'huile de la graine sous l'effet d'une compression mécanique. Ce type de production induit des mécanismes naturels tels que la compaction du tourteau due à l'augmentation de la pression au sein des pores, ce qui provoque un déshuilage par drainage (AISofi et al 2020).

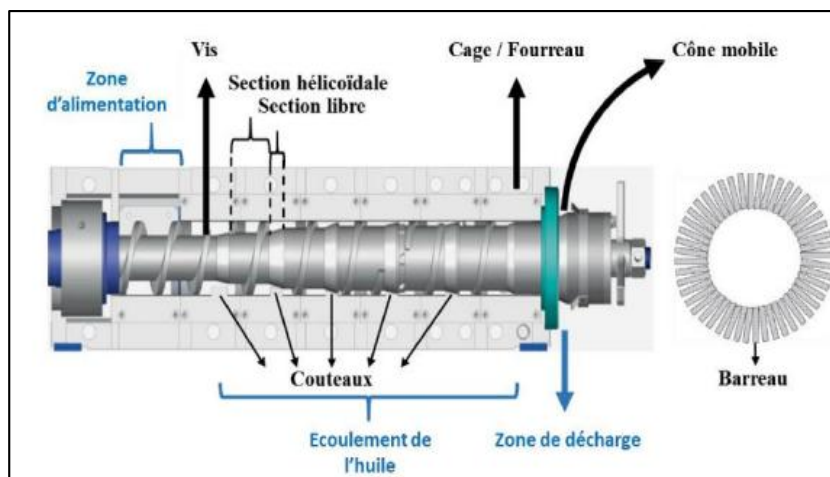


Figure 1: Représentation schématique d'une presse à vis (AISofi et al 2020)

1. 8. 2. L'extraction par solvant

L'extraction par solvant est appliquée pour récupérer l'huile difficile d'atteinte, telle que l'huile présente dans le tourteau de presse ou dans les graines oléagineuses pauvres en huile. Il s'agit de la technique d'extraction la plus efficace, puisqu'elle assure la récupération quasi totale de l'huile. Au niveau industriel, un seul solvant est utilisé pour l'extraction d'huile. Ainsi cette

étape est souvent nommée, extraction à l'hexane. L'hexane est sélectionné pour plusieurs propriétés avantageuses. D'abord pour sa très grande sélectivité pour les lipides, mais aussi pour son faible coût et sa capacité de recyclage (Fine et al 2013)

1. 8. 3. L'extraction par fluides supercritiques

Le procédé alternatif utilisant des fluides supercritiques se base sur des principes de la thermodynamique reliant l'état physique de la matière à des valeurs précises de température et de pression. L'état supercritique est un pseudo-état entre l'état liquide et l'état gazeux. De ce fait, l'état supercritique possède les propriétés de solvation des liquides et de diffusivité des gaz. Il est obtenu quand la température et la pression sont supérieures aux valeurs critiques (Figure 2). À l'état supercritique, le solvant possède des propriétés remarquables intermédiaires entre un liquide et un gaz (viscosité, densité, diffusivité) (Benaissi, 2013). Le CO₂ est le solvant le plus utilisé pour l'extraction en conditions supercritiques en raison de ses valeurs modérées de pression et de température critiques (73,8 bars et 31,1 °C, respectivement), de son abondance, sa non-toxicité, son non inflammabilité et son coût modéré.

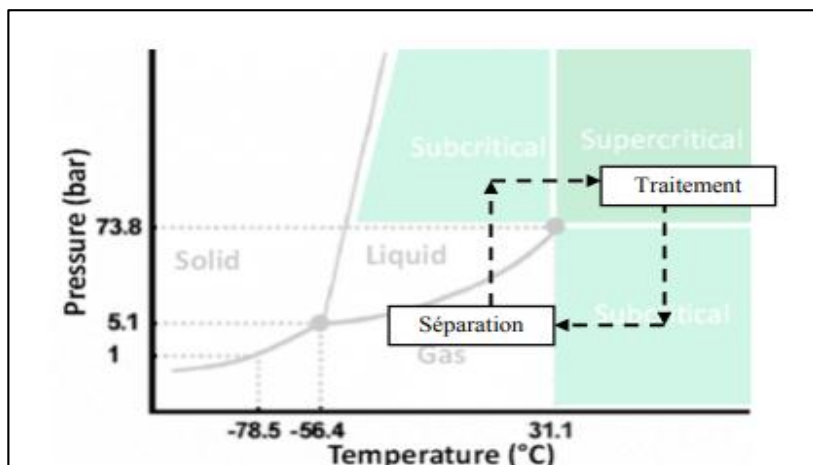


Figure 2 : Principe d'extraction par CO₂ supercritique à partir du diagramme de phases (Benaissi, 2013).

1. 8. 4. L'extraction par Soxhlet

Le principe est le même que pour toute extraction, mais ici se pose le problème de la diffusion du solvant dans la phase solide, qui peut être très lente. Il faut réaliser un très grand nombre d'extractions successives pour obtenir une séparation satisfaisante. L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition, puis condensé avec le condenseur à boules, dans le réservoir à siphon contenant le solide à extraire dans une cartouche

de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant. Cette méthode exige un pro traitement pour le mélange obtenu par soxhlet, En pratique on utilise évaporateur rotatif pour séparer l'huile et Le solvant (Akpan et Jimoh, 2006 ; Garba, 2006).

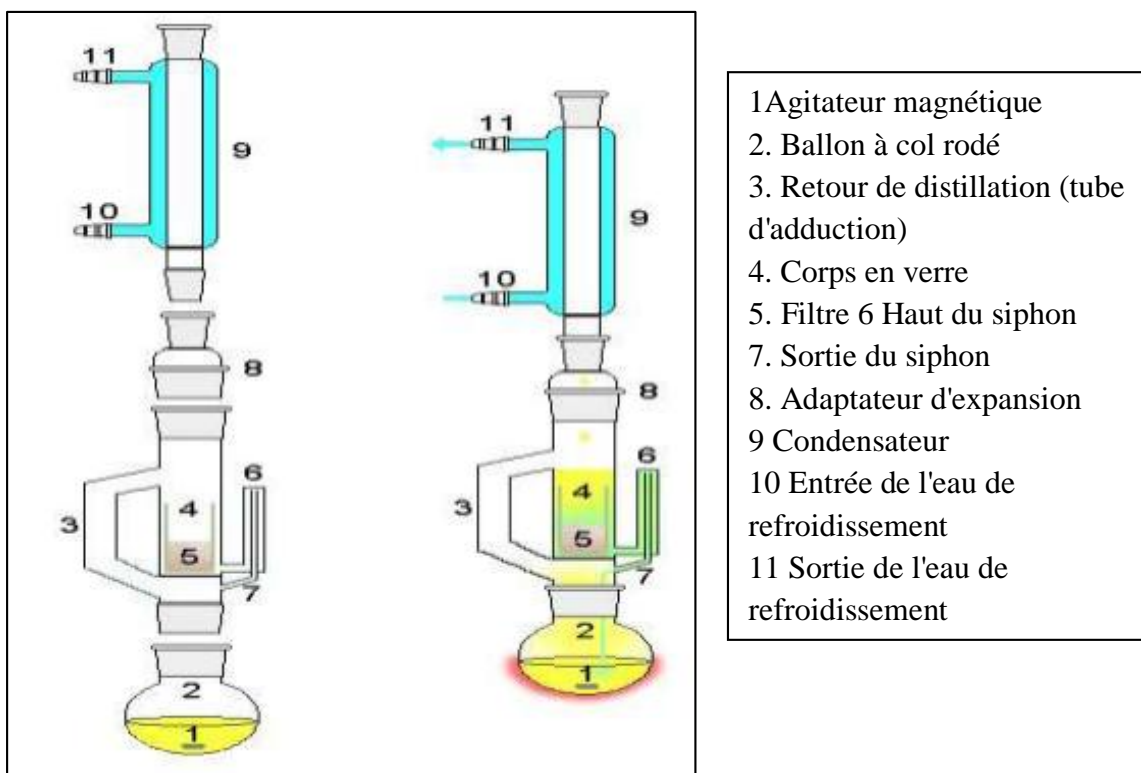


Figure 3 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet

1. 8. 5. Extraction par voie biologique.

(Fulbrook, 1983) a montré qu'il était possible d'accroître les rendements d'extraction d'huile par un solvant après modifications enzymatiques à l'aide d'hydrolases (issues de *Bacillus subtilis* et d'*Aspergillus niger*) et il a affirmé que l'utilisation de systèmes enzymatiques donnait d'excellents rendements d'extraction. D'autre part, ce type d'extraction permet une réduction de la quantité de l'huile dans les tourteaux et d'améliorer la stabilité au stockage de l'huile en augmentant la quantité d'antioxydants (Obergholl, 1997).

Chapitre 2. Présentation du Ricin « *Ricinus communis* L

2. 1. Généralités

Le nom générique *Ricinus* signifie « tique » en latin : la graine est ainsi nommée parce qu'elle a des marques et une bosse qui la fait ressembler à certaines tiques (Ramprasad et Bandopadhyay, 2010). *Ricinus communis* L. fait partie de la famille des Euphorbiacées comportant 8100 espèces, cette plante est le seul représentant du genre *Ricinus* qui est un arbre à grandes feuilles palmées (Malathi *et al.*, 2006 ; Ledent et Mairesse, 2008). Euphorbiaceae vient du genre le plus important de la famille, Euphorbia, lui même dédié par le roi Juba II de Mauritanie à son médecin Euphorbes au 1er siècle avant Jesus Christ, et conservé par Linné. D'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent essentiellement par leur latex blanc, irritant la peau, collant et épais avec un fruit à trois loges (Lagnika, 2005).

2. 2. Classification taxonomique

Tableau.1 : Classification de *Ricin communis* L. (Linné, 1753).

Règne	Plantae
Ebranchement	Spermaphyte (plante à graine)
Sous-embranchement	Angiosperme (Magnoliophyta : Plantes à fleurs)
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Euphorbiales
Famille	Euphorbiaceae
Genre	<i>Ricinus</i>
Espèce	<i>Ricinus communis</i> L.

2. 3. Caractéristiques botaniques

Le *R. communis* L. est un arbuste à rameaux ultimes herbacés ou fistuleux ou arbre, pouvant atteindre 7m et plus, son feuillage est d'une beauté remarquable, parfois cultivé comme plante annuelle très vigoureuse, mais naturellement vivace (Kadambi et Dabral, 1955; Mario et Espirito, 2007). L'arbuste possède deux parties :

2. 3. 1. Une partie aérienne

* **Tige** : dressée, robuste, rameuse avec des branches à nœuds visibles et cicatrices annulaires, généralement glauques, parfois vertes ou rouges, un peu fistuleux, bien unie, ronde, lisse, ramifiée seulement dans le haut (Couplan et Styner, 1994).

Feuilles : alternées, grandes parfois de plus d'un pied, palmées de 7 à 9 lobes, glabres, vertes glauques, avec une veine médiane de couleur rougeâtre, dentées irrégulièrement, rouge à leur développement, porté par de longs et forts pétioles glanduleux vers leur sommet (Figure4) (Garcia et al. 1999).



Figure 4 : Les feuilles de *R. communis* L.

* **Graines** : Les graines sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc. A l'intérieur de la graine se trouve une amande oléagineuse qui est très toxique (Figure5).



Figure 5 : (A) Les graines de *R. communis* L et (B) Les fruits de *R. communis* L

2. 3. 2. Une partie souterraine

possédant une racine pivotante puissante à racines latérales marquées.

2. 4. Origine et Habitat

L'origine du *R. communis* L. est l'Afrique tropicale, il est développé en tant que plante ornementale dans diverses régions de l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Afrique et l'Europe (Aslania et al. 2007). Il est largement cultivé dans la plupart des régions tropicales et subtropicales sèches, de même que dans de nombreuses régions tempérées dotées d'un été chaud (Sujatha et al. 2008; Cheema et al. 2010).

R. communis L. est présent dans tout le continent africain, de la côte atlantique à la mer rouge et de la Tunisie à l'Afrique du Sud ainsi que dans les îles de l'océan Indien (Maroyi, 2007). Plus de 95% de la culture de Ricinus dans le monde est concentrée en Inde, la Chine et le Brésil (Sailaja et al. 2008).

2. 5. Composition chimique

* **Les graines** : Les graines de ricin, sont des graines oléagineuses importantes, elles contiennent approximativement 50% d'huile (Anoskie et Chibogwuk., 1981). L'huile est sous forme de liquide visqueux ambre pale. Après le raffinage et blanchissement, il a une odeur distincte, mais elle peut facilement être éliminée dans le processus de raffinage (Akpan et al. 2006 ; Sule et Sani, 2008). Les graines doivent leurs propriétés purgatives à la présence de l'acide ricin oléique (Alloune et al. 2013).

* **Les protéines** : Dans les graines de ricin mures, 90-95% de toutes les protéines trouvées dans les graines sont stockés à l'endosperme ou les protéines cristalloïdes représentent 70 à 80% des protéines totales et sont insolubles dans l'eau. Les fractions solubles résiduelles de protéine sont des pectines.

* **Glycoprotéine** : Le ricin est une grande glycoprotéine, sous forme de poudre blanche à l'état pure, hydrosoluble. Il est inactif à la température de 80°C dans un temps de 10 min (Garland et Bailey, 2006). La totalité de la plante semble toxique en raison de la présence d'une lectine glycoprotéique : le ricin. La concentration en ricin est maximale dans les grains qui renferment par ailleurs des protéines, de l'eau et des lipides (Garland et Bailey, 2006).

2. 6. Propriété pharmacologique

Bien que toutes les parties de la plante soient plus ou moins toxiques, ce sont les graines de ricin qui sont les plus dangereuses, aussi bien pour l'homme que pour les animaux. Cette toxicité est essentiellement due à une protéine découverte et nommée " ricine " en 1888 par le chimiste allemand Hermann Stillmark. l'huile de ricin pure ne contient pas de ricine. Après broyage des grains et extraction de l'huile, la ricine se trouve dans le tourteau résiduel dont elle peut alors être facilement isolée. Pourtant si l'huile est insuffisamment purifiée, elle peut contenir des concentrations importantes de ricine.

Etant quand même 1000 fois moins toxique que la botuline, la ricine n'en reste pas moins l'un des poisons naturels les plus mortels au monde. On dit qu'une à deux graines mâchées par un enfant ou huit graines mâchées par un adulte peuvent leur être fatales. Non- volatile, elle peut pourtant être toxique si elle est inhalée au moyen d'aérosols, mais c'est surtout injectée que la ricine est la plus dangereuse (Anete et al, 1999).

La ricine est une glycoprotéine formée de deux chaînes polypeptidiques A et B, reliées entre elles par un pont disulfure (Figure A-2-12). La chaîne B permet à la toxine de se fixer à la paroi cellulaire et la chaîne A, responsable des propriétés toxiques, est capable d'inhiber la synthèse des protéines en attaquant l'ARN des ribosomes, entraînant la mort cellulaire (Montfort et Jesus ,1987).

2.7. Toxicité du ricin

Les graines sont riches en une huile qui doit ses propriétés purgatives à la présence de l'acide ricinoléique. Le rendement en huile du Ricin est de 1200 à 2000 litres à l'hectare et par an. L'huile de ricin contient de l'acide ricinoléique qui altère la muqueuse intestinale et provoque des pertes importantes en eau et en électrolytes (sels minéraux), d'où son action purgative intense et irritante. La ricine, protéine présente dans la plante et les graines, est une toxine redoutable .La ricinine a un effet insecticide pour les fourmis qui se nourrissent des feuilles (*Atta sexdens rubropilosa*). Une faible toxicité de la ricinine a été démontrée chez les souris (DL50, intra péritonéal, sous-cutané, intraveineux et oralement 19 -20 mg /kg-1) en comparaison avec le ricin. La ricinine peut être considérée comme une drogue prometteuse, pouvant être utilisée pour le traitement des amnésies humaines (Cazal et al., 2009). Les manifestations cliniques rapportées après l'ingestion de ricinine

Chapitre 3. Généralité sur L'Hémolyse

3. 1. Généralité sur le sang

Tous les organes dans le corps dépendent de la fonction normale du sang. Le sang transporte et livre oxygène et autres substances essentielles et des nutriments à tous les organes, élimine les déchets du métabolisme et défend l'organisme contre les infections par l'intermédiaire de la réaction inflammatoire. En plus de transporter des substances essentielles dans tout le corps, sang peut être affecté par un certain nombre de médicaments et substances chimiques. Ces médicaments peuvent modifier ou altérer l'hémoglobine, diminuer la production de globules ou augmenter la destruction des cellules du sang (Moreno and Wiegand, 2014).

Parmi les fonctions du sang, il faut citer le transport de nombreuses substances (O₂, CO₂, substances nutritives, produits métaboliques, vitamines, électrolytes. etc.), le transport de chaleur (réchauffement, refroidissement), la transmission des signaux (hormones), le pouvoir tampon ainsi que la défense de l'organisme contre les substances étrangères et les micro-organismes (Silbernagl and Despopoulos, 2001).

3. 2. Les globules rouges

Globules rouges occupent normalement environ 45 % du volume sanguin total. Il s'agit de l'hématocrite. La moyenne des globules rouges sont de $5,4 \times 10^{12}$ / litre chez les hommes et $4,5 \times 10^{12}$ / litre chez la femme. Chaque RBC est une disque biconcave (Figure 1), qui a un diamètre moyen de 7,2 μm et 2 μm d'épaisseur sur ses bords. Globules rouges n'ont pas des organites intracellulaires. La forme de la RBC est physiologiquement importante, parce qu'il maintient un rapport de haute surface : volume, ce qui facilite la diffusion transmembranaire. La forme de la RBC, ainsi que la souplesse considérable de sa membrane plasmique, permet aussi la cellule à flux et déformer, qui est souvent nécessaire, car il traverse les capillaires (Minors, 2004).

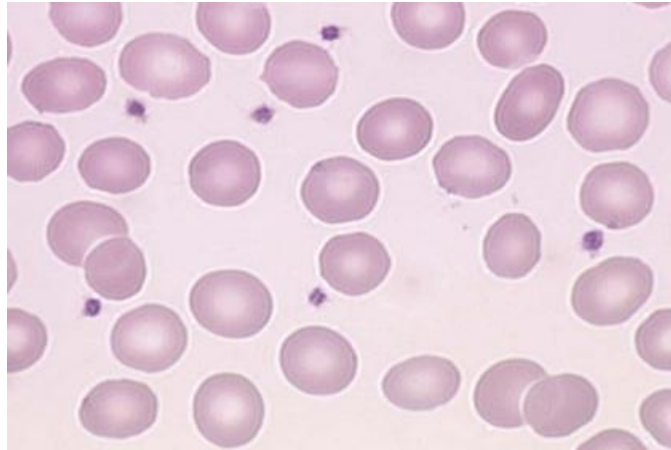


Figure 6 : Les globules rouges

3. 3. Morphologie normale et la forme pathologique du globule rouge

*** Morphologie normale**

Globules rouges ou érythrocytes, sont des disques biconcaves qui sont essentiels pour l'échange gazeux (Peter Klinken, 2002). Les globules rouges (GR) sur frottis ont une forme circulaire, une taille uniforme avec un diamètre moyen de $8\mu\text{m}$ (de très petites variations de taille ou de forme sont observées normalement), une coloration gris rosé avec un centre plus clair qui se fond graduellement à un anneau périphérique plus coloré. L'observation des globules rouges, corrélée aux autres paramètres fournis par l'automate (volume globulaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, indice de distribution des globules rouges), ainsi qu'au type de l'alarme, est particulièrement utile lors d'une anémie car certaines anomalies peuvent avoir une valeur diagnostique ou aider à la compréhension du mécanisme de cette anémie. Les éléments d'analyse principaux sont la taille, la colorabilité et la forme, complétés par la recherche d'inclusions intraérythrocytaires. La présence d'agglutinats de globules rouges ou du phénomène des rouleaux donnent des indications supplémentaires. La durée de séjour des globules rouges dans le sang est de 120 jours en moyenne et le temps de transit médullaire des érythroblastes est de 5/6 jours (Valensi, 2005).

*** Les formes pathologiques du globule rouge**

L'anisocytose indique une hétérogénéité de taille des hématies examinées. Elle est causée par des modifications dans la production des hématies et par la transfusion de culots globulaires. Une microcytose ou une macrocytose désigne de façon plus précise les anomalies observées. La microcytose se définit par la présence d'hématies de taille diminuée avec un volume

globulaire moyen (VGM) abaissé elle résulte en général d'un défaut de synthèse de l'hémoglobine et se rencontre au cours des anomalies du métabolisme du fer. A l'inverse, la macrocytose est caractérisée par des hématies de diamètre augmenté. Elle est en général reliée à une anomalie de synthèse de l'ADN [carence en vitamine B12, acide folique, déficit en uridine monophosphate (UMP) synthétase] (Fenneteau and Maier-Redelsperger, 2000).

Le terme de poikilocytose indique la présence sur les frottis d'hématies de formes très variées : arrondies, ovalaires, en massue, en raquette Elle résulte de différentes causes et peut se rencontrer au cours d'anémies de mécanismes variés (carence en fer, thalassémie, ...) (Fenneteau and Maier-Redelsperger, 2000).

3. 4. La membrane du globule rouge

La membrane du globule rouge est une bicouche de phospholipides, stabilisée avec des quantités équimolaires de cholestérol (Gordon-Smith, 2009). Contient environ 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de carbohydrates, La quantité totale de lipides érythrocytaires est d'environ 5mg pour 10^{10} cellules, dont 60% de phospholipides, 25% de lipides neutres (essentiellement du cholestérol) et 15% de glycosphingolipides (Cartron and Salmon, 1978). Les principaux phospholipides sont phosphatdyl groupes liés à l'éthanolamine, inositol, sérine ou choline (lécithine) et la sphingomyéline. La bicouche lipidique fournit un milieu stable pour les protéines de la membrane. Les protéines déterminent la forme et la souplesse du globule rouge. Protéines membranaires peuvent être attachées à la surface externe de la membrane par l'intermédiaire de domaines membranaires ou par l'ancre d'inositol (GPI) glycoposphatidyl. Des protéines transmembranaires, par exemple les protéine bande 3, ont plasma et domaines cytoplasmiques. Domaines externes comprennent les groupes sanguins, sites pour les complexes immuns et les parties externes des canaux transmembranaires de liaison et de signalisation des protéines. Les principales protéines du cytosquelette sont spectrine, actine, protéine 4.1 et ankyrin les deux chaînes de vent de la spectrine (α et β) autour de l'autre à forme hétérodimères, qui sont liés de bout en bout par actine, protéine 4.1 et d'autres protéines pour former un réseau de tétramères sur la surface de la membrane interne (Gordon-Smith, 2009).

3. 5. Définition de l'hémolyse

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).

3. 6. Pathologie

3. 6. 1. Hyper hémolyse et les maladies associées

L'hyper hémolysé 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 produit 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)

3. 6. 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⁺ (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 α ET β 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, à 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)

➤ 3. 6. 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.

3.6. 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)



Partie Expérimentale
Chapitre 1.
Matériels et Méthodes

1. Matériels et méthodes

Notre travail a été fractionné en deux parties : la première partie a traité la phytochimie et la deuxième partie est consacré à l'étude de l'activité cytotoxique par le test de l'hémolyse. Les deux parties d'études ont été effectuées au laboratoire de biochimie (1 et 2) à l'Université Abdel Hamid Ibn Badis de Mostaganem.

1.1. Objectif de l'étude

L'intérêt de ce travail est de mettre en évidence les composés chimiques par les tests qualitatifs de coloration du ricin et d'évaluer son activité cytotoxique de l'huile végétale par le test hémolytique des globules rouges. Le ricin (*Ricinus communis* L) est une plante médicinale poussant à l'état spontané dans notre région et très connue par la population Algérienne.

1. 2. Matériels biologiques

* l'espèce végétale *Ricinus communis*

Le matériel végétal utilisé est constitué des parties aériennes qui sont les feuilles et les graines de *Ricinus communis* L (figure 7 A et B) récolté dans une ferme située dans la commune de Touahria daïra de Souafli, wilaya de Mostaganem, au cours du mois de Février- début du mois de Mars. Les feuilles ont été utilisées pour le test phytochimiques et les graines ont été réservées pour le test hémolytique

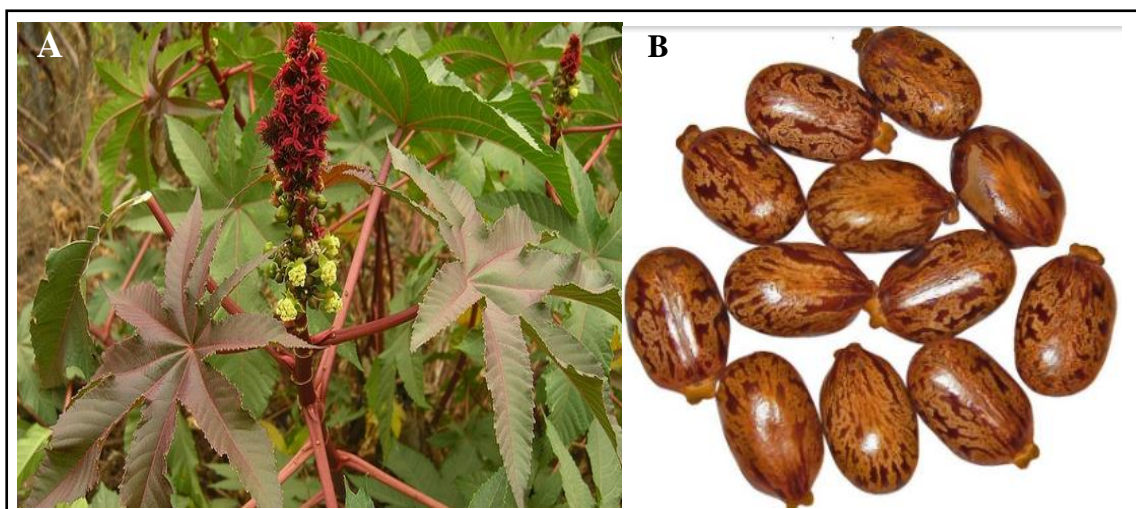


Figure 7 : Présentation du *Ricinus communis* L. (A : Feuilles et raméaux B : Graine)

* 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 fais comme échantillon de test disponible le même jour du protocole expérimental

1. 3. Matériel de laboratoire

Quelques produits chimiques et matériels de laboratoire nécessaires pour notre étude sont présentés dans le tableau (2)

Tableau 2. Matériels et produit chimique de laboratoire utilisés

Les réactifs	Verreries et appareils
Eau distillée -FeCl ₃ - folin cicolteau -Hcl - Réactif de Dragendroff -carbonate de sodium Na ₂ CO ₃ - l'acide gallique - Hexane	Tubes à essai- éprouvette graduée- flacons- bécher- entonnoir-papier filtre- balance, bain marie- micropipette- agitateur, rota- vapeur – plaque chauffante-Centrifugeuse- spectrophotomètre-les cuves- mortier- appareil à soxhley

1. 4. Méthodes

1. 4. 1. Les tests phytochimiques

1. 4. 1. 1. Préparation de la matière végétale

La partie aérienne de *R. communis* constituée de feuilles et des graines ont été bien nettoyées à l'eau de robinet pour enlever les impuretés, puis séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, jusqu'elles sont devenues sèches ensuite broyées à l'aide d'un mortier pour avoir une poudre qui est stockée dans des boîtes fermées hermétiquement et placées dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à leur utilisation (Figure 8 A, B)

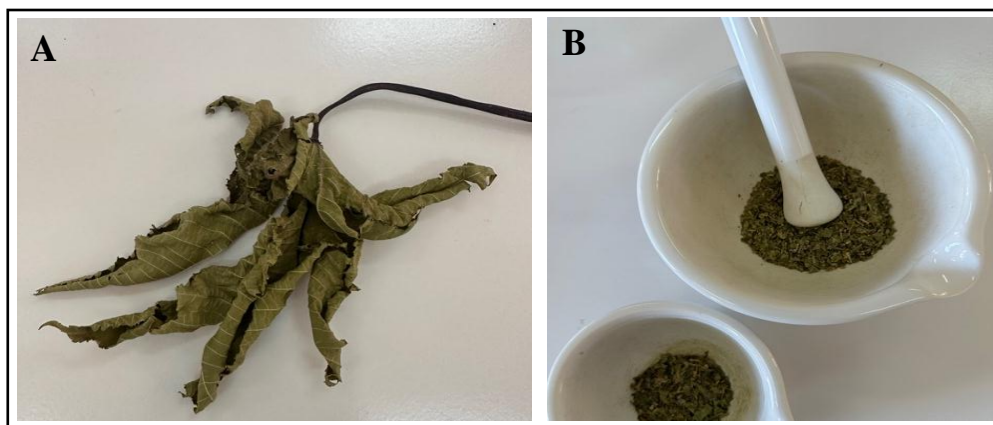


Figure 8 : préparation de l'échantillon du ricin. (A : feuille séché B : broyage des feuilles)

1. 4. 1. 2. Préparation des extraits aqueux

* Infusion

- Introduire 10g de la poudre végétale de ricin (feuilles) dans 100 ml de l'eau distillé bouillie
- Laisser infuser pendant 15 min ensuite filtrer la préparation et conserver dans des flacons propres au réfrigérateur .

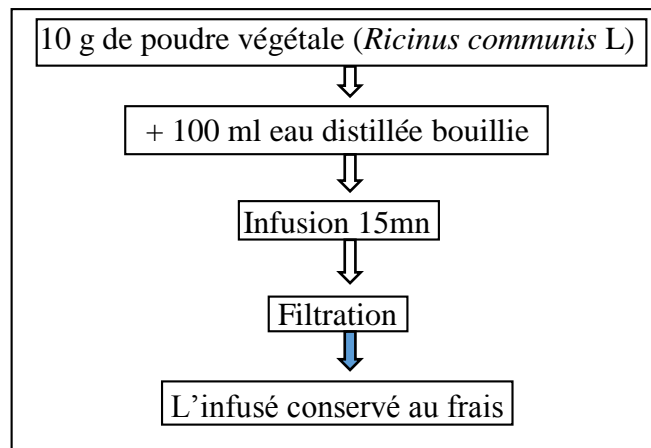


Figure 9. Protocole de préparation de la solution d'infusion

* La décoction

- Introduire 10g de poudre végétale du ricin dans 100 ml de l'eau distillé
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure, dans une plaque chauffante avec agitateur ensuite filtrer la préparation et conserver dans des flacons propres au réfrigérateur

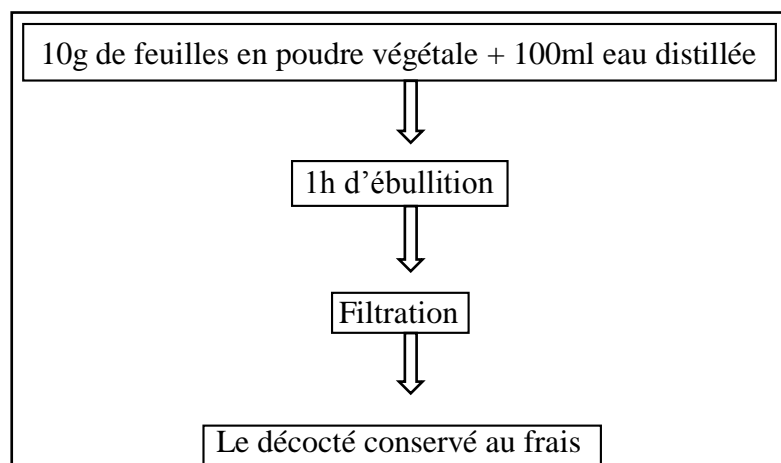


Figure 10 : Protocole de préparation de la solution de décoction.

1. 4. 1. 3. Protocole expérimental des tests phytochimiques

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

- Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait aqueux à analyser et ajouter 1 ml de solution de FeCl₃ puis 1 ml de HCl, L'apparition d'une coloration orange ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

- Les alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec le réactif de Dragendorff. Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à analyser et ajouter 5 gouttes de réactif Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé, révèle la présence des alcaloïdes.

- Les anthocyanes

-1ml de l'extrait est ajouté au 1ml de H₂SO₄ à 10% (agitation) puis traité par 1 ml de NH₄OH à 10%. la présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleue.

- Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de solution aqueuse de FeCl₃ à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

- Les saponines : Test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 2ml d'extrait à tester et ajouter 1ml d'eau distillée et agité pendant quelques secondes puis laissé au repos pendant 15min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

- Dosage des Polyphénols totaux

*Principe

Dans le but d'évaluer quantitativement le contenu en composés phénoliques de l'extrait de ricin (*Ricinus communis* 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

µl de l'extrait ou d'acide gallique a été préparé à une concentration de 100 µg/ml puis additionné de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au dixième). Après 4 minutes, 800µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75 mg/ml) sont ajoutées afin de stabiliser la réaction. Après agitation, le mélange réactionnel est incubé pendant 45 mn 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

1. 4. 2. Les Tests de l'activité hémolytique

1. 4. 2. 1. Extraction d'huile de ricin

L'huile de ricin peut être extraite par différents processus (Akpan et Jimoh, 2006).

A. Traitement des graines

Les graines ont subies plusieurs étapes de traitement avant l'extraction de l'huile végétale (Hv).

Les opérations essentielles impliquées sont :

- **Dégagement** : Les impuretés des fruits de la plante ont été débarrassées par les mains.
- **Séchage** : Les fruits ont été nettoyés puis disposés au soleil, jusqu'à l'ouverture des péricarpes. Les graines sont séchées au soleil pendant une semaine pour réduire au maximum leur humidité. Après le séchage les graines ont été pesées.
- **Vannage** : Pour un meilleur rendement, les graines sont décortiquées.
- **Meulage** : (réduction de la taille) . Les graines de la plante, sont finement broyées dans un mortier afin d'obtenir une pâte.

B. Extraction de l'huile végétale par soxhlet

* Principe

L'extraction au soxhlet (Figure 11, A) consiste en un épuisement continu de la drogue par un solvant donné. La pâte des graines obtenue de 50g a été placée dans une cartouche de cellulose, celle-ci est placée à son tour dans l'appareil de Soxhlet qui est chauffé à 60 C. Ce dernier est monté sur un ballon contenant 150ml d'hexane. L'huile de ricin en première étape est extraite à chaud sous reflux par 150ml d'hexane pendant 3 heures (au moins 8 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des graines). A l'issue de cette opération, l'extrait brut est placé dans un rota-vapeur (Figure 11, B) pour éliminer les traces du solvant (Akpan et Jimoh, 2006 ; Garba, 2006).

Le rendement en l'huile essentielle est calculé selon la formule :

$$\% R = \frac{M_{He}}{M_{Gr}} \times 100$$

R : Rendement

M_{He} : la masse d'huile extraire en g

M : la masse des grains avant l'extraction en g

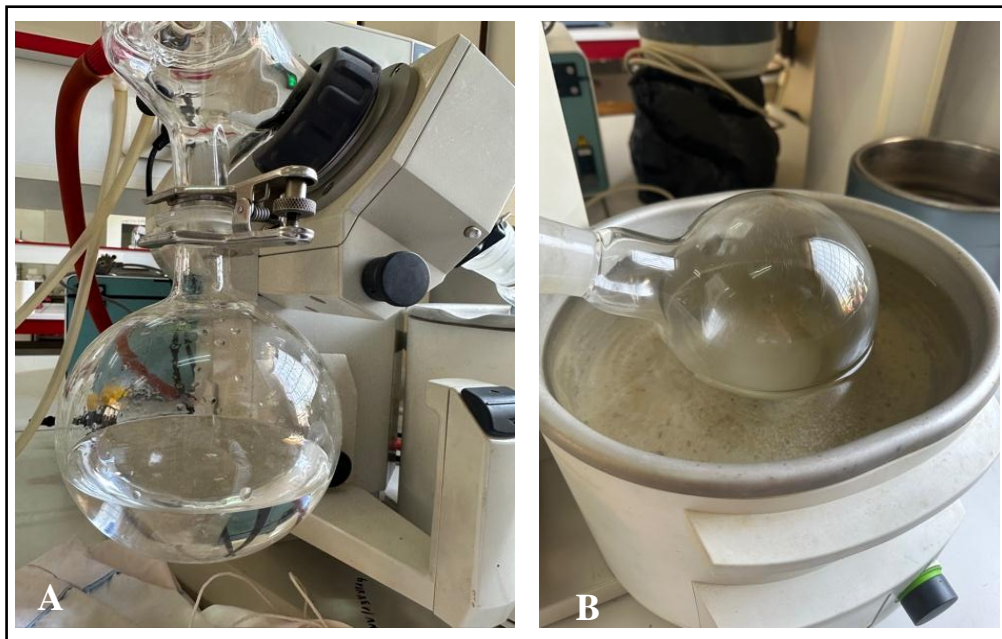


Figure 11 : l'extraction de l'huile de *Ricinus communis*

(A : Soxhley B : le rota-vapeur

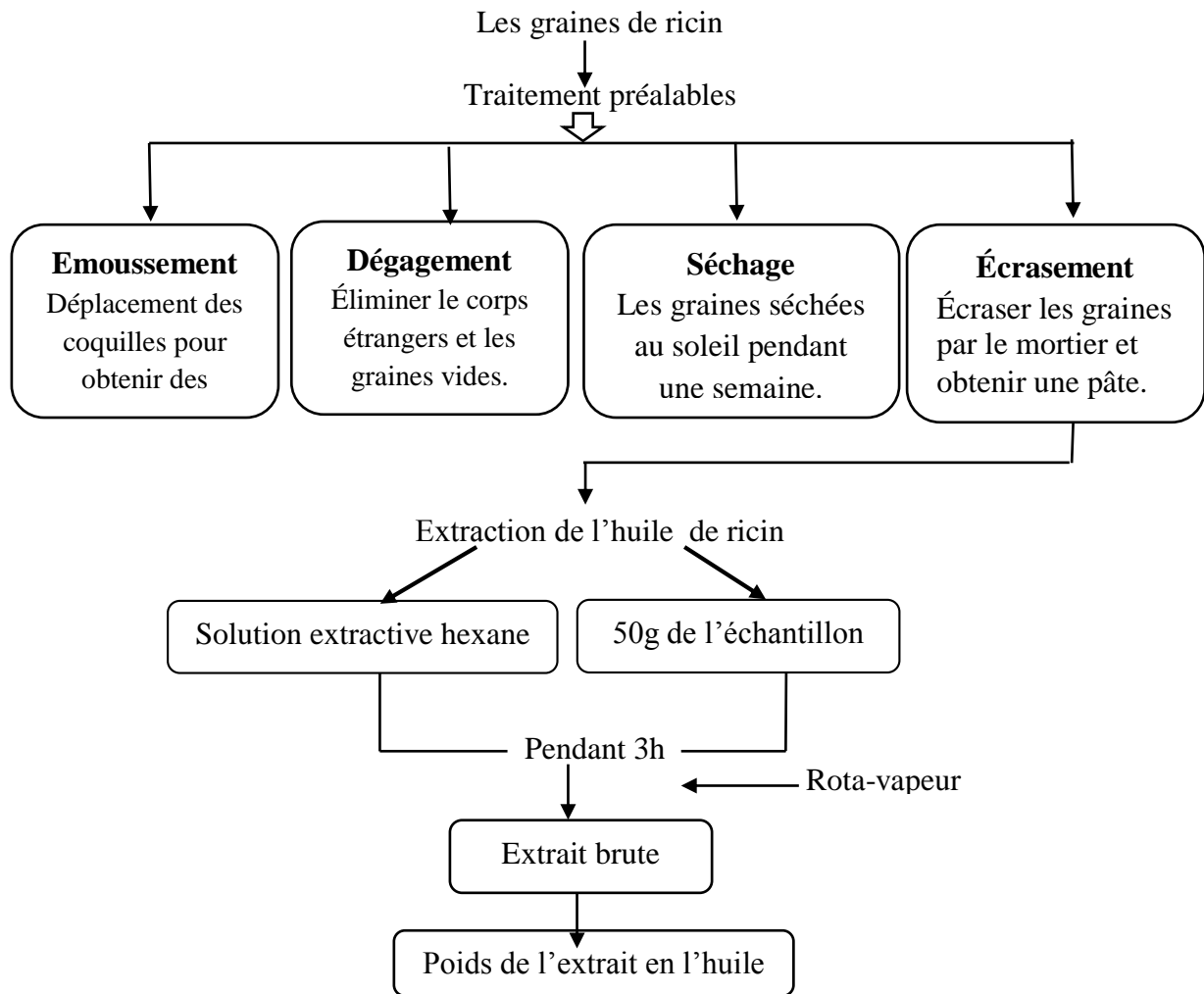


Figure14. Schéma d'extraction de l'huile à partir des graines de ricin

1. 4. 2.2. Protocole expérimental des tests hémolytiques

A. Préparation de la solution tampon (PBS) Phosphate Buffered Saline à pH 7.2

La préparation de 1 litre de la solution tampon (PBS : Phosphate Buffered Saline) a été effectuée selon les étapes suivantes :

- Pesez 0,7 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Mettez le KH_2PO_4 pesé dans un bécher en verre. Puis ajoutez 150 ml d'eau distillée et remuez avec une spatule en bois jusqu'à dissolution du sel.
- Pesez 1 g de Na_2HPO_4
- Ajoutez le Na_2HPO_4 à la solution dans le bécher et remuez.
- Versez la préparation dans la flasque d'Erlenmeyer et rajoutez de l'eau jusqu'à la graduation de 1 litre.
- Transvasez l'eau tamponnée dans un flacon en verre et étiquetez le flacon
- Conservez l'eau tamponnée dans un endroit frais à l'abri de la lumière.

B. Evaluation de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges*** Préparation de la suspension érythrocytaire**

Le sang est récupéré par la veine orbitale dans des tubes héparines. Après centrifugation à 4000tr /min pendant 5 min, le surnageant est éliminé et le culot est lavé trois fois par une solution tampon phosphate salin PBS (pH 7.2) puis suspendu à nouveau dans ce même volume que le surnageant éliminé. Le culot cellulaire obtenu est dilué avec la solution PBS pour obtenir un hématocrite de 2%.

*** L'évaluation de la fuite de l'hémoglobine**

Les globules rouges sont suspendus dans le tampon phosphate salé (PBS) à raison de 4000 cellules/ ml (0,25 ml sont mis en contact avec 4,75 ml de tampon phosphate salé de sodium (PBS) pH 7,2).

L'extrait d'huile de *Ricinus communis L* est utilisée brut et diluée dans le méthanol pour obtenir des différentes concentrations (50% ,75%) en ajoutant twine à la solution pour la rendre homogène. Une série de tubes à essai à différentes dilutions a été préparée.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37 °C pendant 90 min avec différentes concentrations de l'huile de ricin brut et diluée. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV. La lecture de l'absorbance est effectuée pour chaque concentration, après 15 mn , après 30 mn et après 45mn.

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée. Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif.

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

Pourcentage d'hémolyse (%) = 100% x (Ab548 nm de l'échantillon - Ab548 nm de l'hémolyse spontanée test de l'échantillon) / (Ab548nm test eau distillée - Ab548 nm de l'hémolyse spontanée test d'échantillon).



Chapitre 2.
Résultats et Interprétations

2. Résultats et interprétations

2.1. Résultats sur l'extraction

L'extraction de l'huile végétale à partir des graines de *Ricinus communis* L par le solvant hexane a permis d'obtenir un extrait de couleur jaune pâle plus ou moins épais avec un rendement d'extraction de 35% ($16,35 \pm 0.523 / 50g$) des graines . Ces résultats est probablement dû au fait que les composés non volatils sont beaucoup plus solubles dans l'hexane. Ce rendement est plus élevé que celui trouvé par Guergour (2011). Cet auteur a avancé un pourcentage de 30% chez le ricin poussant à la zone des hauts plateaux. D'autres résultats ont été notés sur le même rendement (30%) (Akpan et Jimoh., 2006 et (Garba, 2006). Cette variation de rendement est peut être en relation avec les conditions biogéographiques et bioclimatiques du ricin

2.2. Résultats des tests phytochimiques

Dans le but de mettre en évidence la composante phytochimique de *Ricinus communis* L, des tests phytochimiques ont été effectués sur les extraits aqueux de décoction et d'infusion des feuilles. Le tableau (3) et les figures (du 13 jusqu'au 19) regroupent l'ensemble de ces résultats. Les légendes Te et Ts correspondent respectivement au témoin et aux tests.

Tableau. 3 : Tests phytochimiques des feuilles de *Ricinus communis*
(Extrait aqueux par infusion et décoction).

Metabolites secondaires	Décoction	Infusion
Tanins	+++	+++
Flavonoids	+	+
anthocyanes	—	—
alcaloïdes	++	++
Saponines	+++	+++

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

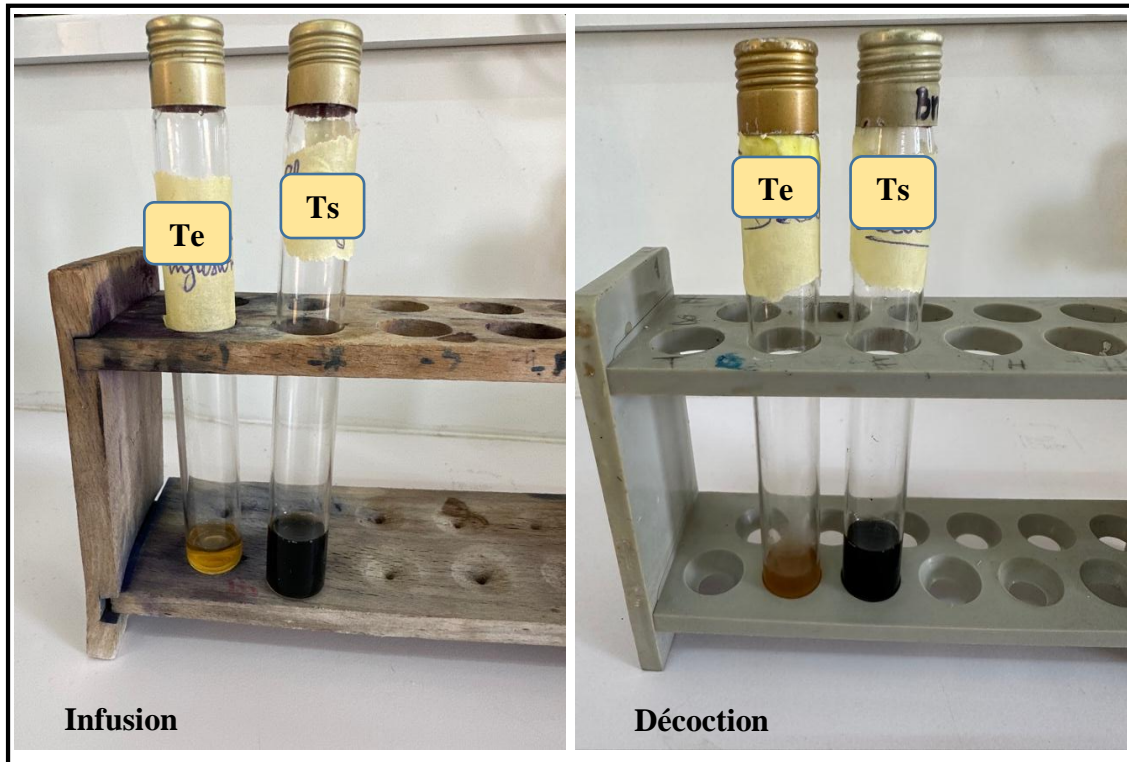


Figure 13 : Mise en évidence des flavonoïdes.

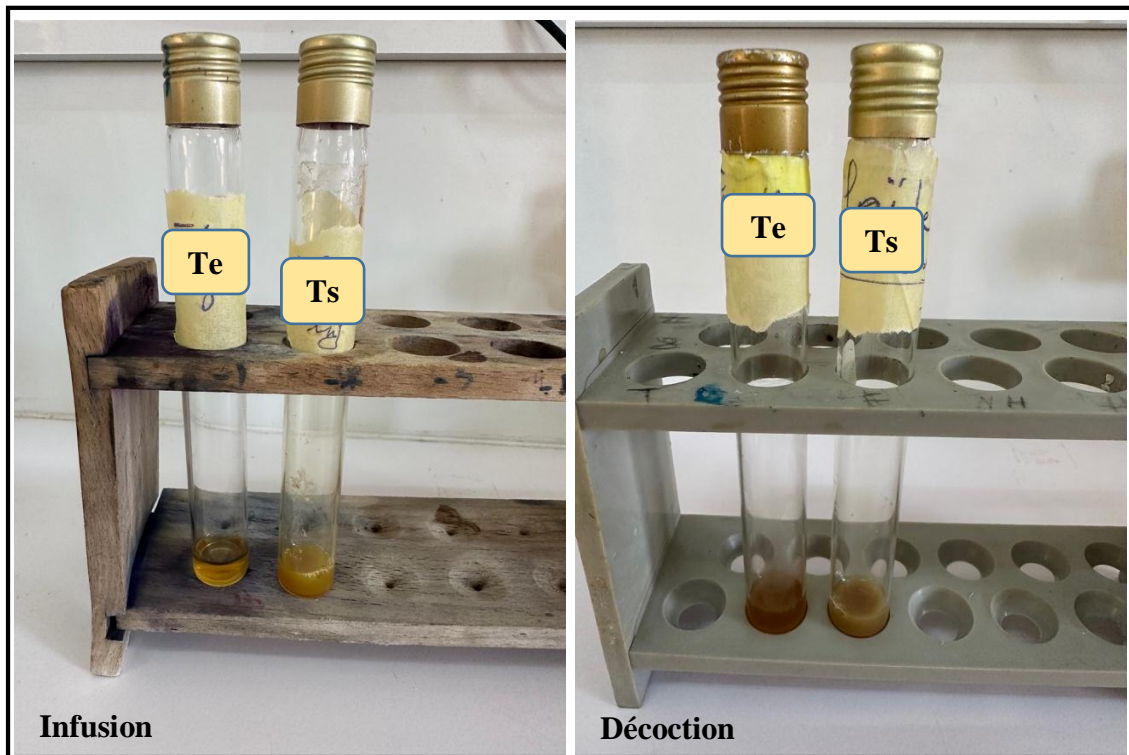


Figure 14 : Mise en évidence des alcaloïdes.

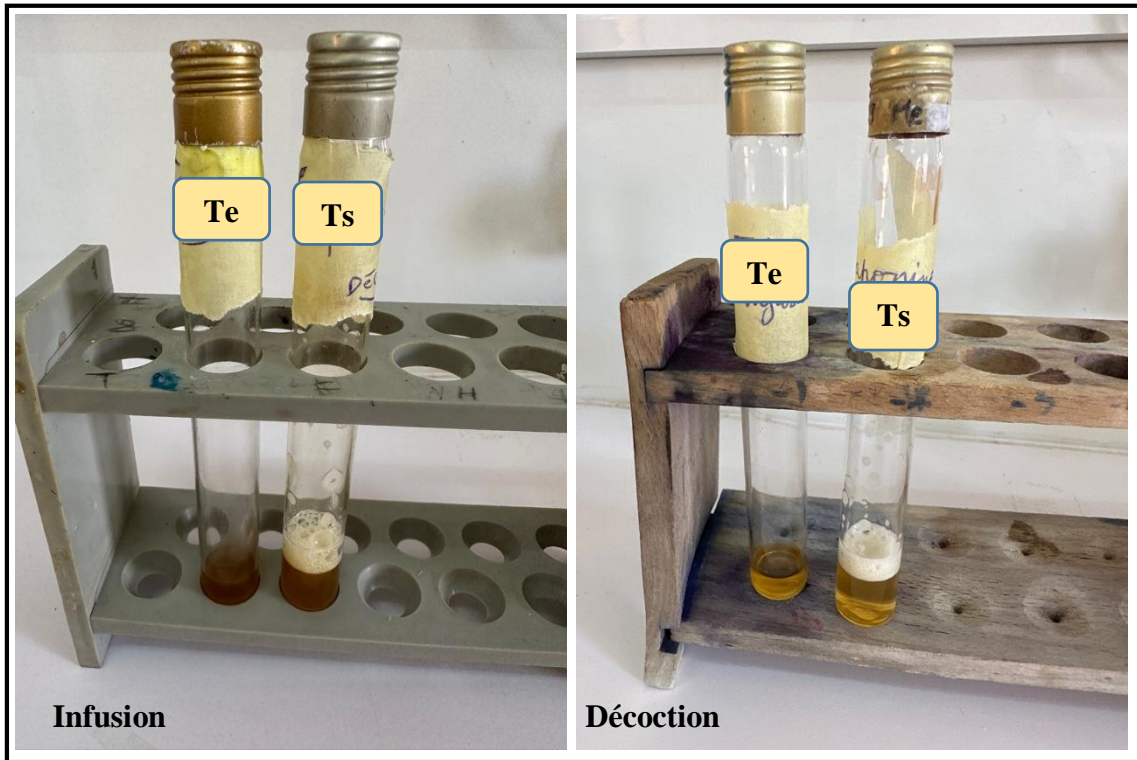


Figure 15 : Mise en évidence des saponines

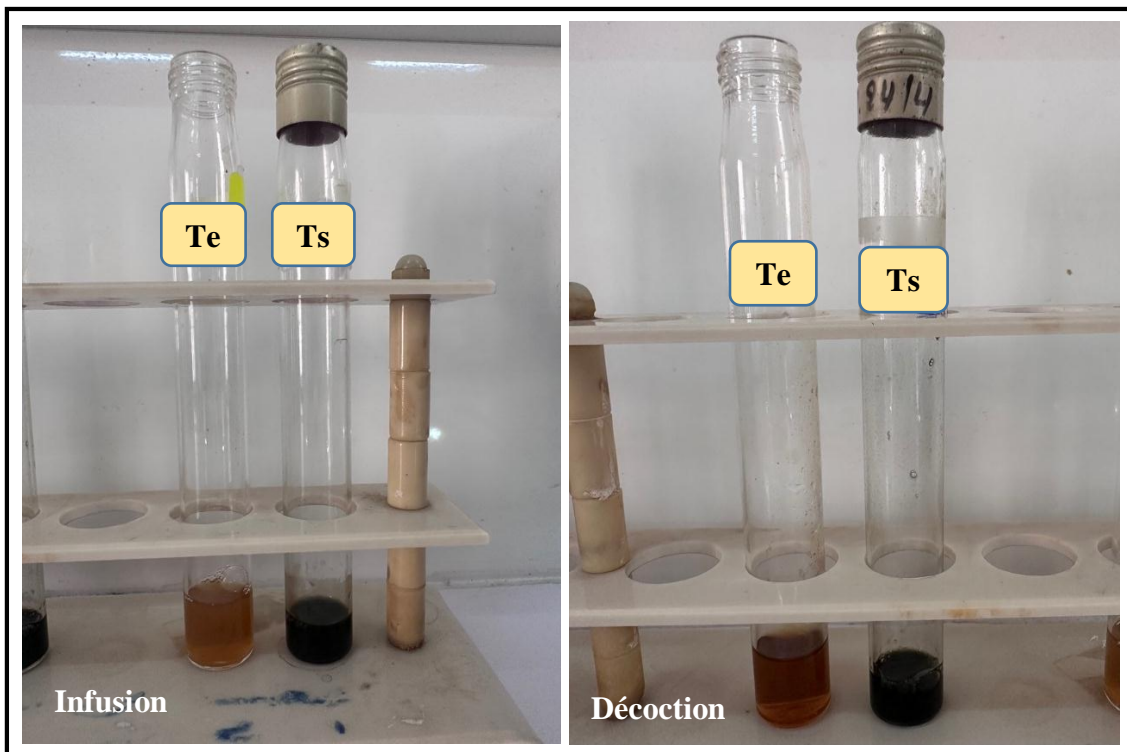


Figure 16 : Mise en évidence des tanins.

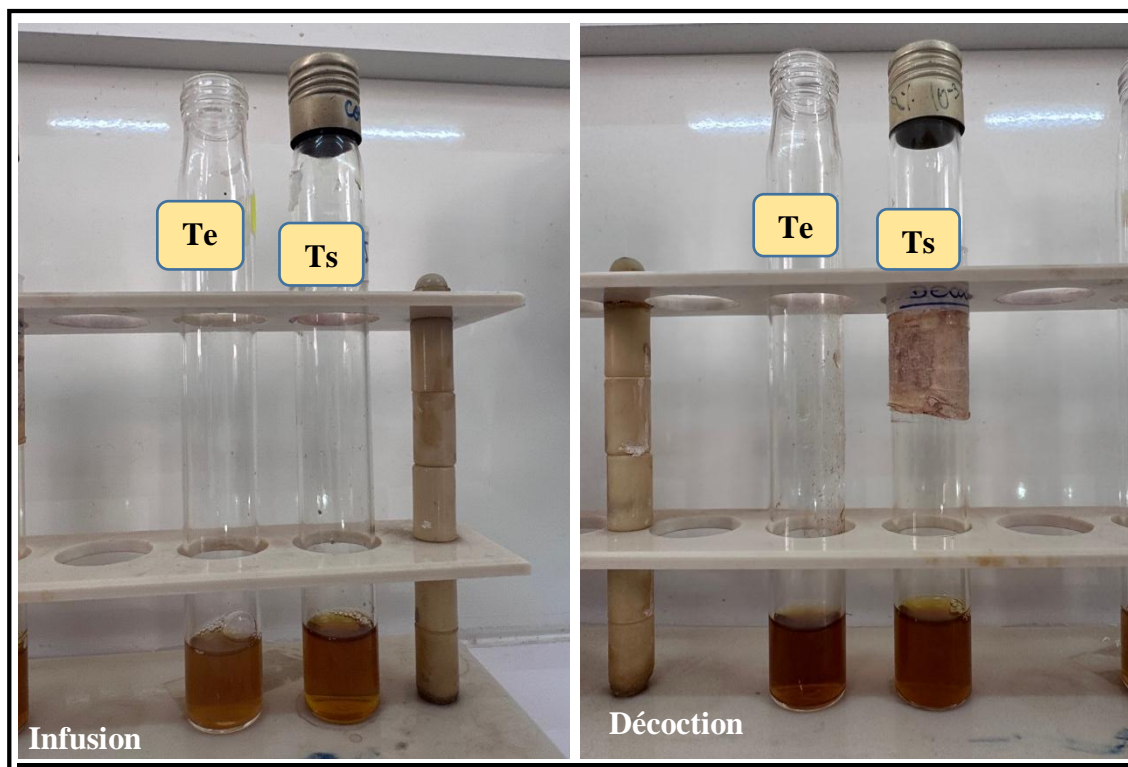


Figure 17 : Mise en évidence des anthocyanes.

2.3. Résultats du dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, est l'une des méthodes les plus anciennes conçues. En utilisant comme standard l'acide gallique, dont sa courbe d'étalonnage est représentée en annexe. L'absorbance a été mesurée à 765 nm, les teneurs en polyphénols sont exprimées en mgEAG/g d'extrait. Les résultats du dosage des polyphénols sont figurés dans le tableau (04)

Tableau 4 : Teneur en polyphénols (mgEAG/g d'extrait)

Extraits	polyphénols totaux	Absorbance
infusion	0,918	0,753
Décoction	0,496	0,536

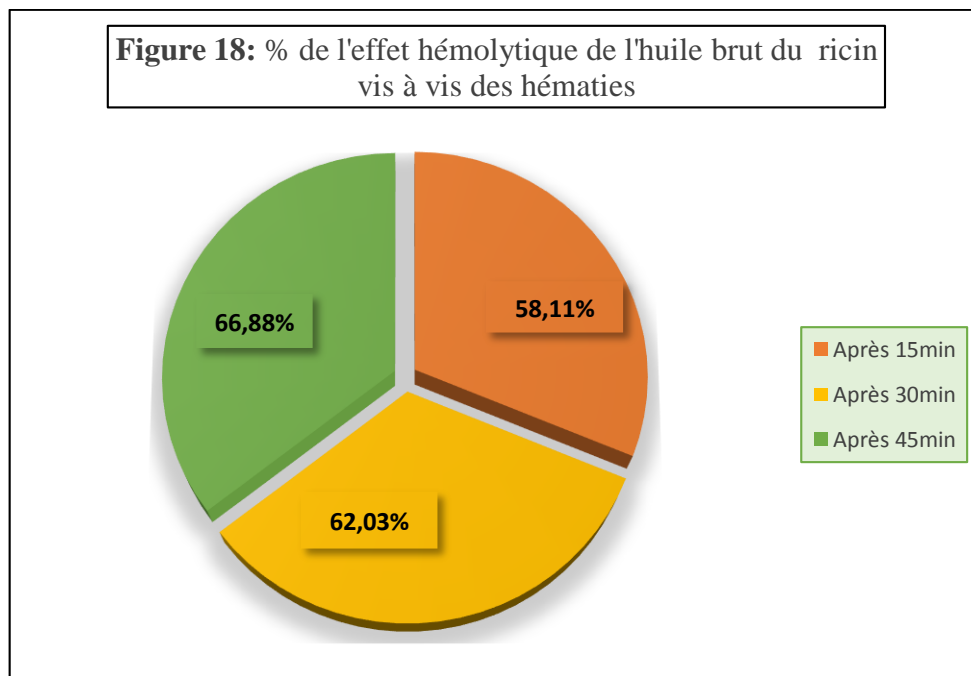
D'après les résultats obtenus, les tests phytochimiques réalisés sur les différentes préparations (décoction et infusion) de la partie aérienne de *Ricinus communis* L ont révélé la présence d'un groupe de métabolites secondaires pour les deux types d'extrait aqueux. Les tanins et les saponines sont révélés très positivement suivis des alcaloïdes. Nous avons noté une absence des anthocyanes pour les deux types d'extraits.

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions varient selon le type d'extrait. La concentration la plus élevée des polyphénols a été mesurée dans l'extrait d'infusion, avec un taux de 0,918mg EAG/g ES, par rapport au extrait de décoction, où la teneur est de 0,496 mg EAG/g ES . Nous constatons que la décoction possède un effet sur la révélation des polyphénols et que l'ébullition dégrade les molécules.

Nos résultats s'accordent avec ceux enregistrés par les travaux de **Laib et al., (2022)**. Ces auteurs ont confirmé la richesse des extraits des parties aériennes en saponines, alcaloïdes et en tanins.

2. 4. Résultat de l'activité hémolytique de l'huile de ricin

Le test de l'hémolyse de l'huile extraite des graines du ricin a été appliqué sur les hématies pour une durée de 90mn. La moyenne des pourcentages de l'activité hémolytiques calculés a base des valeurs de la densité optiques sont regroupés dans les figures (18, 19, 20).



Figures 19 : % de l'effet hémolytique de l'huile (dilution 50%) du ricin vis à vis des hématies

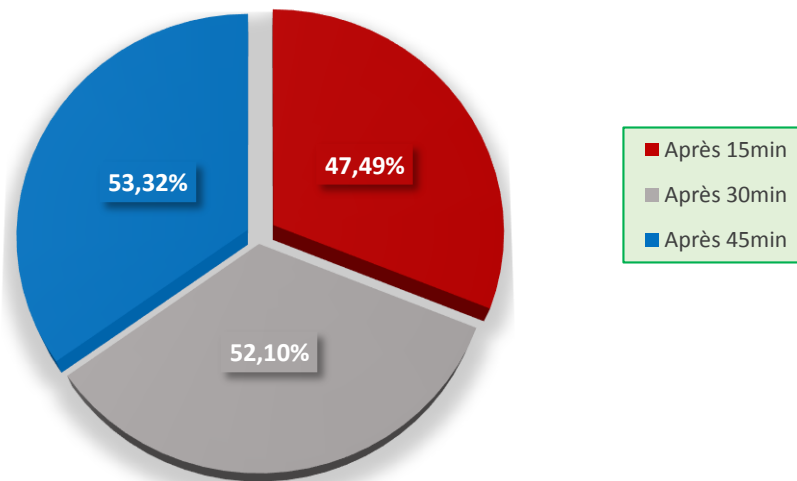
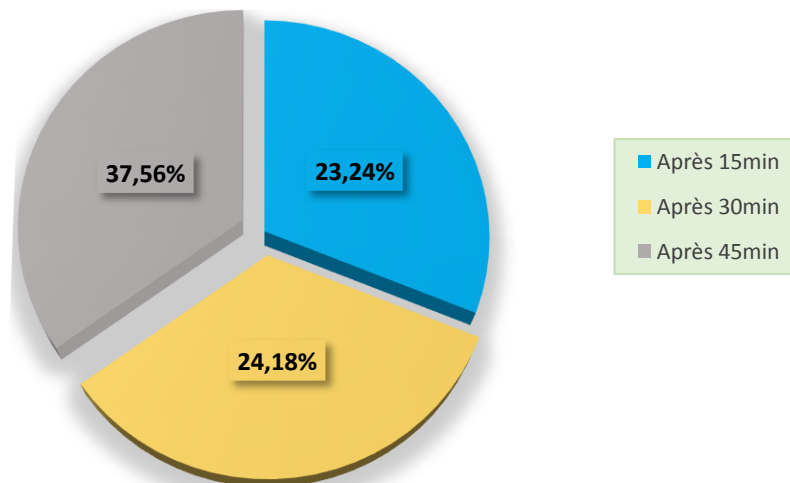


Figure 20 : % de l'effet hémolytique de l'huile (dilution 75%) du ricin vis à vis des hématies



Les résultats, représentés dans les figures ci-dessus montrent que l'activité hémolytique de l'huile extraite des graines de *Ricinus communis* est positive et diffère selon les dilutions et le temps d'incubation. Nous avons enregistré une moyenne des pourcentages de l'effet hémolytique les plus élevés pour l'extrait brut après une incubation de 45mn (66.88%) suivie de l'extrait dilué à 50% avec un pourcentage moyen de 53.32% au même temps d'incubation. Au temps d'incubation après 30mn les valeurs du pourcentage diminuent légèrement vers 62.03% pour l'extrait brut et 52.10% pour l'extrait dilué à 50%. L'effet hémolytique de l'huile reste le moins

important après 15mn d'incubation pour l'ensemble des dilutions et l'extrait brut. Nous constatons que l'huile du ricin possède une toxicité sur les globules rouge humains en concentration de l'extrait et le temps d'incubation de l'échantillon de la plante. Il est à noter que les pourcentages d'hémolyse ont été calculés à base des valeurs de l'absorbance (DO) de la fuite de l'hémoglobine au niveau du surnageant des échantillons tests. Une étude sur l'évaluation de la toxicité de l'huile de ricin *in vivo* a enregistré un taux d'hémoglobine dans des tests *in vivo* indiquant la diminution de concentration d'hémoglobine dans les globules rouges ((Bain, 2006). Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux produits chimiques et un index important du statut physiologique et pathologique de l'être humain et de l'animal (Mukinda et Syce ,2007). Cela confirme une installation des anomalies sanguines. Sur le même contexte une surproduction des éléments de régulation de l'hématopoïèse pour réparer la dégradation des globules rouge a été enregistrées dans une étude *in vivo* qui traite la toxicité de l'huile du ricin (ChangGue et al., 2003; Udut et al, 2005).

Nous avons enregistré une mousse des saponines importante au niveaux des tests phytochimiques . Cela est probablement en relation avec la dégradation des membranes érythrocytaires et la fuite de l'hémoglobine. En effet La plupart des saponosides possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques. Leur propriété hémolytique leur permet d'interagir avec les stérols de la membrane érythrocytaire, cette interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions le sodium et l'eau entrent, le potassium fuit, la membrane éclate, permettant ainsi la fuite de l'hémoglobine. Mais aussi assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique (Bruneton, 1999).



Conclusion

Conclusion

Ricinus communis L (famille des euphorbiacées) est classée parmi les plantes toxiques chez l'homme et les animaux, sa toxicité est due aux glycoprotéines qui sont des protéines d'inactivation ribosomale.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la toxicité de l'huile végétale par le test de l'hémolyse au niveau des globules rouges humain. Un criblage phytochimique de quelques paramètres métaboliques a été réalisé au niveau des feuilles sur des extraits aqueux d'infusion et de décoction. L'extraction de l'huile de ricin a été effectuée par entraînement à la vapeur en présence d'un solvant (hexane) au soxhley.

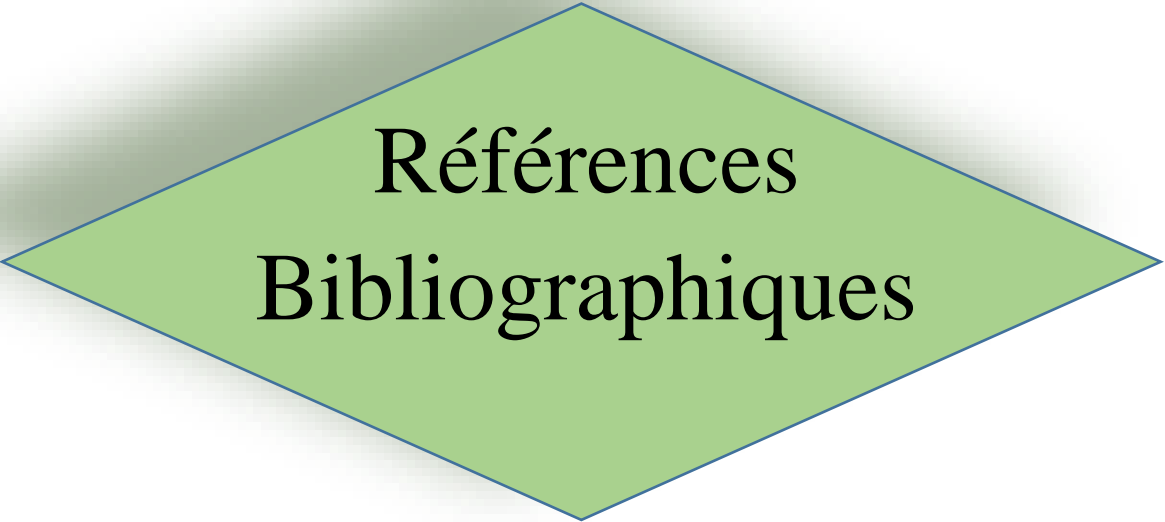
Les résultats des tests phytochimiques ont révélé une présence importante des tanins et des saponines suivis des alcaloïdes. Une absence des anthocyanes a été notée pour les deux types d'extraits

Le rendement en huile est de 35%, ce qui indique l'efficacité de la technique d'extraction utilisée

Le pourcentage de l'effet hémolytique calculé à base de l'absorbance de fuite de l'hémoglobine au niveau du surnagent montre une cytotoxicité positive pour l'ensemble des dilutions de l'huile végétale. L'effet hémolytique est plus élevé dans les extraits bruts (66.88%) suivie de la dilution 50% (53.32%) à la durée d'incubation des échantillons tests après 45 mn. l'huile du ricin possède une toxicité sur les globules rouge humains en concentration de l'extrait et le temps d'incubation de l'échantillon test.

Cette étude mérite d'être approfondie, il est nécessaire d'entreprendre d'autres études :

- ✓ Tester la toxicité de d'autres organes végétatifs du ricin et application in vivo
- ✓ Extraction de huiles essentielles et analyser sa composition chimique
- ✓ Valorisation du genre *Ricinus* dans le domaine commercial (amélioration des techniques la production de l'huile et rendement), et pharmacologique (évaluation des activités biologiques)



Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

- ✓ Aguilar M. (2007). Erythrocytes -MB7 : Hématologie. Faculté de médecine ; Montpellier, France
- ✓ Ahmad, A. (2020). Identification of edible fish species of Pakistan through DNA barcoding. *Frontiers in Marine Science*, 7, 554183
- ✓ Ali-Delille, L. (2013). *Les plantes médicinales d'Algérie*. Berti éditions.Akpan, U. G., Jimoh,
- ✓ AlSofi, A. M.. Kaidar, Z. F et. Fuseni, A. B.(2020.). « Investigation of Wettability Alteration Processes for Carbonates using the Washburn Contact Angle Method with Two Sorption Fluids », présenté à International Petroleum Technology Conference, Dhahran, Kingdom of Saudi Arabia, doi: 10.2523/IPTC-19622-MS.
- ✓ Alloune, T. (2013). SNDL: Système National de Documentation en Ligne. *Manuels d'utilisation*
- ✓ Aminrad, Z., Zakariya, S. Z. B. S., Hadi, A. S., & Sakari, M. (2012). Environmental education in Malaysia, progresses and challenges ahead. *Life Science Journal*, 9(2), 1149-1154.
- ✓ Anosike, E. O ., Chibogwu K. E. (1981). Biochemical changes during the fermentation of castor oil (*Ricinus communis*) seeds for use as a seasoning agent. *Plant Fd. Hum. Nutr.* 30: 181-185
- ✓ Aslania , M.R ., Malekib ,M ., Mohria, M ., Sharifia,K ., Najjar,V. N ., Afshari ,E. (2007). Castor bean (*Ricinus communis*) toxicosis in a sheep flock. *Toxicon.* 49: 400–406.
- ✓ Assogba, A. G. F., Couchoud, C., Benedicte, S., Roudier, C., Romon, I., Fosse, S., & Fagot-
- ✓ Aya, K., & Rania, B. (2021). Impact d'un insecticide végétale *Ricinus communis* sur la reproduction chez un insecte à intérêt médical *Blattella germanica* (L.).
- ✓ Campagna, A. (2010). P4 Les complications rénales du diabète: dépistage, prise en charge médicale et tendances 2001–2007, selon les études Entred. *Diabetes & Metabolism*, 36, A40-A41.
- ✓ Anete C. F., Miriam E. M. A., Mariana L. D. C., Pharmacological Evaluation of Ricinine, a Central Nervous System Stimulant Isolated from *Ricinus communis*. *J Pharmacol Biochemis Beh*, 63:3, 1999, 367-375.
- ✓ Belouad A., (1998). *Plantes médicinales en Algérie*. Office des publications nationale ; Algérie: 273.

- ✓ Benaissi, K. 2013. « Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale », Techniques de l'ingénieur, vol. CHV 4 015, p. 21,
- ✓ Benedicte P. (2007)-Recherche bioguide de molecules antipaludiques d'une plante guyanaise Piper hostmannianum. Université Paul Sabatier, Toulouse. Spécialité : chimie biologie santé : 22 p
- ✓ Béraud, A. (2014). Thema Working Paper n 2014-08 Université de Cergy Pontoise, France.
- ✓ Bessas, F., Saffar, A., & Hamiani, Z. (2018). *Etude de la résistance des bactéries Gram négatifs isolées des infections post partum* (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun-tiaret).
- ✓ BotreL Annie el al. ,(2007). Larousse des plantes médicinales. Edit Copyright .France . P : 6-7 ; 10
- ✓ Boukhris M A, (2009). Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires, sciences et techniques, Fès : Faculté des sciences et techniques, ,80p.
- ✓ Bruneton, C., Favre, I., Fontaine, D., Maritoux, J., & Rey, J. L. (1999). Concours pour la promotion des médicaments essentiels generiques en Afrique. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 9(1), 47-52.
- ✓ Cheema, N. M., Muhammad, A., Ghulam, Q., Malik, A. R. (2010). Characterization of castor bean genotypes under various environments using SDS6PAGE of total storage proteins. *Pak. J. Bot.* 42(3): 1797-1805.
- ✓ Chemin, I., Zoulim, F., Merle, P., Arkhis, A., Chevallier, M., Kay, A., ... & Trépo, C. (2001). High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *Journal of hepatology*, 34(3), 447-454.
- ✓ Cheng, L. L., Ma, M. J., Becerra, L., Ptak, T., Tracey, I., Lackner, A., & Gonzalez, R. G. (1997). Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the national academy of sciences*, 94(12), 6408-6413.
- ✓ Chevallier, 2001. Encyclopedia des plantes médicinales. Edit.La rousse, Paris, pp16, 293, 295.
- ✓ Couplan, F., & Styner, E. (1994). Guide des plantes comestibles et toxiques. *Edition Delauchaux et Nestlé. Paris.*

✓ Daira, N. E. H., Maazi, M. C., & Chefrour, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85(1), 276-290.

✓ Diallo, T., Hami, H., Maïga, A., Mokhtari, A., & Soulaymani, A. (2012). Étude de la prise en charge thérapeutique des intoxications aiguës dans la ville de Bamako au Mali de 2000 à 2010. *Antropo*, 26, 11-

✓ Fabre, N., Claparols, C., Richelme, S., Angelin, M. L., Fourasté, I., & Moulis, C. (2000). Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. *Journal of Chromatography A*, 904(1), 35-46.

✓ Fenneteau, O., Maier-Redelsperger, M. (2000). Apport de l'examen du frottis de sang pour le diagnostic de la pathologie constitutionnelle du globule rouge. *Revue Française des Laboratoires*, 51-62

✓ Fernández-Aguilar, S., & Noël, J. C. (2007). Tumeur phyllode maligne du sein avec cellules géantes de type ostéoclastique: à propos d'un cas. In *Annales de pathologie* (Vol. 27, No. 1, pp. 31-34). Elsevier Masson.

✓ Fine F., Vian., M. A. Tixier., A.-S. F Carre., P., Pages., X., et Chemat., F. (2013). « Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses », *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, vol. 20, no 5, p. A502, sept., doi: 10.1051/ocl/2013020

✓ Fouché, N. (2000). Des Américaines protestantes à l'origine des «University Women» françaises 1919-1964. *Bulletin de la Société de l'Histoire du Protestantisme Français (1903-)*, 133-152.

✓ Fourasté I., (2000). Rappel de la toxicité de quelques plantes. *Revue Française des Laboratoires ; Vol 2000, Issue 323. pp 51-55*

✓ Franchomme, P.; Pénoël, D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

✓ Fullbrook P D. (1983). The use of enzymes in the processing of oil seeds *J.A.O.C.S.*, Vol .60, N°2, Février, pp. 476-479

✓ Garba, A , I (2006). Production of Detergent from Castor Oil. *Pract. Technol.* 9:153-160.

✓ Garcia-Boivin, S. (1999). Retrait au jeune âge du béton: Développement d'une méthode expérimentale et contribution à l'analyse physique du retrait endogène. *THESE présentée pour*

obtenir le titre de de docteur de l'ecole nationale des ponts et chaussees-specialite: structures et materiaux

✓ Ghouri, M. Z., Ismail, M., Javed, M. A., Khan, S. H., Munawar, N., Umar, A. B., ... & Ahmad, A. (2020). Identification of edible fish species of Pakistan through DNA barcoding. *Frontiers in Marine Science*, 7, 554183.

✓ Ghourri M., Zidane L., Douira A., (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences* ; Vol. 17, ISSN 2071-7024

✓ Gordon-Smith, T., (2009). Structure and function of red and white blood cells. *Medicine* 37, 119-124.

✓ Gravot, A. (2009). *Génomique fonctionnelle des processus métaboliques impliqués dans les résistances quantitatives*(Doctoral dissertation, Université de Rennes 1).

✓ Grünwald, J., & Jänicke, C. (2006). *Guide de la phytothérapie*. Marabout,416p

✓ Guergour, H. (2018). *Etude de la toxicité d'huile de ricinus communis L sur les animaux de laboratoire* (Doctoral dissertation).

✓ 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

✓ Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. [http://hitex-co2.com/pages/co2 supercritique.php](http://hitex-co2.com/pages/co2%20supercritique.php) ,description et illustration de l'extraction au CO2 supercritique. Copyright 2005 Societe Hitex. Tous droits réservés.

✓ Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., ... & Botrel, A. (2001). Larousse des plantes medicinales: identification, préparation, soins. *Editions Larousse, Paris, 15*.

✓ Kadambi , K., Dabral, S.N.(1955) The silviculture of Ricinus communis L. *Ind. Forester*. 8(1):53-58.

✓ Kunkele, U., & Lobmeyer, T. R. (2007). Plantes médicinales, Identification, Récolte, Propriétés et emplois. *Edition Parragon. 319p*.

✓ Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. *France/Bénin: Université Louis Pasteur Starsbourg/Université d'Abomey Calavi*, 280

- ✓ Lapuelle, J., Abdini, E., Canard, J. M., Coulom, P., Croguennec, B., Letard, J. C., ... & Vicari, F. (2009). Evaluation prospective multicentrique de la qualité de la préparation colique en coloscopie chez 1019 patients. *Endoscopy*, 41(03), P264
- ✓ Laurant-Berthoud, C. (2013). *Tisanes: guide pratique pour toute la famille*. Editions Jouvence.
- ✓ Lendent, C., Mairesse, M. (2008). Rural allergy. *Rev. Franç. Allergol. Immunol. Clin.* 48(2):109-110
- ✓ Licir, I., Yahi, R., & Boukhalfoun, L. (2020). *Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits végétaux issus des feuilles sèches d'Eucalyptus sp* (Doctoral dissertation)
- ✓ Lippi, S. (2011). *Espace et psychose: métapsychologie de la spatialité à partir de la théorie psychanalytique et dans la clinique des psychoses* (Doctoral dissertation, Paris 7).
- ✓ 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.
- ✓ Lucchesi M. E., Chemat F. et Smadja J., (2004a) . Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J.Chromato A*, , Vol. 1043, pp : 323-327.
- ✓ Luicita. lagunez rivera. 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France .
- ✓ Luque de castro M.D. et Friego-Capote F. (2007) :Ultrasound assistance to liquidliquid extraction : A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*,Vol. 583, pp: 29.
- ✓ Mahmoudi, L. (1987). *Influence de l'activation thermique sur la fixation du chrome hexavalent par la Bentonite: application aux rejets de la SNVI* (Doctoral dissertation).
- ✓ Malathi B ., Ramesh, S ., Venkateswara, K. R., Dashavantha, V. R. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). *Euphytica*. 147: 441–449.
- ✓ Mane, L. *Etude in vitro des activités anti-hémolytiques et anti-inflammatoires des extraits du grignons d'olive* (Doctoral dissertation).

- ✓ 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.
- ✓ Mário, M., Espírito, S. (2007). Secondary seed dispersal of *Ricinus communis* Linnaeus (Euphorbiaceae) by ants in secondary growth vegetation minas gerais. R. *Árvore Viçosa-MG*. 31(6):1013-1018.
- ✓ Maroyi, F. M., Buzenga, M., Musimwa, T. B., & Cibambo, P. B. (2015). l'analphabetisme féminin: un de principaux facteurs de l'explosion démographique dans les milieux ruraux. cas des groupements de bugorhe et irhambi/katana, rd congo [the feminine illiteracy: one of main factors of the demographic explosion in the farming surroundings. case of groupings of bugorhe and irhambi/katana, dr congo]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11(2), 522.
- ✓ Meert, A., Mayer, C., Milani, M. M., Beckers, J., & Razavi, D. (2006). Quelle est la place du sevrage tabagique chez les patients atteints d'une affection cancéreuse. *Bulletin du cancer*, 93(4), 363-369
- ✓ Merhi, M. (2008). *Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin* (Doctoral dissertation).
- ✓ Messaoudi, S. A. (2008). General decay of solutions of a viscoelastic equation. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, 341(2), 1457-1467.
- ✓ Mohammedi, Z. (2013). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation).
- ✓ Montfort W., Jesus E. V., Arthur F. M., Stephen, R. E., Betsy Katzing. Earl R., Nuyhen H.X., Hamlin R., Robertus J. D. (1987), The Three-dimensional Structure of Ricin at 2.8 Å⁰. *Biolog Chem*, 262:11, , 5398-5403.
- ✓ Minors, D.S., 2004. Physiology of red and white blood cells. *Anaesthesia & intensive care medicine* 5, 174-178.
- ✓ Moreno, M., Wiegand, T.J., 2014. Blood. In: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 526-532.
- ✓ Marie Elisabeth Lucchesi . 2005, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Université de La Réunion, thèse .

- ✓ Nesrine, B. Y., & RANIA, B. F. (2015). Mémoire de fin d'étude. *Habitat autonome en énergie réflexion à partir d'une proposition à Tlemcen. université abou bekr belkaid.*
- ✓ ObergfolL H M .(1997). The use of enzymes in the extraction of olive oil. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.*,Volume 4, Numéro 1, pp. 35-7
- ✓ Ouedraogo y.,Nacouima.,Guisson i.p.,Guede guina f.j.,(2001). Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* (wilid).o.(rubiaceae).*Pharm.med.tra.Alr. ; Vol 1, ppl 3-29*
- ✓ Peter Klinken, S., 2002. Red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 1513-1518.
- ✓ Pharmacopée Européenne. (2007). Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France .
- ✓ Pellerin, P. 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39.
- ✓ Portier, K., N, Kirschvink., N, Fellmann., J, Coudert., P, Lequeux. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.*
- ✓ Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques.* New India Publishing, New Delhi, Inde.
- ✓ Ramprasad, R ., Bandopadhyay, R. (2010) .Future of *Ricinus communis* after completion of the draft genome sequence .*Curr. sci.* 99(10): 1316-1318.
- ✓ Sadi, N. E., & Amir-Aslani, A. (2014). Les retombées stratégiques de la divulgation volontaire d'informations sur le capital immatériel: l'exemple des firmes de biotechnologie dédiées aux sciences de la vie. *Gestion*, 39(2), 67-79.
- ✓ Sailaja, M ., Tarakeswari, M ., Sujatha, M. (2008). Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell. Rep.* 27: 1509–1519.
- ✓ Salager, J. L. . Morgan, J. C. Schechter, R. S W. H. Wade, W. H et Vasquez, E . (1979).« Optimum Formulation of Surfactant/Water/Oil Systems for Minimum Interfacial Tension or Phase Behavior », *Society of Petroleum Engineers Journal*, vol. 19, no 02, p. 107-115, avr. doi: 10.2118/7054-PA

- ✓ Salej Higgins, S., Ribeiro, A., Botrel de Vasconcellos, M., & Estevão Barbosa, J. (2014). L'émergence d'une structure cœur-périphérie dans un réseau brésilien de copublications en sciences comptables. *Communiquer. Revue de communication sociale et publique*, (12), 43-60.
- ✓ Samate, D.A., Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation. 2001, Ouagadougou, Burkina Faso
- ✓ Sanogo, R. (2006) Le Rôle des Plantes Médicinales en Médecine Traditionnelle. Développement, Environnement et Santé. 10ème école d'été de l'IEPF et SIFEE du 06 au 10 juin 2006, 53 p.
- ✓ Santiago, M. I. (2006). *The Ecology of oil: Environment, labor, and the Mexican revolution, 1900-1938*. Cambridge University Press.
- ✓ Sarra, S. R., Yayaoui Meryem, K. W., & Lina, A. (2022). Effets comparés de deux composés le bicarbonate de sodium et le *Ricinus communis* sur la reproduction chez un insecte à intérêt médical *Blattella germanica* (L.), aspect biochimique des ovaires.
- ✓ Seyfallah, G., & Bilal, B. (2020). Evaluation de l'activité insecticide de *Ricinus communis* chez un insecte à intérêt médical *Blattella germanica*.
- ✓ Silbernagl, S., Despopoulos, A., 2001. Atlas de poche de physiologie 3e édition. Médecine Sciences. Editions Flammarion
- ✓ Soulaymani A., (2010). Intoxication par *Atractylis gummifera* L. Données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc. Springer; 46(3):144-6.
- ✓ Stechmann B., Bai S. K., Gobbo E., Lopez R., Merer G., Pinchard S., Panigai L., Tenza D., Raposo G., Beaumelle B., Sauvaire D., Gillet D., Johannes L., Barbier. J., Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge, 2010.
- ✓ Sujatha, M., Reddy, T.P., Mahasi, M.J. (2008) .Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol. Adv.* 26(5): 424-435.
- ✓ Tenne, J. Kinzel, M. Arlt, F. Sibilla, M. Bocola, et U. Schwaneberg, (2013) « 2-Methyltetrahydrofuran and cyclopentylmethylether: Two green solvents for efficient purification of membrane proteins like FhuA », *Journal of Chromatography B*, vol. 937, p. 13-17, oct. 2013, doi: 10. /j.jchromb.2013.07.021.
- ✓ Wichtl, M., & Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques—Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. *Tec & Doc*, P689.

- ✓ Yaméogo, T. M., Guissou, I. P., Koné, B., Ouédraogo, R., Lankoandé, J., & Ouattara, A. (2001). Antibiothérapie pratique dans le service de gynécologie obstétrique du Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo (CHN-YO): Antibiotherapie practises in the service of gynecologie obstetrique of hospital complex national Yalgado Ouédraogo (CHN-YO). *Sciences de la Santé*, 24(2).
- ✓ Zahn-Waxler, C., Park, J. H., Usher, B., Belouad, F., Cole, P., & Gruber, R. (2008). Young children's representations of conflict and distress: A longitudinal study of boys and girls with disruptive behavior problems. *Development and Psychopathology*, 20(1), 99-119.
- ✓ Zakaria I., Ahmat N., Jaafar FM., Widyawaruyanti A., (2012). Flavonoids with antiplasmodial and cytotoxic activities of *Macaranga triloba*. *Fitoterapia* 83:968-972.
- ✓ Zerfaoui, A., Doukani, Z., & Sefha, F. (2021). synthèse enzymatique d'oléate de fructose par la lipase de *ricinus communis* l.
- ✓ Zhang M. Ma X R. Morrow, N. et Zhou, X. (1999). « Characterization of wettability from spontaneous imbibition measurements », *Journal of Canadian Petroleum Technology*, vol. 38, no 13, p. 8