

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département Sciences de la nature et de la vie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie

Thème

Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits des tubercules de la plante *Bunium incrassatum* vis-à-vis des globules rouges

Présenté Par :

- 1) Melle. DAHMANE Razika
- 2) Melle. KADA MAHAMMED Kenza
- 3) Melle. BENAÏSSA Missa

Devant le jury composé de :

Dr. BENTABET Nesrine	M C A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Présidente
Dr. BENNABI Farid	M C A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examineur
Dr. BRIXI GORMAT Nassima	M C A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2023/2024

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions "**Allah**", le tout-Puissant, de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadrante, **Dr. BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima**, maître de conférences classe A à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib, qui nous a fait l'honneur d'encadrer notre travail, pour ses orientations, ses conseils, ses efforts, ses encouragements et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury, **Dr BENTABET Nesrine**, Maître de Conférence Classe A à l'université Belhadj Bouchaib, qui nous a honoré de présider le jury de notre soutenance et **Dr. BENNABI Farid**, Maître de conférences classe A à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib, qui a bien voulu examiner ce manuscrit.

Nous remercions également tous les membres du laboratoire de biochimie de l'université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib pour leur accueil, leur collaboration et les ressources mises à notre disposition tout au long de cette recherche.

Un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

DÉDICACE

Louange à Allah, qui m'a donné la grâce de le louer et de remercier ses serviteurs.

Dédié à ceux pour qui tous les mots de gratitude et d'appréciation ne suffisent pas.

À la personne la plus chère de l'existence et la plus proche de mon cœur, à la femme

la plus gentille "**ma mère**"

À l'incarnation du sacrifice, de la noblesse et de la générosité qui m'a incité à

embrasser le savoir "**mon père**"

À ceux avec qui je partage les larmes et les rires de la vie "**ma sœur et mes frères**"

À mon cher binôme : "**Kenza et Missa**", avec qui j'ai partagé ce modeste travail

Et à tous ceux qui liront cet humble travail.

« Razika »

DÉDICACE

Je dédie ce travail

À mes chers parents, mon cœur mama et mon soutien absolu cher papa, pour leur amour, leur sacrifice, et leur soutien tout au long de mes études.

Que Dieu vous accorde une bonne santé et une longue vie.

À ma chère sœur qui m'a toujours soutenue, je te souhaite tout le bonheur du monde.

À mes chers frères pour leurs encouragements qui m'ont été d'un grand soutien.

Que Dieu vous accorde une vie pleine de joie et de bonheur.

À toute ma famille et mes proches qui sont très chers pour moi.

Enfin, je remercie mes collègues Razika et Missa.

« Kenza »

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond d'amour:

À l'être la plus chère de ma vie et ma source d'amour et d'espoir

A mon adorable mère qui a dessiné un sourire sur mon visage durant mes moments difficiles, qui n'a jamais dit non à mes exigences, et m'a soutenu et encouragée durant ces années d'études.

À mon support dans ma vie : Mon père

Pour son soutien, son affection, qui m'a supporté et m'a dirigé au cours de mes études

À ma chère sœur et mes chers frères qui sont toujours à mes côtés, pour leurs encouragements

A mes grands-parents que Dieu leur procure santé et longue vie

À toutes les personnes de mes grandes familles

À tous mes amis

À tous les personnes qui me respectent et qui m'aiment

Son oublier mon binôme qui a contribué à ce travail.

« Missa »

Résumé

Bunium incrassatum est une plante largement répandue en Algérie, appartenant à la famille des Apiaceae, connue sous le nom de "Talghouda". Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques ; d'où l'intérêt de mener une étude sur son éventuelle toxicité.

De ce fait, la présente étude porte sur l'analyse phytochimique et l'évaluation de l'activité cytotoxique des différents extraits aqueux, éthanolique et acétonique obtenus après macération des poudres de tubercules de *Bunium incrassatum*.

Les résultats des rendements obtenus sont estimés à 11,5% pour l'extrait aqueux, suivi par l'extrait éthanolique 10% et enfin l'extrait acétonique 6%. Le screening phytochimique réalisé sur ces extraits a révélé leur richesse en tanins, terpénoïdes, composés réducteurs, coumarines, quinones libres, et en flavonoïdes.

L'évaluation de la cytotoxicité par des tests d'hémolyse sur érythrocytes, en utilisant la méthode spectrophotométrique, a montré que l'extrait aqueux avait l'activité hémolytique la plus faible, inférieure à celle de l'anti-inflammatoire de référence. En revanche, les extraits éthanolique et acétonique présentent des niveaux de toxicité très faibles par rapport à l'anti-inflammatoire.

Ces résultats indiquent que les tubercules de la plante *Bunium incrassatum* constituent une source de composés bioactives, qui peuvent lui conférer des propriétés thérapeutiques ; et que cette plante a montré peu ou pas de toxicité. Cependant, d'autres études *in vivo* plus poussées seront souhaitables.

Mots clés : *Bunium incrassatum*, extraits bruts, tests phytochimiques, métabolites secondaires, cytotoxicité.

Abstract

Bunium incrassatum is a plant widely grown in Algeria, belonging to the Apiaceae family and known as "Talghouda". It is used in traditional medicine for its therapeutic properties; hence the interest in carrying out a study into its possible toxicity.

For this reason, the present study focuses on the phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic activity of the various aqueous, ethanolic and acetone extracts obtained after maceration of *Bunium incrassatum* tuber powders.

The estimated yields were 11.5% for the aqueous extract, followed by 10% for the ethanolic extract and 10% for the acetone extract 6%. Phytochemical screening of these extracts revealed that they were rich in tannins, terpenoids, reducing compounds, coumarins, free quinones and flavonoids.

Evaluation of cytotoxicity by hemolytic tests on erythrocytes, using a spectrophotometric method, revealed that the aqueous extract had the lowest hemolytic activity, lower than that of the reference anti-inflammatory. In contrast, the ethanolic and acetonic extracts showed very low levels of toxicity compared to the anti-inflammatory.

These results indicate that the tubers of the *Bunium incrassatum* plant are a source of bioactive compounds, which may confer therapeutic properties; and that this plant showed little or no toxicity. However, further *in vivo* studies would be desirable.

Key words: *Bunium incrassatum*, crude extracts, phytochemical tests, secondary metabolites, cytotoxicity.

ملخص

Bunium incrassatum هو نبات يُزرع على نطاق واسع في الجزائر، وينتمي إلى فصيلة الخيميات Apiaceae ويُعرف باسم "تلغودة". يُستخدم في الطب التقليدي لخصائصه العلاجية؛ ومن هنا جاء الاهتمام بإجراء دراسة حول سميته المحتملة. لهذا السبب، تركّز هذه الدراسة على التحليل الكيميائي النباتي وتقييم النشاط السام للخلايا لمختلف المستخلصات المائية والإيثانولية والأسيتون التي تم الحصول عليها بعد نقع مساحيق درنات *Bunium incrassatum*.

كان المردود التقديري 11.5% للمستخلص المائي، يليه 10% للمستخلص الإيثانولي و10% لمستخلص الأسيتون 6%. كشف الفحص الكيميائي النباتي لهذه المستخلصات أنها كانت غنية بالعفص والتربينويدات والمركبات المختزلة والكومارين والكينونات الحرة والفلافونويدات.

كشف تقييم السمية الخلوية عن طريق اختبارات انحلال الدم على كريات الدم الحمراء، باستخدام طريقة القياس الطيفي، أن المستخلص المائي كان له أقل نشاط انحلالي للدم، أقل من نشاط مضاد الالتهاب المرجعي. في المقابل، أظهر المستخلصين الإيثانولي والأسيتونيك مستويات منخفضة جداً من السمية مقارنةً بمضادات الالتهاب.

تشير هذه النتائج إلى أن درنات نبات *Bunium incrassatum* هي مصدر للمركبات النشطة بيولوجياً، والتي قد تمنح خصائص علاجية؛ وأن هذا النبات أظهر سمية قليلة أو معدومة. ومع ذلك، من المستحسن إجراء المزيد من الدراسات في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: *Bunium incrassatum*، المستخلصات الخام، الاختبارات الكيميائية النباتية، الأيضات الثانوية، السمية الخلوية.

TABLE DE MATIÈRES

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
1 Les plantes médicinales	3
1.1 Généralités et définitions	3
1.2 Modes de préparation d'un remède phyto-thérapeutique	4
1.3 Les métabolites secondaires	4
1.3.1 Les polyphénols.....	5
1.3.2 Les flavonoïdes	5
1.3.3 Les tanins.....	6
1.3.4 Les alcaloïdes	6
1.3.5 Les terpènes.....	7
1.3.6 Les huiles essentielles	7
1.3.7 Les coumarines.....	7
2 Généralités sur la plante <i>Bunium incrassatum</i>	8
2.1 La famille des Apiaceae	8
2.2 La plante <i>Bunium incrassatum</i>	9
2.2.1 Répartition géographique.....	9
2.2.2 Description botanique	10
2.2.3 Taxonomie et systématique	10
2.2.4 Composition phytochimique de <i>Bunium incrassatum</i>	11
2.2.5 Mode d'utilisation traditionnelle	11
3 Toxicité des plantes médicinales.....	12
3.1 Causes de la toxicité	12
3.2 Étude de la toxicité	13
4 Hémolyse	14
4.1 Les causes de l'hémolyse	14
4.2 Les différentes voies de l'hémolyse	14

4.2.1	L'hémolyse intravasculaire	14
4.2.2	L'hémolyse extravasculaire-	16
4.2.3	L'hémolyse pathologique	16
4.3	Etiologies de l'hémolyse pathologique.....	16
Matériel et Méthodes.....		18
1	Matériel végétal.....	18
2	Méthodes.....	18
2.1	Préparation des extraits.....	18
2.1.1	Préparation de l'extrait aqueux.....	18
2.1.2	Préparation de l'extrait éthanolique	19
2.1.3	Préparation de l'extrait acétonique.....	19
2.2	Le rendement des extraits secs	20
2.3	Screening phytochimique	20
2.4	Evaluation de la toxicité des extraits des tubercules de <i>Bunium incrassatum</i> vis-à-vis des globules rouges.....	22
2.4.1	Préparation du phosphate buffered saline (PBS).....	22
2.4.2	Préparation des extraits végétaux	22
2.4.3	Echantillons de sang humain.....	22
2.4.4	Préparation de la suspension des globules rouges humains	22
2.4.5	Test de cytotoxicité	23
Résultats et discussion.....		24
1	Rendement d'extraction	24
2	Screening phytochimique.....	25
3	Evaluation de la toxicité des extraits des tubercules de la plante <i>Bunium incrassatum</i> vis-à-vis des globules rouges.....	28
Conclusion et perspectives		33
Références bibliographiques		35

Liste des tableaux

Tableau I: Classification de <i>Bunium incrassatum</i>	10
Tableau II: Composition chimique de <i>Bunium incrassatum</i>	11
Tableau III: Tableau récapitulatif regroupant les caractéristiques des différents extraits.....	24
Tableau IV: Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	26

Liste des figures

Figure 1: La structure de base des flavonoïdes	6
Figure 2: Structure de la molécule d'isoprène.....	7
Figure 3: la structure de base de la coumarine	8
Figure 4: Répartition géographique mondiale des Apiacées (couleur rouge indique laprésence des Apiaceae)	9
Figure 5: Talghouda (<i>Bunium incrassatum</i>)	10
Figure 6: Schéma représentant les étapes de l'hémolyse intravasculaire	15
Figure 7: Classification des anémies hémolytiques	17
Figure 8: Matériel végétal	18
Figure 9: Protocole de préparation des extraits secs	19
Figure 10: Histogramme du rendement des différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i>	24
Figure 11: Taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'anti-inflammatoire vis-à-vis des globules rouges	29
Figure 12: Taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations d'extraits aqueux, éthanolique et acétonique des tubercules de <i>Bunium incrassatum</i> vis-à-vis des globules rouges	30

Liste des abréviations

% : Pourcentage

Ac : absorbance du contrôle

At : absorbance de l'échantillon

C° : Température en degrés Celsius

cm : Centimètre

DL : Dose létale

FeCl₃ : trichlorure de fer

g : Gramme

GR : Globules rouges

h : Heures

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique « sulfate d'hydrogène »

HB : Hémoglobine libre

Hcl : Chlorure d'hydrogène

HgCl₂ : Chlorure mercurique

HP : Haptoglobine

K₂HPO₄ : Hydrogéophosphate de potassium.

Kcl : Chlorure de potassium

KH₂PO₄ : Potassium dihydrogène phosphate

KI : Iodure de potassium

M : Mole

Mg : magnésium

mg : Milli gramme

min : Minute

mL : Milli litre

mM : Milli molaire

Nacl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Ammoniaque hydroxide

nm : Nanomètre

NO : Monoxyde d'azote

OMS : Organisation mondiale de la santé

P: Poids

PBS: Phosphate buffered saline

pH : Potentiel d'Hydrogène

Rdt : Rendements des extraits secs

Rpm : Rotation par minute

Uv : Ultraviolets

µg : Microgramme

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, la nature a été une source inépuisable de remèdes médicinaux, utilisés par l'homme pour traiter diverses maladies en raison de leurs propriétés pharmacologiques. Elle demeure la principale source de traitement dans le domaine de la médecine traditionnelle (**Abayomi, 2010**).

Selon l'organisation mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale, notamment les pays en voie développement, ont recours à la médecine traditionnelle (**Abayomi, 2010**). Ce qui a poussé la médecine moderne à s'intéresser aux plantes médicinales qui restent le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles représentent une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires au développement de futurs médicaments (**Chabrier, 2010**).

L'une des originalités majeures des plantes médicinales réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules bioactives tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, les saponines, etc. ; qui ont un impact sur plusieurs activités biologiques (activité antioxydant, antibactérienne, antifongique (**Boukri, 2014; Eddouks et al., 2007**)).

Cependant, leurs usages en permanence pourraient avoir des effets toxiques sur l'organisme d'autant plus que nous manquons de connaissance concernant la sécurité des utilisations des plantes médicinales (**Celik, 2012; Mounanga et al., 2015**).

Parmi les plantes médicinales utilisées, la plante *Bunium incrassatum* (connue sous le nom de Talghouda) est très prisée par la population d'Ain Témouchent pour le traitement des troubles thyroïdiens ; d'où l'intérêt de mener une étude sur son éventuelle toxicité pour permettre ainsi de mettre en évidence ses propriétés pharmacologiques et favoriser son utilisation.

De ce fait, l'objectif de ce travail consiste à réaliser une étude phytochimique et à évaluer l'effet hémolytique (cytotoxicité) des extraits des tubercules de *Bunium incrassatum* ; afin de connaître les risques associés à son mauvais usage.

Notre travail est divisé en trois parties :

1- Synthèse bibliographique comportant des informations sur la plante *Bunium incrassatum*, des notions sur les métabolites secondaires et sur l'activité biologique étudiée.

2- Matériel et méthodes, où nous avons réalisé la préparation des différents extraits des tubercules de *Bunium incrassatum*, ainsi que des tests phytochimiques. Nous avons aussi évalué le rendement d'extraction et l'activité cytotoxique de ces extraits vis-à-vis des globules rouges.

3- Résultats et discussion et enfin conclusion et perspectives.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1 Les plantes médicinales

1.1 Généralités et définitions

Par intuition et par expérience, l'homme a choisi les plantes alimentaires pour se nourrir, les plantes médicinales pour se soigner et les plantes toxiques pour s'en servir comme poisons de flèche à la chasse ou à la guerre.

L'homme a toujours utilisé les plantes pour lutter contre les maladies. Les premières civilisations ont reconnu les bienfaits des plantes et les ont utilisées sans vraiment expliquer l'origine de leur activité thérapeutique (**Lehmann, 2015**).

Au fil du temps, ces connaissances accumulées ont été progressivement compilées dans des recueils appelés pharmacopées qui répertorient l'ensemble des plantes et des remèdes végétaux utilisés en médecine traditionnelle. Bien qu'elles soient faciles à utiliser, certaines d'entre elles ont des effets secondaires comme tous les médicaments.

Les plantes médicinales doivent donc être employées avec précaution. De nombreuses plantes sont toxiques, voire addictives, c'est pourquoi l'idée selon laquelle tout ce qui est végétal et naturel, serait dénué de risque s'avère dangereuse (**Iserin et al., 2001; Lehmann, 2015; Nchinech et al., 2024**).

Les plantes médicinales sont définies comme celles contenant des substances actives responsables d'une action thérapeutique. Ces substances sont présentes dans une ou plusieurs parties de la plante (feuilles, écorce, fleurs, fruits, graines ou racines). Cependant, il est important de noter que les plantes médicinales contiennent des substances qui peuvent être dangereuses, nous devons donc les utiliser à bon escient (**Casanova, 1993**).

Ces plantes revêtent une importance significative dans la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme des agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. Elles sont à la base de la phytothérapie (**Khiredine, 2014**).

La phytothérapie est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparation à base de plantes (**Bensalek, 2018**).

Selon l’OMS, plus de 22000 plantes utilisées dans le monde par la médecine traditionnelle, seulement 2000 à 3000 d’entre elles ont été étudiées sur le plan scientifique.

1.2 Modes de préparation d’un remède phyto-thérapeutique

Généralement, dans les plantes médicinales, ce sont les composés actifs qui soignent. Ses composés sont des produits de leur métabolisme (**Gurib-Fakim, 2006**). Pour obtenir ces derniers, il faut faire des préparations spéciales en fonction des parties de la plante (feuilles, fleurs, racines, écorces) afin de l'extraire.

Les différentes techniques de préparation sont :

- **Infusion**

L’infusion est la façon la plus simple d’accommoder les feuilles et les fleurs pour obtenir des remèdes ou des boissons fortifiantes ou calmantes.

Elle consiste à verser de l’eau bouillante sur les parties fragiles des plantes (feuilles, fleurs) et à laisser au repos pour quelques temps. Peu à peu les substances actives sortent des plantes et on observe une coloration progressive de l’eau (**Iserin et al., 2001**).

- **Décoction**

Cette technique consiste à faire bouillir de l’eau froide dans laquelle on met des parties dures et épaisses de la plante (tiges, racines, écorces, feuilles épaisses). Les plantes libèrent leurs substances actives dans l’eau peu à peu au cours de la cuisson. La durée d’ébullition varie entre 10 et 20 min selon l’espèce (**Iserin et al., 2001**).

- **Macération**

La chaleur détruisant les principes actifs de certaines plantes, une macération à froid est parfois plus indiquée qu’une décoction ; elle consiste à immerger les plantes dans un liquide froid (vin, huile, alcool, eau) auquel elles donnent leurs propriétés et leurs arômes au bout d’un temps variable (**Iserin et al., 2001**).

1.3 Les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction

des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (**Krief, 2003**).

Ces dernières années, le rôle de certains métabolites secondaires comme conservateur des produits alimentaires est devenu un domaine de plus en plus important de la recherche en nutrition humaine. En outre, Ils peuvent avoir des effets favorables dans la prévention de cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II, qui touchent les populations à une fréquence croissante et inquiétante (**Mebarki, 2016**).

Plus de 100000 métabolites secondaires ont été identifiées. Ils appartiennent à trois classes principales qui sont : les terpènes (un groupe des lipides), les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés), et les composés phénoliques (dérivés des glucides) (**Amor, 2008**).

1.3.1 Les polyphénols

Les polyphénols représentent l'un des groupes de substances les plus abondants et répandus dans le règne végétal, comptant actuellement plus de 8000 structures phénoliques différentes (**Harborne 1993**). Ils constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales, possédant la capacité de réguler l'activité d'un large éventail d'enzymes et de récepteurs cellulaires (**Fettah, 2019**).

La structure des composés phénoliques varie depuis les noyaux aromatiques simples de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haute masse moléculaire. Ils peuvent être classés selon le nombre et l'agencement des atomes de carbone les constituants, ainsi que selon la nature de leur squelette carboné et la longueur de la chaîne aliphatique attachée au noyau benzénique (**Chira et al., 2008**).

1.3.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe principal de polyphénols formé par un squelette chimique selon la composition, le nombre et les types de substitution, ce squelette est composé de 15 atomes de carbones C6-C3-C6 de types phényl-2-benzopyrane (**figure1**) (**Harborne & Williams, 2000**).

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs. Ils agissent également en tant qu'antioxydants, inhibant l'oxydation du cholestérol-LDL, en neutralisant les radicaux libres (Pouka et al., 2015).

Les flavonoïdes sont répartis en six grandes classes: anthocyanes; flavanols; flavonols; flavones; flavanones; isoflavones (Morand, 2014).

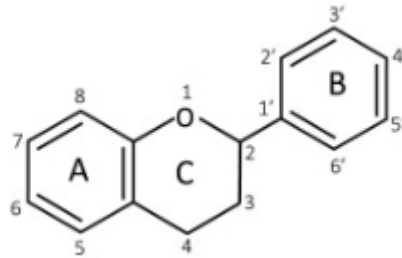


Figure 1: La structure de base des flavonoïdes (Liu et al., 2021).

1.3.3 Les tanins

Les tanins sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans les racines, les feuilles, les fruits et les graines (Aguilera-Carbo et al., 2008a). Ils se divisent en deux catégories: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Paolini et al., 2003).

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Iserin et al., 2001).

1.3.4 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés hétérocycliques azotés et basiques, qui dérivent des acides aminés. Le terme alcaloïde provient de leur propriété chimique qui les rapprochait des substances alcalines lors de leur première description faite par Meissner en 1919 (Aniszewski, 2007).

Les alcaloïdes représentent un groupe important de par leurs nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques et alimentaires (Bouaziz, 2014; Yinyang et al., 2014).

1.3.5 Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures insaturés, fréquents chez les conifères (**Moutchou et al., 2021**), de structure, soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs de (1-8) sauf dans les polyterpènes où il peuvent atteindre plus de 100 (caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (**figure2**) (**Fettah, 2019**).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (**Malecky, 2008**). Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même par les animaux (**Fettah, 2019**).

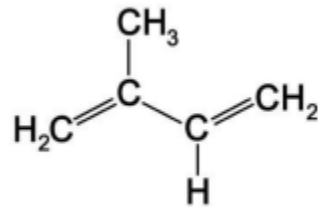


Figure 2: Structure de la molécule d'isoprène (**Fettah, 2019**).

1.3.6 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, composées de monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes ou de leurs dérivés oxygénés, sont des molécules majoritairement dissymétriques, présentes dans la nature sous une forme stéréochimique unique (**Aribi-Zouiouche & Couic-Marinier, 2023**).

Les huiles essentielles sont classiquement utilisées dans les cosmétiques, dans l'alimentation et en aromathérapie. Malgré la croyance de la population générale sur l'innocuité des produits d'origine naturelle, de nombreux effets secondaires et toxicités sont rapportés: dermatologiques, allergiques, neurologiques, cardiopulmonaires, endocriniennes, digestifs, rénaux, certains cas pouvant être fatal (**Kurihara, 2022**).

1.3.7 Les coumarines

Les coumarines doivent leur nom de classe à "coumarou", le nom vernaculaire de la fève tonka, à partir de laquelle la coumarine elle-même a été isolée en 1820. Elles peuvent

également être trouvées dans la nature en combinaison avec des sucres, sous forme de glycosides (Ojala, 2001).

Ce sont des substances organiques, naturelles et aromatiques, omniprésentes dans le règne végétal, elles sont constituées de neuf atomes de carbone, caractérisées par le noyau 2H-1-benzopyrane-2-one (figure3). Elles possèdent diverses propriétés telles que des effets analgésiques, sédatives, anti pyrétiqes, anti-œdémateuse et anticonvulsivants (Mpondo et al., 2015).

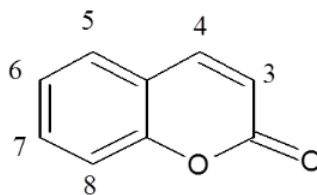


Figure 3: la structure de base de la coumarine (Karamat, 2013)

2 Généralités sur la plante *Bunium incrassatum*

2.1 La famille des Apiaceae

Les Apiacées (anciennement connues sous le nom d'Ombellifères) sont l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs (Angiospermes) ; comprenant environ 434 genres et 3780 espèces réparties dans diverses régions du monde (figure4), dont 174 poussent dans la région méditerranéenne.

Cette vaste famille est composée de plantes aromatiques d'importance économique, fréquemment utilisées comme source nutritionnelle (comme les carottes, le céleri, le persil et le fenouil), comme épices (le cumin, la coriandre, l'anis et le carvi), ou pour leurs propriétés médicinales grâce à leurs précieux métabolites secondaires (comme l'aneth, le cumin chevelu, l'anis et le cumin) (El-Assri et al., 2023).

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces (Noui & Akkal, 2018)

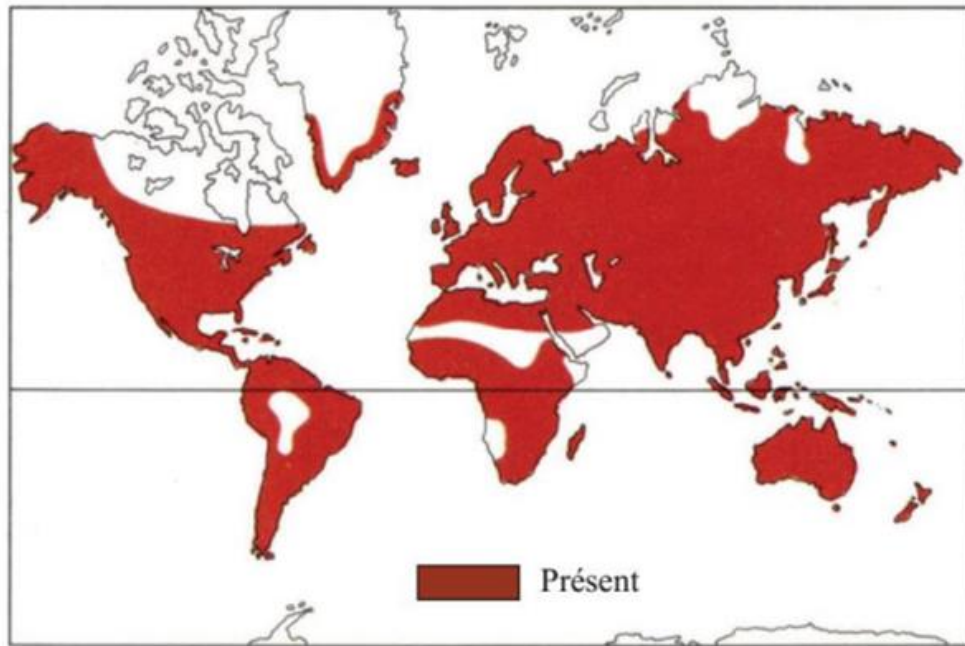


Figure 4: Répartition géographique mondiale des Apiacées (couleur rouge indique la présence des Apiaceae) (Heywood & Brice, 1996).

2.2 La plante *Bunium incrassatum*

2.2.1 Répartition géographique

"Talghouda", ou gland de terre est une plante médicinale très répandue dans les régions orientales de l'Algérie. Elle appartient à la famille des Apiaceae. C'est une plante d'une importance économique croissante. Les racines de cette plante sont assez nutritives et se consomment généralement comme des pommes de terre, mais elles sont souvent consommées directement crues (Chentouh et al., 2017).

Selon Trabut et Marès (1907), Talghouda est prétendue être *Bunium incrassatum* et *Bunium Mauritanicum*. Pour ces auteurs, cette ombellifère très commune dans les moissons du Tell, est pourvue d'un volumineux tubercule amylicé que les indigènes récoltaient dans les années de disette. Les tubercules, une fois séchés et légèrement torrifiés, donnent une farine alimentaire.

Le tubercule frais contient un produit essentiel âcre provoquant des troubles intestinaux et nerveux (Benkhalifa & Mohamed, 2019).

2.2.2 Description botanique

Bunium incrassatum est une plante ; vivace, herbacée, annuelle et sauvage, à tige dressée, fistuleuse, striée, rameuse, qui peut atteindre 60 cm de haut ; à feuilles découpées à segments étroits, linéaires, d'un vert foncé. Les fleurs en ombrelle de couleur blanche, à racine tubéreuse.

Le tubercule ayant le volume et l'aspect d'une Truffe de moyenne grosseur, rugueux, mamelonné brun noirâtre à l'extérieur, blanc à l'intérieur; ces tubercules sont comestibles (Battandier, 1888)(figure 5).



Figure 5: Talghouda (*Bunium incrassatum*) (Chentouh et al., 2018)

2.2.3 Taxonomie et systématique

Selon Cronquist, (1981), la position systématique de l'espèce *Bunium incrassatum* est représentée dans le tableau I.

Tableau I: Classification de *Bunium incrassatum*

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Dilleniidea
Ordre	Apiales
Famille	Apiacees
Genre	Bunium
Espèce	<i>Bunium incrassatum</i>

2.2.4 Composition phytochimique de *Bunium incrassatum*

Une étude phytochimique sur la plante médicinale *B. incrassatum* a montré que la partie souterraine contient les composés suivants : coumarine, saccharose, acide oléique, scopolétine, ainsi que scoparone et β -sitostérol (Bousetla et al., 2015).

D'après Hayet et al., (2017), qui ont réalisé une étude sur la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *Bunium incrassatum*, 31 composés ont été identifiés, les plus abondants sont les terpènes et leurs dérivés, mais le composant principal est l'acide palmitique (18,39 %), suivi de l'oxyde de caryophyllène (17,36 %), du β -eudesmol (13,95 %), du n-pentacosane (5,13 %), du 10-epi- α -muurolol (4,36 %), de l'hedycaryol (4,14 %) et du spatuleneol (4,04 %).

En 1884, Dugast analysa un échantillon de tubercule de glande de terre et présenta la composition chimique suivante (tableau II) (Benkhalifa & Mohamed, 2019) :

Tableau II: Composition chimique de *Bunium incrassatum*

Eau	15.66%
Cendre	5.50%
Matières azotées	7.00%
Matières grasses	1.34%
Amidon et congénères	63.12%
Cellulose	6.40%
Matières non dosés	0.98%

2.2.5 Mode d'utilisation traditionnelle

Les espèces du genre *Bunium* sont des plantes aromatiques et médicinales, dont les graines et les huiles essentielles sont utilisées dans l'alimentation et la médecine depuis longtemps, grâce à ces racines très nutritives qui sont généralement consommées comme des pommes de terre (Jassbi et al., 2005).

Dans le système de médecine indigène, les tubercules séchés et réduits en poudre sont considérés comme astringents et anti-diarrhéiques et se révèlent utiles contre les hémorroïdes

inflammatoires. En outre, cette plante est utilisée pour traiter la bronchite et la toux, ainsi que pour le traitement du dysfonctionnement de la thyroïde (**Benkhalifa & Mohamed, 2019; Bousef et al., 2015**).

Selon les guérisseurs traditionnels, cette plante est également utilisée dans le but d'augmenter le poids, la sécrétion de lait de certains animaux d'élevage (**Chentouh et al., 2017**).

3 Toxicité des plantes médicinales

L'explication du terme "toxique" est une question de point de vue (**George, 2011**). Les plantes médicinales contiennent non seulement des composants médicalement bénéfiques, mais aussi des substances potentiellement nocives (**Al Qaisi et al., 2024**).

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et son utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves qui nécessitent un traitement hospitalier et une surveillance clinique attentive, ce qui peut parfois conduire à une évolution mortelle. Cette gravité dépend de nombreux facteurs, d'une part, la partie consommée, la quantité, la prise (à jeun ou non) ; et d'autre part l'âge de l'utilisateur et les circonstances de la prise (**Oulmaati et al., 2017 ; Najem et al., 2018**).

Le principe actif d'une plante toxique peut être réparti dans toute la plante ou préférentiellement dans une ou plusieurs de ses parties : la racine, les baies, ou les feuilles (**Khattabi et al., 2010**).

Au niveau mondial, 10 % de la flore vasculaire est utilisée à des fins médicinales et nombre d'entre elles contiennent des métabolites secondaires toxiques pour les animaux, y compris l'homme. Certains métabolites secondaires toxiques appartiennent aux catégories des alcaloïdes, des phénols, des terpénoïdes, des tanins, des saponines, des cyanogènes et des acides aminés. En outre, il n'existe pas de démarcation claire entre les doses thérapeutiques et les doses toxiques des plantes médicinales (**Mugale et al., 2024**).

3.1 Causes de la toxicité

Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés non pas à la plante elle-même, mais à une

erreur d'identification (l'ambiguïté des noms vernaculaires a entraîné des confusions responsables de décès), à une contamination involontaire par une autre plante, par des métaux lourds, par des micro-organismes pathogènes ou par des résidus agrochimiques, à un non-respect de la dose adéquate ou à une interaction avec les médicaments (**Zeggwagh et al., 2013**).

De plus la toxicité des remèdes à base de plantes peut dépendre aussi des facteurs liés aux consommateurs, tels que l'âge, la génétique et les maladies concomitantes (**Djarmouni et al., 2023**). Par ailleurs, le lieu de culture de la plante et le moment de sa cueillette ont aussi une influence sur la concentration des principes actifs et, par conséquent, sa toxicité (**Khattabi et al., 2010**). Cependant, il existe plusieurs plantes toxiques remarquables pour lesquelles le produit chimique spécifique responsable de la toxicité n'a pas été déterminé (**Mugale et al., 2024**).

3.2 Étude de la toxicité

Les études toxicologiques ont recours à un ensemble diversifié de modèles expérimentaux :

- ✓ Les tests *in vivo* réalisés directement sur des animaux, de même espèce et de même sexe, de préférence des rongeurs (rats ou souris) (**scientifique, 2010; Subramanian et al., 2018**)

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL50), qui correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances (**Lu & Lu, 1992**).

- ✓ Les tests *ex vivo* effectués sur un tissu ou un organe ou partie d'organe isolé.
- ✓ Les tests *in vitro*, ayant généralement recours à l'utilisation de cellules isolées d'origine animale ou humaine, ou d'extraits cellulaires ou de protéines, afin de déterminer dans quelle mesure les fonctions cellulaires fondamentales ou spécialisées peuvent être affectées par la substance (**scientifique, 2010**).

- ✓ Les tests *in silico* permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité (**scientifique, 2010; Subramanian et al., 2018**).

4 Hémolysse

L'hémolysse est une méthode abordable, accessible et rapide pour l'évaluation initiale de la toxicité cellulaire de tous les médicaments en cours de développement (**Carpenter & van Hoek, 2024**).

L'hémolysse est la destruction de la membrane plasmique des globules rouges (GR), entraînant la libération du contenu intracellulaire de ces cellules, notamment de grandes quantités d'hémoglobine (**CHARIFI, 2023**). Ceci se reconnaît à la couleur rougeâtre du sérum ou du plasma après centrifugation, provoquée par la présence d'hémoglobine libérée par les globules rouges (**Benchekroun et al., 2007**).

L'hémoglobine libre (Hb), en consommant le monoxyde d'azote (NO) au cours de son oxydation, favorise l'activation plaquettaire, la vasoconstriction locale, et la thrombose intravasculaire (**Le Jeune, 2024**). Comme elle peut entraîner une irritation vasculaire, une anémie, une insuffisance rénale aigüe et dans certains cas, la mort (**Amin & Dannenfels, 2006**).

4.1 Les causes de l'hémolysse

Les causes de l'hémolysse sont très majoritairement (98% des cas) liées à des problèmes pré-analytiques nombreux et à diverses causes. On peut citer les hémolyses liées au patient : veines fragiles, ponction difficile, prélèvement capillaire ; au système de prélèvement : pression négative élevée dans le tube, sous remplissage des tubes ; au prélèvement : agitation trop vigoureuse des tubes prélevés ; aux conditions de transport : pneumatique, température excessive ; aux conditions de centrifugation : vitesse trop importante, re-centrifugation des tubes avec gel séparateur. Cependant, dans 2 % des cas l'hémolysse est intravasculaire, là encore les causes sont très nombreuses : héréditaires, acquises ou iatrogènes (**Ali et al., 2014**).

4.2 Les différentes voies de l'hémolysse

4.2.1 L'hémolysse intravasculaire

Celle-ci représente environ 15% de l'hémolysse physiologique, par lyse osmotique des globules rouges vieillissants ou par fragmentation dans les capillaires. Elle est majoritaire en cas d'hémolysse massive, pathologique ; ses étapes sont illustrées dans (**figure 6**) (**May, 2018**).

L'Hb libre se fixe à l'haptoglobine (Hp), qui est une α_2 globuline dont la synthèse est hépatique. Alors que la demi-vie de l'Hp plasmatique libre est de 4 à 5 jours, celle du complexe Hp-Hb est de moins de 30 minutes par catabolisme hépatique (Garby & Noyes, 1959).

Dans l'hémolyse intravasculaire, l'Hp est très abaissée, parfois indosable en cas d'hémolyse massive. L'Hb libre intravasculaire est alors en partie captée par les hépatocytes et dissociée en dimères $\alpha\beta$ qui traversent le filtre glomérulaire où ils sont partiellement réabsorbés. Si la réabsorption est saturée, l'excès d'Hb libre au niveau urinaire provoque une hémoglobinurie (May, 2018).

L'hémoglobine libérée dans la circulation se lie à l'haptoglobine, ce complexe étant ensuite éliminé par les macrophages (Abramowski, 2021).

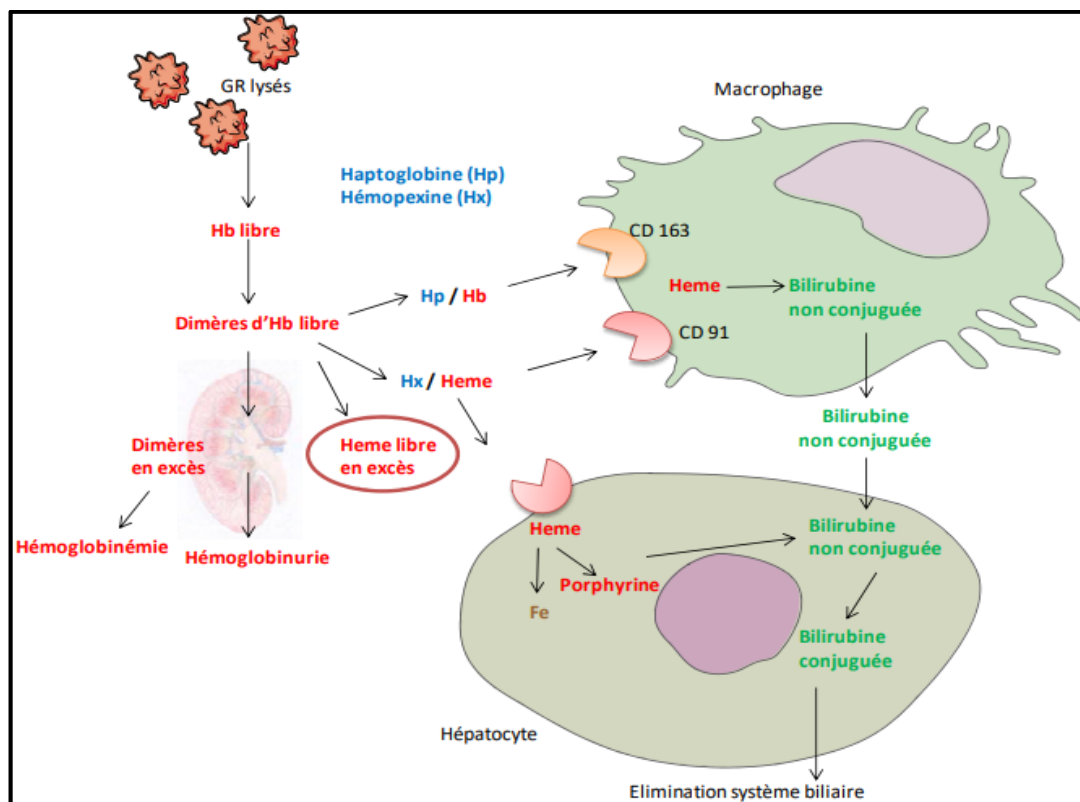


Figure 6: Schéma représentant les étapes de l'hémolyse intravasculaire (May, 2018).

4.2.2 L'hémolyse extravasculaire-

L'hémolyse extravasculaire a la particularité d'être quantitativement limitée par la capacité phagocytaire du système réticulo-endothélial, notamment par un mécanisme d'opsonisation médiée par la partie constante des immunoglobulines dans le foie et la rate, respectivement.

L'hémolyse extravasculaire, lorsqu'elle est quantitativement trop importante, peut être relayée par l'hémolyse intravasculaire. La bilirubine indirecte, insoluble dans l'eau, se lie à l'albumine. Libre et en excès, elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique et induire une toxicité cérébrale chez le nouveau-né (**Abramowski, 2021**).

4.2.3 L'hémolyse pathologique

L'hémolyse est pathologique lorsque cette destruction survient après une durée de vie raccourcie : on parle alors d'hyper-hémolyse. Si l'hyper-hémolyse est plus importante que la compensation médullaire, apparaît alors le syndrome d'anémie hémolytique définie par une hémoglobine (Hb) inférieure à 130 g/L chez homme, et une hémoglobine inférieure 120 g/L chez la femme, ainsi que par une réduction de la durée de vie des globules rouges inférieure à 120 jours, due à une destruction exagérée des hématies (**Burnat et al., 1998**).

L'hémolyse pathologique surpasse les défenses physiologiques contre la toxicité du fer provenant du groupe hémiqque de l'hémoglobine (**L'Acqua & Hod, 2015**).

4.3 Etiologies de l'hémolyse pathologique

Les hyper-hémolyses peuvent être liées à une anomalie de l'érythrocyte (anémies hémolytiques corpusculaires) Ce sont des malformations intrinsèques peuvent porter sur :

- La membrane
- Les enzymes de la glycolyse et du métabolisme des nucléotides (**Peghini & Fehr, 2002**)
- L'hémoglobine ou de sa synthèse (**Michel, 2013**)

Ou à la présence d'un agent pathogène extérieur à l'érythrocyte (anémies hémolytiques extra corpusculaires) où l'hémolyse du GR est secondaire à un facteur extrinsèque : immunologique, mécanique, infectieuse ou toxiques (Loustau et al., 2011).

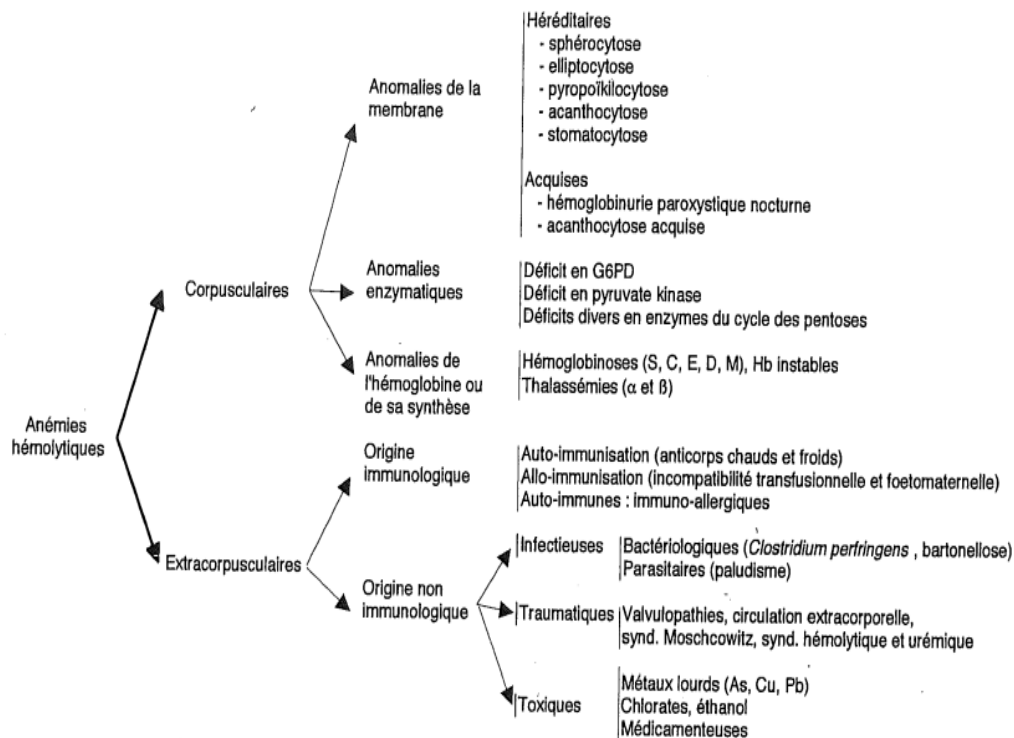


Figure 7: Classification des anémies hémolytiques (Burnat et al., 1998).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

1 Matériel végétal

Notre étude a été effectuée sur les tubercules d'une plante appartenant à la famille des Apiacées nommée *Bunium incrassatum* achetée sous forme de poudre fine chez un herboriste de la willaya d'Ain Témouchent, situé dans l'Ouest Algérien (**figure 8**).



Figure 8: Matériel végétal (photo originale, 2024)

2 Méthodes

2.1 Préparation des extraits

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules actives contenues dans les tubercules de la plante *Bunium incrassatum*, nous avons utilisé trois solvants organiques de polarités différentes : l'eau distillée, l'éthanol et l'acétone (**figure 9**).

2.1.1 Préparation de l'extrait aqueux

20 g de la matière végétale est mis en contact avec 200 ml d'eau distillée froide, L'ensemble est laissé macérer pendant une nuit sous agitation continue, Le mélange a été filtré puis évaporé à sec dans une étuve à une température de 45°C pendant 24 h. Le produit est pesé et récupéré sous forme solide dans un flacon et conservé jusqu'à son utilisation.

2.1.2 Préparation de l'extrait éthanolique

20 g du matériel végétal est mis à macération dans un mélange hydro-alcoolique à 70% (140ml éthanol/60ml eau distillée) sous agitation continue pendant 24 heures, Le macérât obtenu est filtré sur un papier filtre. Ensuite, le filtrat est évaporé à 45°C dans une étuve. L'extrait sec obtenu est pesé ; récupéré dans un flacon sous forme solide et conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

2.1.3 Préparation de l'extrait acétonique

20g de poudre végétale ont été mis en contact avec 200ml de solvant hydro-acétonique à 70% (140 ml d'acétone/60ml d'eau distillé). Le mélange est laissé macérer pendant 24 h sous agitation continue, puis filtré par un papier filtre et évaporé à sec dans une étuve à 45°C. L'extrait sec est pesé et récupéré dans un flacon sous forme solide et conservé jusqu'à son utilisation.

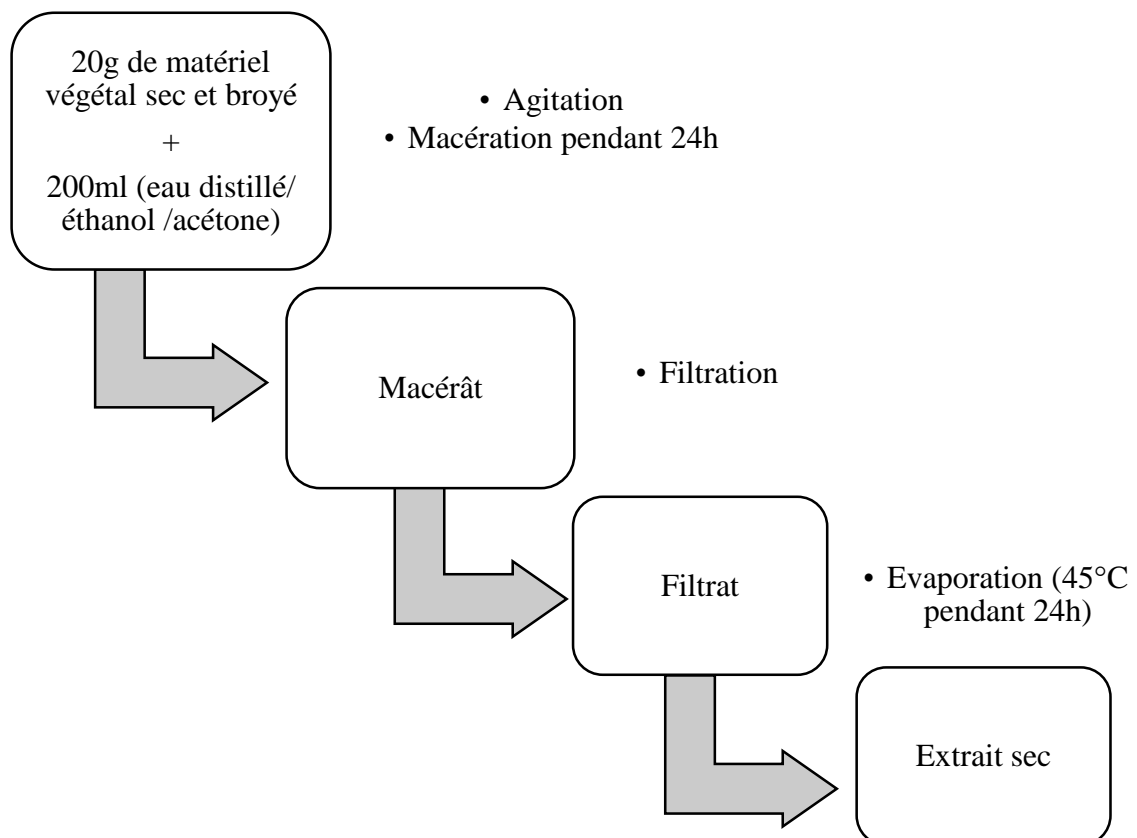


Figure 9: Protocole de préparation des extraits secs

2.2 Le rendement des extraits secs

Le rendement en extrait sec est défini comme le rapport entre le poids de l'extrait sec obtenu après l'extraction en gramme et le poids de la plante utilisée en gramme ; selon l'équation suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

Rdt : rendement de l'extrait en pourcentage

P1 : poids de la boîte après le séchage ;

P2 : poids de la boîte avant le séchage ;

P3 : poids de la matière végétale initiale.

2.3 Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les trois extraits de la plante selon le protocole de **Trease et Evans, (1987) ; Sofowora, (1993) ; Bruneton, (1999)**.

- **Les tanins**

On ajoute 3 gouttes de FeCl_3 1% à 1 ml d'extraits. Après deux minutes d'incubation, la présence des tannins est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

- **Les flavonoïdes**

2ml de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d'HCL à 37%, et avec 3 à 4 copeaux de magnésium (Mg). Le dégagement de la chaleur puis l'apparition d'une coloration rouge ou orange caractérise la présence des flavonoïdes.

- **Les Terpénoïdes**

2.5ml de chaque extrait est mélangé avec 1ml de chloroforme. Puis, 1.5 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) est ajoutés doucement. La formation d'un anneau brun rougeâtre à l'interface indique la présence des terpénoïdes.

- **Les stérols : (Liebermann-Burchard)**

On traite 1ml d'extrait avec 2.5 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d' H_2SO_4 concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

- **Les coumarines**

A 1ml de chaque extrait, on ajoute 1ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et le deuxième est traité avec 0.5 ml de NH_4OH à 10%.

La fluorescence est observée sous UV. Une fluorescence intense dans le tube où on a ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

- **Les alcaloïdes**

2.5ml d'HCl à 1 %, est ajouté à 0.1 ml d'extrait, et incubés au bain- marie pendant 10 min. La solution obtenue est divisée en 2 tubes à essais. On ajoute à l'une le réactif de Mayer et à l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Réactif de Mayer : Dissoudre 1.358g d' HgCl_2 dans 60 ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100ml.

Réactif de Wagner : Dans 75ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 127g de Iode. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

- **Les quinones libres**

A un volume de 1ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

- **Les saponosides**

2ml de chaque extrait sont dilués dans 1 ml d'eau distillée et agités vigoureusement pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par la formation d'une mousse qui persiste durant 15 minutes.

Le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1cm.

- **Les composés réducteurs**

Leur détection consiste à introduire 1ml de nos extraits dans des tubes à essais, puis 0.5ml de la liqueur de Fehling A et B sont ajoutés. Ensuite, les tubes sont portés au bain-marie bouillant à 100°C.

L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs

2.4 Evaluation de la toxicité des extraits des tubercules de *Bunium incrassatum* vis-à-vis des globules rouges

La cytotoxicité a été évaluée en utilisant les érythrocytes comme modèle biologique. Ce test évalue les dommages causés à la membrane des globules rouges par l'extrait.

2.4.1 Préparation du phosphate buffered saline (PBS)

Pour préparer la solution tampon de PBS à pH=7,4, nous avons utilisé les composés suivants avec les concentrations qui leurs correspondent : K_2HPO_4 (8Mm) ; KH_2PO_4 (2Mm) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137Mm) (Mohan, 2006).

2.4.2 Préparation des extraits végétaux

Différentes concentrations d'extraits de tubercule de notre plante (1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml et 100 mg/ml) sont solubilisées dans le PBS.

2.4.3 Echantillons de sang humain

Des échantillons de sang frais (environ 6 ml) ont été récupérés dans des tubes héparines, pris d'un volontaire humain sain âgé de 23 ans qui n'avait pas pris de médicaments anti inflammatoires, pendant les deux dernières semaines avant le prélèvement.

2.4.4 Préparation de la suspension des globules rouges humains

Les échantillons de sang récupérés ont été centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min. Le surnageant est, par la suite, éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec du PBS, jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, en centrifugeant à chaque fois à la vitesse de 3000 rpm, pendant 5 min.

2.4.5 Test de cytotoxicité

Le test est réalisé en mélangeant 1,6 ml des différentes concentrations des trois extraits à tester avec 0,4 ml de la suspension de globules rouges à 10 % dans des tubes à hémolyse. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été effectuée à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Le contrôle consiste en le mélange de 0,4 ml de la suspension de globules rouges et 1,6 ml d'eau physiologique, à la place de l'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, un anti-inflammatoire du commerce a été utilisé comme molécule de référence.

Le pourcentage d'hémolyse est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_t / A_c) * 100 \text{ (Shobana \& Vidhya, 2016)}$$

A_t : absorbance de l'échantillon (test)

A_c : absorbance du contrôle (100 % d'hémolyse)

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

1 Rendement d'extraction

Les trois extraits (aqueux, éthanolique et acétonique) ont été obtenus à partir de la partie souterraine (tubercules) de la plante *Bunium incrassatum* en utilisant la technique de macération dans des solvants de différente polarité à la température ambiante.

Le rendement, exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal ; ainsi que les caractéristiques des extraits sont représentées dans le (tableau III) et la (figure 10).

Tableau IV: Tableau récapitulatif regroupant les caractéristiques des différents extraits.

Matériel végétal	Extrait	Aspect	Couleur
<i>Bunium incrassatum</i>	Aqueux	Pâteux	Marron
	Hydro-éthanolique	Pâteux caramélisé	Marron
	Hydro-acétonique	Pâteux caramélisé	Marron

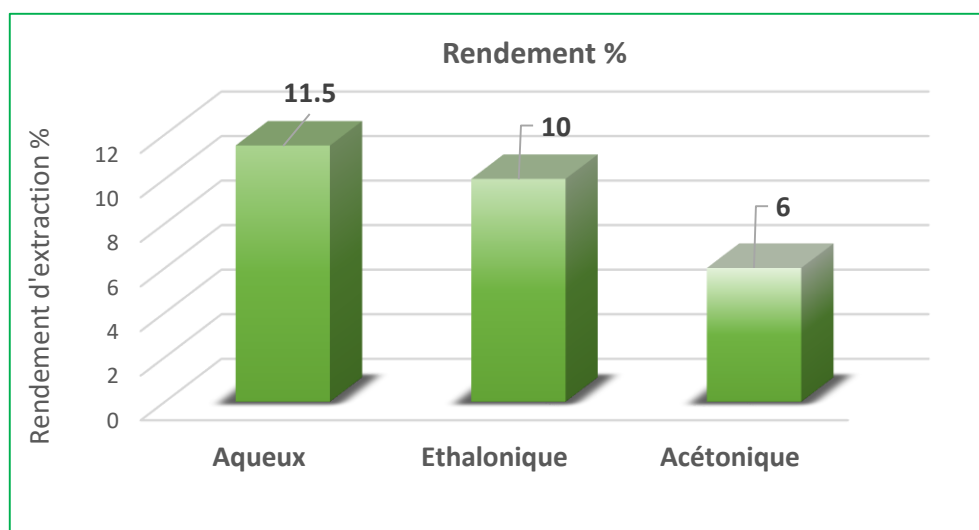


Figure 10: Histogramme du rendement des différents extraits de *Bunium incrassatum*

D'après ces résultats, l'extrait aqueux a donné le rendement le plus élevé (11,5%) par rapport aux autres extraits, suivi par l'extrait hydro-éthanolique dont le rendement est estimé à 10% et enfin l'extrait hydro-acétonique qui a montré le rendement le plus faible estimé à 6%.

Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération dans un mélange hydro-alcoolique (**Gourguillon et al., 2016**). En plus, le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de la teneur en eau dans le système éthanol, acétone et méthanol. Cela peut être dû à la combinaison du solvant organique avec l'eau qui facilite l'extraction de tous les composés qui étaient solubles à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques (**Do et al., 2014**).

Par comparaison aux autres études qui ont été faites sur les tubercules de la même plante, le résultat obtenu pour l'extrait aqueux reste supérieur à celui rapporté par (**Nassima et al., 2022**) avec un pourcentage estimé à 6,65%. Cependant, l'extrait éthanolique est légèrement plus élevé que celui trouvé dans notre étude. L'extrait acétonique est presque similaire à celui trouvé dans notre étude 6,9%. Notons que ces auteurs ont utilisé la même plante de la même région (Ain Témouchent) mais venant directement de la récolte.

Dans une autre étude menée par **Karouche et al., (2020)** sur les tubercules de *Bunium mauritanicum* récoltés dans la région d'Oum El-Bouaghi, les rendements obtenus se sont avérés être plus bas que ceux trouvés dans notre étude ; ils sont de l'ordre de 7,81% pour l'extrait méthanolique et 6,79% pour l'extrait aqueux. Ces mêmes auteurs ont enregistré des valeurs plus basses encore pour l'extrait méthanolique (3,1%) dans leur étude en 2022 (**Karouche et al., 2022**).

Plusieurs paramètres peuvent influencer le rendement d'extraction, dont le type de solvant de polarités différentes, la durée et la température de l'extraction, la plante étudiée ainsi que sa préparation (conservation, séchage et broyage), l'origine de la plante, ainsi que des facteurs climatiques (**Karouche et al., 2022; Wissam et al., 2012**).

2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique réalisé sur les différents extraits nous a permis de mettre en évidence la présence de différentes classes de métabolites secondaires présents dans notre plante par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques, ou par un examen sous la lumière UV).

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal de *Bunium incrassatum* sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau V: Résultats des tests phytochimiques des différents extraits de *Bunium incrassatum*.

Métabolites secondaires testés		Observation	Résultats		
			Extrait aqueux	Extrait Hydro-éthanolique	Extrait Hydro-acétonique
Tanins		Coloration bleue ou verte foncée	+	++	+++
Flavonoïdes		Couleur rouge ou orange	-	+	-
Terpénoïdes		Apparition de deux phases et un couleur marron en interphase	+	++	+++
Stérols		Coloration violacée virant au vert	-	-	-
Coumarines		Apparition d'une fluorescence intense	Témoin	Témoin	Témoin
			+++	+	++
Alcaloïdes	Mayer	Formation d'un précipité blanc ou brun	-	-	-
	Wagner		-	-	-
Quinones libres		Couleur jaune, rouge ou violet	+	++	+++
Saponosides		Épaisseur de mousse dépasse 1cm	-	-	-
Les composés réducteurs		Apparition d'un précipité rouge-brique	+	++	+++
+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif					

Le screening phytochimique effectué sur les trois extraits de Talghouda a mis en évidence la présence de plusieurs composés phytochimiques (**tableau VI**). Il s'agit des tanins, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des quinones libres et des composés réducteurs, avec des intensités différentes.

Cependant, nous remarquons l'absence totale de stéroïdes, alcaloïdes et saponosides dans les trois extraits testés. Les flavonoïdes sont faiblement positifs dans l'extrait éthanolique et

négatif dans l'extrait acétonique et aqueux. Quant à l'extrait hydro-acétonique, il s'est avéré plus riches en métabolites secondaires par rapport à l'extrait hydro-éthanolique et aqueux.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **(Nassima et al., 2022)** dont l'analyse phytochimique a montré que les tubercules de *Bunium incrassatum* ont enregistré la présence stérols et des saponosides et l'absence des terpénoïdes et tanins. Alors que les travaux effectués par **(Aiouaz & Bitam, 2022)** sur les tubercules de *Bunium incrassatum* sont en concordance avec nos résultats, et ont montré la présence des coumarines, avec moins de flavonoïdes.

En outre, les résultats de l'étude menée par **(Karouche et al., 2022)** ont un profil similaire. En effet, ces auteurs ont montré que les tubercules de *Bunium mauritanicum* renfermaient des tanins, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des coumarines et des flavonoïdes.

Nous avons remarqué que les groupes phytochimiques identifiés ne sont pas présents dans tous les extraits de notre plante. Ainsi, les tanins sont retrouvés dans les trois extraits. Les tanins ont plusieurs propriétés biologiques. Ils représentent le principal groupe chimique d'antimicrobiens naturels présents dans les plantes. Ils agissent comme des inhibiteurs de croissance pour de nombreux micro-organismes, y compris les bactéries, les levures et les champignons **(Aguilera-Carbo et al., 2008b)**.

Les tanins sont aussi connus pour être de bons remèdes dans le traitement des affections respiratoires et de la toux, de la diarrhée d'origine infectieuse et des dermatites, grâce à leurs propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques **(Daira et al., 2016)**.

De même les flavonoïdes sont présents dans l'extrait hydro-éthanolique. Ces composés sont associés à plusieurs bénéfices pour la santé, notamment l'amélioration du profil lipidique, de la pression artérielle, et de la vasodilatation, ainsi que la réduction des lésions athéroscléreuse, de l'inflammation, et du stress oxydatif. De plus, ces flavonoïdes possèdent des propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, antimicrobiennes, et anti tumorales **(Morand, 2014)**.

Les résultats de **Benarba et al., (2015)** ont montré que les flavonoïdes possèdent des effets thérapeutiques contre la toux, la grippe, la fièvre, l'asthme, l'hypertension, et les intoxications.

Les coumarines, fortement présents dans nos extraits, sont connus aussi par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes hypotensives, elles sont aussi bénéfiques en cas d'infections cutanées (**Daira et al., 2016**).

Comme les coumarines, les terpénoïdes sont aussi abondants dans nos extraits. Ils constituent la plus vaste famille connue des métabolites secondaires des végétaux ; ayant d'excellentes activités antimicrobiennes, antiparasitaires, anticancéreuses, anti-inflammatoires, neuroprotectrice et bien d'autres encore (**Chang et al., 2007**).

Les quinones libres sont aussi retrouvées dans notre plante. Ces quinones ont des propriétés antibactériennes, fongiques, antivirales et un pouvoir allergisant. Ils stimulent aussi le péristaltisme de l'intestin grêle et accroissent les mouvements péristaltiques du côlon (**Daira et al., 2016**).

Le criblage phytochimique des tubercules de *Bunium incrassatum*, a montré des résultats qui sont confirmés ou infirmés par d'autres, à savoir la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres tels que : la variation des conditions bioclimatiques, de la période de récolte, de l'environnement géologique des sites de récolte des échantillons qui induisent les modifications épigénétiques chez la plante. On peut dire qu'il existe de grandes variations dans la composition chimique, ce qui indique l'existence possible de chimio types (**Azizi et al., 2009; Masengo et al., 2023**).

Comme cité précédemment, tous les composés phytochimiques identifiés ont des propriétés pharmacologiques intéressantes. Cependant, Les plantes peuvent contenir aussi des substances potentiellement nocives.

3 Evaluation de la toxicité des extraits des tubercules de la plante *Bunium incrassatum* vis-à-vis des globules rouges

Outre la détermination des propriétés biologiques des plantes médicinales, il est important de vérifier son effet cytotoxique, c'est pourquoi cela devient aujourd'hui un nouveau domaine de recherche dans la découverte de médicaments.

Pour examiner la cytotoxicité dans notre étude en cours, nous avons sélectionné les globules rouges humains comme modèle de cellule animale *in vitro*. Ce test évalue l'effet cytotoxique des substances testées en mesurant le pourcentage d'hémolyse. Les résultats sont présentés sous forme de courbes, montrant le taux d'hémolyse en fonction des diverses concentrations de diclofénac qui est utilisé comme un anti-inflammatoire de référence et des extraits préparés à partir des tubercules de *Bunium incrassatum*.

Les résultats, représentés dans les **figures 11** et **12**, montrent des niveaux différents d'activité hémolytique.

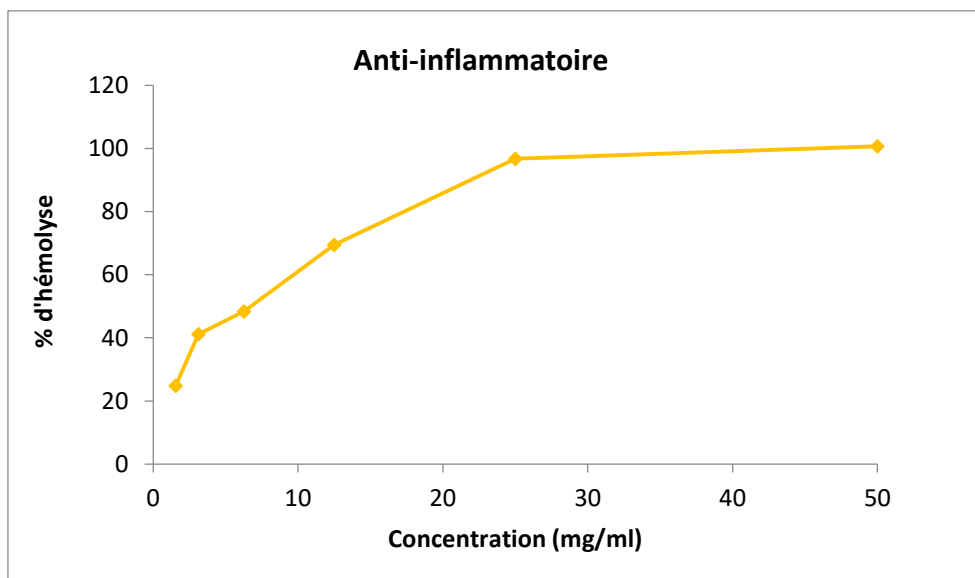


Figure 11: Taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'anti-inflammatoire vis-à-vis des globules rouges

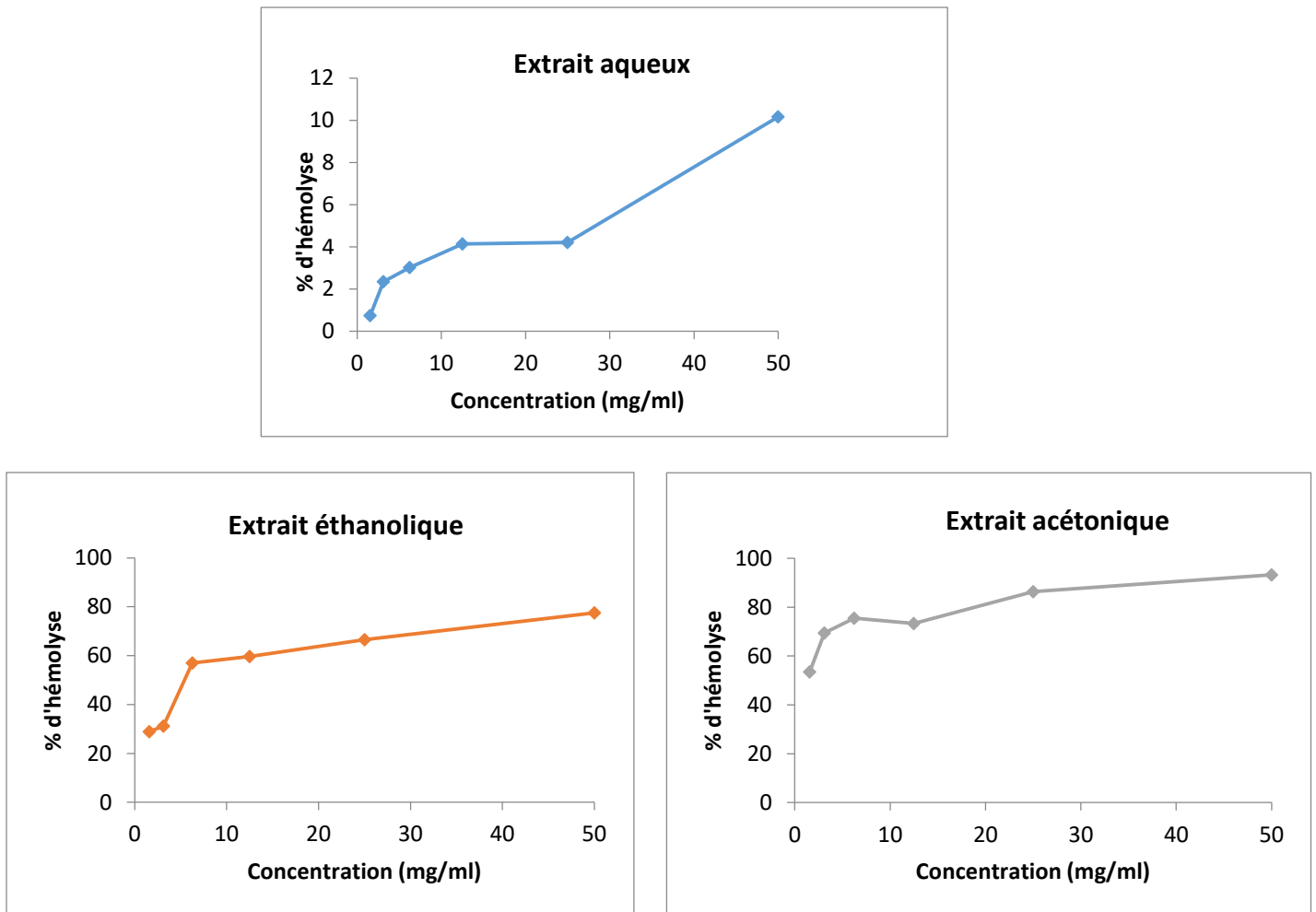


Figure 12: Taux d'hémolyse en fonction des différentes concentrations d'extraits aqueux, éthanolique et acétonique des tubercules de *Bunium incrassatum* vis-à-vis des globules rouges

D'après les courbes illustrées dans la (figure 11) et la (figure 12), nous remarquons que l'activité hémolytique des différents extraits (aqueux, éthanolique et acétonique) de *Bunium incrassatum* ainsi que celle de l'anti-inflammatoire est fortement dépendante de leurs concentrations. Plus l'extrait est concentré, plus le pourcentage d'hémolyse est élevé.

Nous constatons qu'à la concentration de 6,25 mg/ml, l'activité hémolytique de l'anti-inflammatoire atteint les 50%. De même l'extrait éthanolique a noté un taux d'hémolyse estimé à 59,96%, avoisinant celui de l'anti-inflammatoire (48,39%). Cependant, l'extrait acétonique a enregistré un taux plus élevé, estimé à 74,33% à la même concentration ; Alors que l'extrait aqueux a montré un taux d'hémolyse très faible de 3,03%.

La présence d'une toxicité au niveau de l'échantillon testé est traduite par une hémolyse résultant de la lyse de la membrane des érythrocytes. Selon (Masengo et al., 2023), L'extrait est considéré comme cytotoxique lorsque, à 10 µg/ml, le taux d'hémolyse est ≥ 50 .

On remarque aussi que l'anti-inflammatoire arrive à un pourcentage d'hémolyse de 97,77% à la concentration de 25 mg/ml, alors que l'extrait acétonique atteint 93% à la concentration de 50 mg/ml. A la même concentration l'extrait éthanolique arrive à 77,48% du taux d'hémolyse, cependant l'extrait aqueux atteint seulement 10,16% à cette concentration.

Sachant que Talghouda est une plante très utilisée par notre population, surtout dans le traitement des troubles thyroïdiens, nous avons commencé par l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction pour se rapprocher le plus au mode d'utilisation de cette plante. Et effectivement, nous avons constaté que l'extrait aqueux n'a pas présenté de cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges. L'utilisation de l'éthanol a été aussi privilégiée dans l'extraction car il a l'avantage d'être non toxique pour la santé (Mahmoudi et al., 2013). L'acétone, quand à lui, il est connu d'être parmi les solvants polaires présentant le meilleur potentiel pour l'extraction des composés phénoliques selon (Do et al., 2014). Néanmoins, l'extrait acétonique a enregistré un pourcentage dépassant les 50% du taux d'hémolyse vis-à-vis des globules rouges, cela peut être dû à la composition en métabolites secondaires de la plante (terpénoïdes et quinones) qui sont fortement présents dans cet extrait.

Selon Khattabi et al., (2010), le lieu de culture de la plante et le moment de sa cueillette ont une influence sur la concentration des principes actifs et, par conséquent, sur sa toxicité.

Très peu d'études ont été réalisées concernant l'évaluation de la cytotoxicité de Talghouda. Cependant, l'étude de (Berroukeche et al., 2022), effectuée sur les deux extraits éthanolique et acétonique des tubercules de *Bunium incrassatum*, a montré une protection maximale de la fragilité de la membrane hypotonique avec l'extrait acétonique en le comparant à la quercétine prise comme contrôle positif. Pour évaluer l'activité hémolytique, ces auteurs ont utilisé la solution hypotonique, le H₂O₂ et le Triton X qui se sont révélés puissants sur les érythrocytes humains. En revanche, cet effet hémolytique a été réduit, selon eux, par les extraits éthanoliques et acétoniques de manière dose-dépendante dans les trois hémolytiques (Berroukeche et al., 2022).

En effet, malgré leurs propriétés thérapeutiques (anti-oxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, etc...), certaines espèces végétales sont toxiques à des doses plus élevées (Hammiche et al., 2013), et peuvent interagir avec les membranes des globules rouges, les

rendant plus perméables et provoquant ainsi leur rupture, entraînant une libération de contenu cellulaire, comme l'hémoglobine, ce qui conduit à l'hémolyse ; d'où l'intérêt d'une adaptation rationnelle à la tradithérapie, notamment les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.) (**Ouedraogo et al., 2001**).

Dans cette optique, un cas de lésion cutanée secondaire à la prise par voie orale de "Talghouda" a été observé chez une personne, qui avait acheté cette plante chez un herboriste pour traiter une angine. Ce qui a conduit à son hospitalisation, avec une observation biologique notable : une hyperleucocytose, principalement éosinophile, dans son bilan sanguin (**Stambouli & Sebbagh, 2018**).

Cela peut être due à la composition de la plante, sachant que les plantes produisent de nombreuses molécules susceptibles d'interagir avec le vivant de différentes manières (**Derbré, 2016**), influençant ainsi son métabolisme et sa santé de diverses façons, en fonction des facteurs tels que la dose, la durée d'exposition, et la sensibilité individuelle. Comme c'est éventuellement dû aux conditions de stockage de cette plante chez l'herboriste, suite à l'élévation des éosinophiles dans le bilan sanguin, qui nous renseigne probablement de la présence d'une infection parasitaire (**Ouedraogo et al., 2001**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle à travers le monde et en Algérie pour le traitement de diverses maladies. De nos jours, de plus en plus de personnes se tournent vers ces méthodes thérapeutiques, en partie en raison du coût élevé des médicaments conventionnels et de leur efficacité parfois limitée. Cependant, plusieurs cas de toxicité ont été signalés dans le monde entier en raison d'une mauvaise gestion des plantes médicinales, Il est donc crucial d'étudier attentivement la toxicité des plantes, compte tenu de leur intérêt croissant.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à effectuer tout d'abord, une étude phytochimique des extraits des tubercules de *Bunium incrassatum*, afin de détecter les composants biologiquement actifs présents dans cette plante, et nous avons ensuite évalué son activité hémolytique vis-à-vis des globules rouge humains.

Les rendements d'extraction enregistrés varient en fonction de la polarité des solvants utilisés, aboutissant à des rendements de l'ordre de 11,5 % pour l'extrait aqueux, de 10 % pour l'extrait éthanolique et de 6 % pour l'extrait acétonique.

Le screening phytochimique de son côté, a révélé la richesse des tubercules de la plante *Bunium incrassatum* en composés bioactifs comme les tanins, composés réducteurs, les terpénoïdes, les coumarines, et les quinones libres.

Les tests d'hémolyse réalisés par la méthode spectrophotométrique ont montré que l'extrait aqueux ne présente pas de toxicité vis-à-vis des érythrocytes. Nous avons constaté aussi que l'extrait éthanolique est très faiblement toxique en le comparant avec l'anti-inflammatoire de référence. Alors qu'un effet hémolytique plus ou moins élevé a été enregistré avec l'extrait acétonique.

Ce travail reste préliminaire et ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances responsables de la toxicité de cette plante.

Cependant, il est intéressant d'approfondir cette étude par purification des molécules phytochimiques responsables des propriétés pharmacologiques, et d'élargir le panel des tests de cytotoxicité *in vitro* et *in vivo*.

On conclue par dire, qu'il est nécessaire d'évaluer les connaissances sur les utilisations correctes des plantes utilisées par notre population et les risques associés à leur mauvais usage. Pour cela, on devrait développer une stratégie nationale visant à normaliser l'utilisation des produits naturels, tout en garantissant une qualité, une efficacité et une sécurité optimales.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abayomi, S. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions.
- Abramowski, S. W. (2021). Hemolysis: Mechanism and clinico-biological consequences. *Transfusion Clinique et Biologique*, 28(4), 364-366.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008a). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189-199. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008b). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78, 189-199.
- Aiouaz, M., & Bitam, A. (2022). Bunium incrassatum Bois. Batt. Trab.(Talgouda) in the improvement of thyroid tissue damages in female rats. *Journal of Fundamental and Applied Pharmaceutical Science*, 2(2), 92-108.
- Al Qaisi, Y., Alfarrayeh, I., Alsarayreh, A., Khleifat, K., & Abu-Nwas, N. (2024). Assessment of Antioxidant Potential, Cytotoxicity, and Anticancer Activity of Methanolic Extracts from Selected Wild Medicinal Plants. *Phytomedicine Plus*, 100534.
- Ali, D., Sacchetto, E., Dumontet, E., Le Carrer, D., Orsonneau, J.-L., Delaroche, O., & Bigot-Corbel, E. (2014). Hemolysis influence on twenty-two biochemical parameters measurement. *Annales de biologie clinique*,
- Amin, K., & Dannenfelser, R. M. (2006, Jun). In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *J Pharm Sci*, 95(6), 1173-1176. <https://doi.org/10.1002/jps.20627>
- Amor, B. B. (2008). *Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC)* [Université de La Rochelle].

- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.
- Aribi-Zouiouèche, L., & Couic-Marinière, F. (2023). Huiles essentielles, énantiomères et activité pharmacologique. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(631), 38-42.
- Azizi, M., Davarenejad, G., Bos, R., Woerdenbag, H. J., & Kayser, O. (2009). Essential oil content and constituents of black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). *Journal of Essential Oil Research*, 21(1), 78-82.
- Battandier, J. A. (1888). *Flore de l'Algérie: ancienne flore d'Alger transformée, contenant la description de toutes les plantes signalées jusqu'à ce jour comme spontanées en Algérie* (Vol. 1). Adolphe Jourdan.
- Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., amine Bekkar, A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 626-637.
- Benchekroun, L., Rtabi, N., Guedira, A., Tanani, D. S., & Abouqal, G. (2007). Interférence de l'hémolyse sur la détermination des paramètres de biochimie clinique. *Maroc Médical*, 29(4).
- Benkhalifa, A., & Mohamed, T. (2019, 06/19). Talghouda تالغودة, une ancienne source alimentaire bien évoquée dans les soins traditionnels en Algérie. 37-39.
- Bensalek, F. E. (2018). L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des troubles fonctionnels intestinaux dans le contexte marocain.
- Berroukeche, F., Ziane, M., & Mokhtari Soulimane, N. (2022). Investigation of antioxidant and anti-hemolytic properties of Algerian *Bunium incrassatum* tubers and their effects as diet on histological and biochemical parameters of normal Wistar rats. *Asian Journal of Agriculture and Biology*(Online).
- Bouaziz, A. L. (2014). *Identification de métabolites secondaires des plantes, protecteurs des photorécepteurs à cônes pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire* Université Pierre et Marie Curie-Paris VI].

- Boukri, N. E. H. (2014). Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout. *Mémoire master. Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie*, 99.
- Bousetla, A., Zellagui, A., Derouiche, K., & Rhouati, S. (2015). Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3), 313-316. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.022>
- BRUNETON, J. 1999. Pharmacognosie Et Phytochimie Des Plantes Médicinales, 3ème Edition, Lavoisier. Paris
- Burnat, P., Vest, P., Ceppa, F., Betscoun, S., Desideri-Vaillant, C., & Vigezzi, J. (1998). Les anémies hémolytiques. *Lyon pharmaceutique*, 49(1), 10-22.
- Carpenter, A. M., & van Hoek, M. L. (2024). Development of a defibrinated human blood hemolysis assay for rapid testing of hemolytic activity compared to computational prediction. *Journal of Immunological Methods*, 113670.
- Casanova, M. V. (1993). La Phytothérapie de demain: les plantes médicinales au cœur de la pharmacie.
- Celik, T. A. (2012). Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. *A compendium of essays on alternative therapy*, 233-250.
- Chabrier, J.-Y. (2010). PLANTES MÉDICINALES PLANTES MÉDICINALES ET FORMES ET FORMES D'UTILISATION EN PHY D'UTILISATION EN PHYTOTHÉRAPIE TOTHÉRAPIE TOTHÉRAPIE.
- Chang, H.-J., Kim, H. J., & Chun, H. S. (2007). Quantitative structure– activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life sciences*, 80(9), 835-841.
- CHARIFI, F.-Z. (2023). Interférences de l'hémolyse; de l'ictère et de la lipémie sur les dosages biochimiques.
- Chentouh, S., Boulahbel, S., Adjal, F., Tolba, M., Alloua, N., Moumen, Y., & Bentayeb, Y. (2018). Effets des extraits organiques de *Bunium incrassatum* sur quelques paramètres hématologiques chez les lapines de population la race locale.
- Chentouh, S., Boulahbel, S., Ouldjaoui, A., Hammoudi, N., Djebaili, H., & Adjal, F. (2017). Effect of organic extracts of *Bunium incrassatum* on the hematological,

- ovarian and uterine parameters of mature female rabbit. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(3). <https://doi.org/10.4314/jfas.v9i3.23>
- Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., & Teissèdre, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia university press.
- 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.
- Derbré, S. (2016). Proposer des solutions efficaces et sûres en phytothérapie. *Actualités pharmaceutiques*, 55(557), 47-53.
- Djarmouni, M., BanayaD, F., & Bara, F. (2023). Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie dans la région de Sétif-Algérie. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, 45.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- Eddouks, M., Ouahidi, M., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., & Lemhadri, A. (2007). The use of medicinal plants in the treatment of diabetes in Morocco. *Phytotherapie*, 5(4), 194-203.
- El-Assri, E.-M., Hajib, A., Choukri, H., Gharby, S., Lahkimi, A., Eloutassi, N., & Bouia, A. (2023). Nutritional quality, lipid, and mineral profiling of seven Moroccan Apiaceae seeds. *South African Journal of Botany*, 160, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.06.042>
- Fettah, A. (2019). *Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante Teucrium polium L. sous espèce Thymoides de la région Beni Souik, Biskra* UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA].

- Garby, L., & Noyes, W. D. (1959). Studies on hemoglobin metabolism. I. The kinetic properties of the plasma hemoglobin pool in normal man. *The Journal of Clinical Investigation*, 38(9), 1479-1483.
- George, P. (2011). Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants-An overview. *Journal of applied pharmaceutical science*(Issue), 40-44.
- Gourguillon, L., Destandau, É., Lobstein, A., & Lesellier, É. (2016). Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie*, 19(9), 1133-1141.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., & GOETZ, P. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* (Vol. 8). Springer.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Hayet, E. K., Hocine, L., & Meriem, E. K. (2017). Chemical composition and biological activities of the essential oils and the methanolic extracts of *Bunium incrassatum* and *Bunium alpinum* from Algeria. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62(1), 3335-3341.
- Heywood, V. H., & Brice, F. (1996). *Les plantes à fleurs: 306 familles de la flore mondiale. (No Title)*.
- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., & Vican, P. (2001). *Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins. Editions Larousse, Paris, 15.*
- Jassbi, A., Mehrdad, M., Soleimani, M., Mirzaeian, M., & Sonboli, A. (2005). Chemical composition of the essential oils of *Bunium elegans* and *Bunium caroides*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 415-417.
- Karamat, F. (2013). *Identification and functional characterization of the first two aromatic prenyltransferases implicated in the biosynthesis of furanocoumarins and prenylated coumarins in two plant families: Rutaceae and Apiaceae*

- Karouche, S., Benbott, A., & Henouda, S. (2022). CONTENU PHENOLIQUE ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES FEUILLES DE L'ESPÈCE *Bunium mauritanicum*.
- Karouche, S., Benbott, A., Henouda, S., Malki, S., & Boudchicha, I. (2020). Evaluation of phenolic content and biological activities of *Bunium mauritanicum* tubers. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 12(2), 916-930.
- Khattabi, A., Rhalem, N., Chabat, A., Skali, S., & Soulaymani-Bencheich, R. (2010). Plantes toxiques : définition et classification. *Toxicologie Maroc*, 2, 3-4.
- Khireddine, H. (2014). *Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie*
- Krief, S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées* Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS].
- Kurihara, F. (2022). Dermatoses induites par les huiles essentielles ou végétales. *Revue Française d'Allergologie*, 62(3), 279-281.
- L'Acqua, C., & Hod, E. (2015). New perspectives on the thrombotic complications of haemolysis. *British Journal of Haematology*, 168(2), 175-185.
- Le Jeune, S. (2024). Hémolyse intravasculaire et thrombose. *JMV-Journal de Médecine Vasculaire*, 49(1), 9-10.
- Lehmann, H. (2015, Sep). [Medicinal plants in France, between pharmacy and herb trade: historical and legislative aspects]. *Ann Pharm Fr*, 73(5), 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.02.005> (Les plantes médicinales en France, entre pharmacie et herboristerie : aspects historiques et législatifs.)
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12824.
- Loustau, V., Guillaud, C., Garçon, L., Godeau, B., & Michel, M. (2011). Anémie hémolytique chez l'adulte: principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale*, 40(5), 470-485.

- Lu, F. C., & Lu, F. C. (1992). *Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque*. Masson Paris.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Malecky, M. (2008). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* [Institut national agronomique Paris-Grignon].
- Masengo, C. A., Ngbolua, K. N., Omeonga, S. L., Nzuzi, N. P., Ilumbe, G. B., & Mpiana, P. T. (2023). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antiradicalaire, anti-inflammatoire, antirépanocytaire et cytotoxique des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 11(3), 303-312.
- May, O. (2018). *Etude du tropisme rénal du syndrome hémolytique et urémique atypique: susceptibilité endothéliale glomérulaire à l'hème et découverte de RAGE comme un nouveau récepteur de l'hème* [Université de Lille].
- Mebarki, L. (2016). *Recherche d'activité biologique de molécules végétales pour la lutte contre Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* Phd thesis, University of Sciences and Technology, Mohamed Boudiaf (USTOMB ...).
- Michel, M. (2013). Diagnostic d'une anémie hémolytique en réanimation. *Réanimation*, 22(5), 477-489.
- Morand, C. (2014). Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique. *Médecine des maladies métaboliques*, 8(5), 477-482.
- Mounanga, M. B., Mewono, L., & Angone, S. A. (2015). Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 618-627.
- Moutchou, S., Badjah-Hadj-Ahmed, Y., Khemici, M., & Aïd, F. (2021). Évolution saisonnière des terpènes de l'écorce et des aiguilles chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). *Ann. Rech. For. Algérie*, 11(01), 31-41.
- Mpondo, E. M., Yinyang, J., & Dibong, S. (2015). Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 85, 7804-7823-7804-7823.

- Mugale, M. N., Dev, K., More, B. S., Mishra, V. S., Washimkar, K. R., Singh, K., Maurya, R., Rath, S. K., Chattopadhyay, D., & Chattopadhyay, N. (2024). A Comprehensive Review on Preclinical Safety and Toxicity of Medicinal Plants. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 100129.
- Nassima, B. G., Khouloud, B., El-Houda, H. A. N., Hena, A., & Zahra, H. F. (2022). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Bunium pachypodium* PW Ball (Apiaceae) tubers from Algeria.
- Nchinech, N., Khalfaoui, H., Chabat, A., Rhalem, N., Bencheikh, R. S., Achour, S., Bousliman, Y., Nejjari, R., & Zakariya, I. (2024). Overview of medicinal plants-induced nephrotoxicity: A national pharmacovigilance study from Morocco. *Toxicologie Analytique et Clinique*.
- Noui, A., & Akkal, S. (2018). *Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante Daucus muricatus (Apiaceae)* Université Frères Mentouri-Constantine 1].
- Ojala, T. (2001). *Biological screening of plant coumarins* Citeseer].
- Ouedraogo, Y., Nacoulma, O., Guissou, I., & Guede Guina, F. (2001). Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (Willd). O. Ktz (Rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 11, 13-29.
- Paolini, V., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Revue Alter Agri*, 61, 17-19.
- Peghini, P., & Fehr, J. (2002). Diagnostic étiologique des anémies. *Forum Med Suisse*,
- Pouka, M. K., Ngene, J.-P., Ngoule, C. C., Ottou, P. M., Ndjib, R. C., Dibong, S. D., & Mpondo, E. M. (2015). Caractérisation des plantes médicinales à flavonoïdes des marchés de Douala (Cameroun). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1494-1516.
- scientifique, G. d. i. (2010). ETAT DES LIEUX DES METHODES ALTERNATIVES DANS LE DOMAINE DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE EN FRANCE. *Francopa*, 18-22
- Stambouli, O. B., & Sebbagh, B. (2018). Toxidermie induite par phytothérapie (la châtaigne de terre ou talghouda). *Revue Française d'Allergologie*, 58(3), 248-249.

- SOFOWORA, A. 1993. Recent Trends In Research Into African Medicinal Plants. *Journal Of Ethnopharmacology*, 38, 197-208
- Subramanian, K., Sankaramourthy, D., & Gunasekaran, M. (2018). Toxicity Studies Related to Medicinal Plants. In *Natural Products and Drug Discovery* (pp. 491-505). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102081-4.00018-6>
- TREASE, G. & EVANS, W. 1987. A Text Book Of Pharmacognosy. ELBS/Bailliere Tindal. Oxford
- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 675-682.
- Yinyang, J., Mpondo Mpondo, E., Tchatat, M., Ndjib, R. C., Mvogo Ottou, P. B., & Dibong, S. D. (2014). Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 78(1). <https://doi.org/10.4314/jab.v78i1.7>
- Zeggwagh, A. A., Lahlou, Y., & Bousliman, Y. (2013). Enquete sur les aspects toxicologiques de la phytotherapie utilisee par un herboriste à Fes, Maroc. *The Pan African Medical Journal*, 14.