



الشعبية لجمهورية الجزائرية الديمقراطية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



## *Université Frères Mentouri Constantine 1*

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biochimie Appliquée

### *Thème*

**Evaluation de l'activité antifongique et hémolytique  
des extraits acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux des feuilles  
d'*Abies numidica***

**Soutenu le : 17/07/2019**

**Par :** *SENGOUGA Chehinez*      *DENDANI Oumeima*

#### **Jury d'évaluation :**

**M. KHELIFI Douadi**

Professeur ENSB

**Président**

**M<sup>me</sup>. BELLIL Inès**

MCA Univ. Constantine 1

**Encadrante**

**M<sup>me</sup> MOSBAH Asma**

MCA Univ. Constantine 1

**Examinatrice**

**Année universitaire 2018/2019**

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution “

*Th. Dobzhansky (1973)*

# Remerciements

*En préambule à ce mémoire, louange à Dieu le tout miséricordieux pour son guide, son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui nous a permis de mener à bien ce travail*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mme « **BELLIL Ines** » maître de conférences (Classe A) à la faculté SNV, Université Frères Mentouri – Constantine 1, d'avoir accepté de nous encadrer, nous la remercions pour sa disponibilité et son aide tout le long de ce modeste travail, qu'elle trouve ici toutes nos gratitude. Nous vous en sommes très reconnaissantes et en espérant être à la hauteur de votre confiance*

*Nous remercions également la doctorante **BENOUCHEMNE Djamil**a pour ses conseils précieux, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour sa grande patience, sa modestie, sa générosité.*

*Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Que Professeur. **KHELIFI DOUADI**, trouve ici l'expression de nos respectueuses gratitude et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury et avant tout pour avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire pour effectuer ce travail.*

*Nous remercions également l'examinatrice de ce travail, **MOSBAH ASMA**. Maître DE CONFERENCE A. Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire de mycologie de Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine pour leur collaboration.*

*Nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*



# Dédicace

*Grace a la volonté divine d'Allah notre dieu tout puissant et bien veillant qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédie !*

*A mes très chers parents : Rachid et Fatima*

*Pour les encouragements, sacrifices, tendresse, amour et soutien durant mes études, je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêves par ce modeste travail. Puisse Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.*

*A mon fiancé et mon amour : Fares qui m'encourage toujours à aller plus loin. Merci de m'avoir montré beaucoup de patience durant les moments les plus stressants ainsi que son encouragement*

*A mes chers frères : Aymene, Ahmed Yacine*

*A mes chères sœurs : Rafah, Allae*

*A ma chère tante : Abla et ces filles Norssine, Bailassene*

*A Ma très chère grand-mère*

*A ma binôme et chère amie : Dendeni Oumeima*

*A mes chères amies : Kaouther, Massilia, Nesrine, Sara*

*A tous ma famille*

*A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université*

*A toute personne ayant contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail*

*A toute mes collègues de la promotion de Master II Biochimie appliquée je leur souhaite beaucoup de réussite.*

**CHEHINEZ**



# Dédicace

Avant tout, je remercie le **BON DIEU** le tout miséricordieux  
Qui m'a donné la patience et la volonté pour arriver à ce stade et  
réaliser ce travail, que je dédie aux êtres les plus chères à mon cœur :

*A la meilleure de toutes les mères, source d'amour et d'affection*  
**TALEHA RATIBA**

*A la prunelle de mes yeux, l'homme de ma vie mon très cher père*  
**MOHAMED**

Mes chers et tendres parents, merci merci et mille merci pour vos prières, pour tout le soutien  
que vous me portez depuis mon enfance, pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon  
instruction et mon bien être, pour votre amour infini et votre bienveillance jour et nuit, j'espère  
que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés. Puisse dieu, vous garder à  
mes côtés le plus longtemps possible. Je vous adore

*A mon très cher frère :* TADJ EDDINE NAWFEL

*A mes chères sœurs :* IMENE, CHAHLA, SIHEM

Que dieu nous garde si tendres et aimants les uns envers les autres

*A mes adorables nièces :* MIRNA, SALSSABIL, ASSIL

*A mon binôme et chère amie :* SENGOUGA CHAHINEZ

*A mes très chères amies :* ASMA, MANEL, IBTISSEM, SARA

Un grand merci et une forte pensée à tous mes autres amis

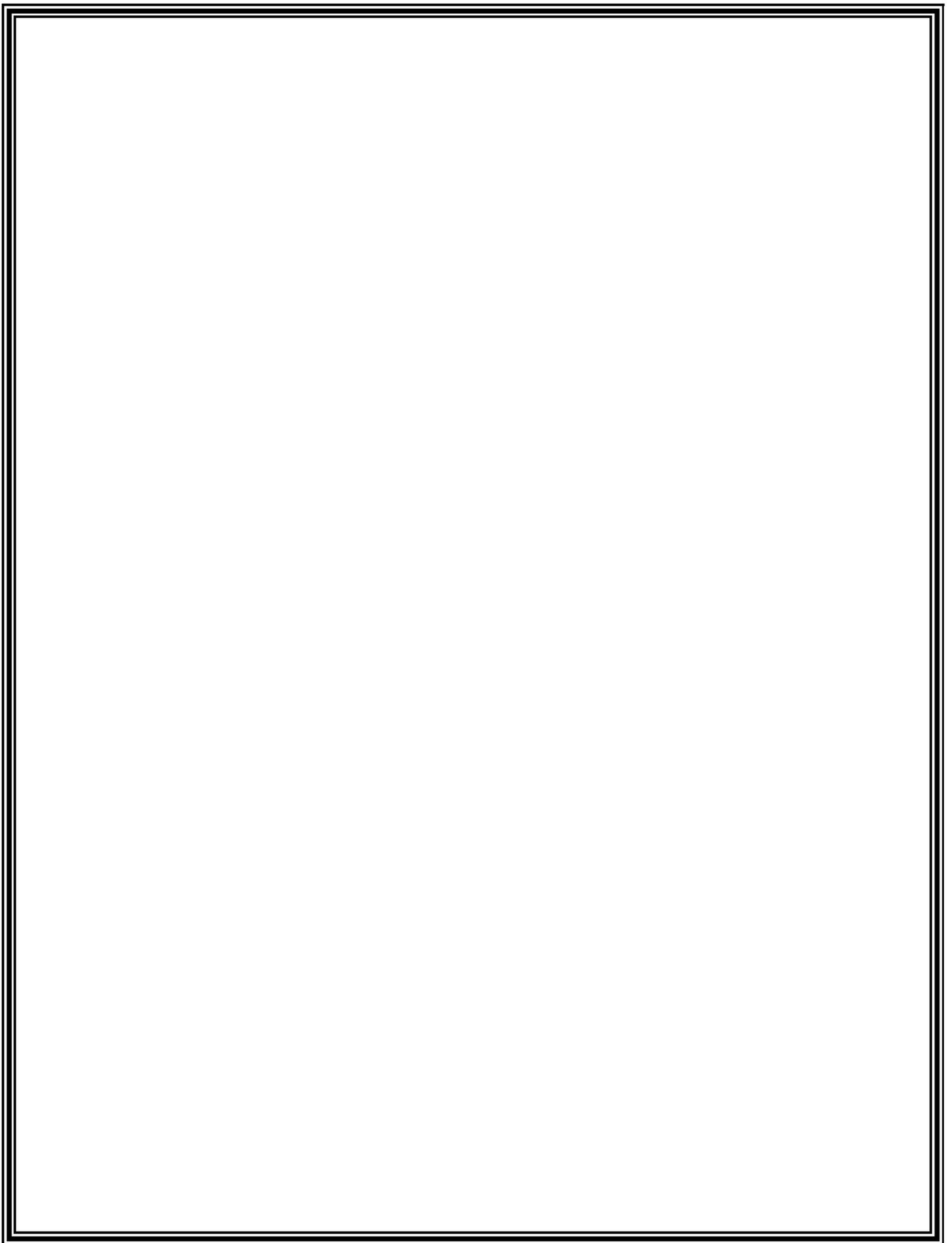
Et collègues que je ne pourrais citer en entier, merci pour

Ces merveilleuses années passées ensemble

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment*

**OUMEIMA**





# *Sommaire*

# Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Résumé .....	IV
Abstract.....	V
ملخص .....	VI
Introduction .....	01

## Chapitre 01 : synthèse bibliographique

### Partie 01 : *Abies numidica*

1. Historique.....	03
2. Distribution géographique.....	03
2.1 Répartition dans le monde et les pays méditerranéennes.....	03
2.3 Répartition en Algérie .....	04
3. Description botanique.....	05
4.Nomenclature.....	06
5.Classification systématique .....	07
6. Usage traditionnelle et thérapeutique.....	07

### Partie 02 : Les Métabolites Secondaires

1. Les composés phénoliques.....	09
1.1. Les acides phénoliques.. ..	09
1.2. Les flavonoïdes.....	10
1.3. Les tannins.....	12
1.3.1.les tannins hydrolysables.....	12
1.3.2.les tannins condensé.....	13
1.4. Les lignines.....	13
1.5. Les coumarines.....	14
2. Les terpénoïdes.....	14
3. Les saponosides.....	15
4. Les alcaloïdes.....	15
5. Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	18

## Partie 03 : Présentation de champignon pathogène

1. Les champignons phytopathogènes.....	19
2. Le <i>Fusarium</i> .....	19
2.1. <i>Fusarium oxysporium</i> .....	19
2.1.1. Classification.. ..	20
2.1.2. Morphologie.....	21
2.1.3. Cycle de vie.....	22

## Partie 04 : L'Hémolyse

1. les globules rouges.. ..	24
2. la membrane érythrocytaire.....	24
3. l'hémolyse.....	25
3.1 L'hémolyse physiologique.....	26
3.1.1. L'hémolyse intravasculaire .....	26
3.1.2. L'hémolyse intratissulaire.....	26
3.2. L'hémolyse pathologique .....	26

## Chapitre 02 : Matériels et Méthodes

1. Préparation de matériel végétal .....	28
1.1. Echantillonnage .....	28
1.2. Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.....	29
1.2.1 Extraction par macération .....	29
1.2.2 Extraction par macération a l'eau.....	29
1.2.3 Fractionnement de l'extrait méthanolique.....	29
2. Rendement d'extraction .....	31
3. Screening phytochimique .....	31
4. Dosage des métabolites secondaires.....	33
4.1. Dosage des polyphénols.....	33
4.2. Dosage des flavonoides.....	34
5. Activité antifongique.....	34
5.1. Préparation de champignon.....	34
5.2. Stérilisation du matériels.....	34
5.3. Préparation des extraits.....	34

5.4. Préparation de milieu de culture.....	34
5.5. Application des disques mycéliennes.....	34
6.Evaluation de l'effet hémolytique.....	38
6.1. Préparation du suspension érythrocytaire.....	38
6.2. Préparation des extraits.....	38
6.3. Test d'hémolyse.....	38
6.4. Analyse statistique.....	39

### Chapitre 03 : Résultats et Discussions

1.Etude photochimique.....	40
1.1. Rendement d'extraction.....	40
1.2. Screening photochimique.....	41
1.3. Dosage des métabolites secondaires.....	43
1.3.1. Dosage des polyphénols.....	43
1.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	45
2.Etudes biologiques.....	47
2.1. Activité antifongique.....	47
2.1.1. Evaluation de la croissance mycélienne.....	47
2.1.1. Pouvoir antifongique .....	52
2.2. Evaluation de l'effet hémolytique des feuilles d' <i>Abies numidica</i> .....	55
Conclusion.....	61

Références bibliographiques

Annexes

# Listes Des Figures

<b>Figure 01</b> : Distribution géographique des espèces <i>Abies</i> dans la région méditerranéenne.....	<b>02</b>
<b>Figure 02</b> : Description botanique de <i>Abies numidica</i> (a, b, c) .....	<b>04</b>
<b>Figure 03</b> : Formule générale des dérivés de l'acide benzoïque.....	<b>07</b>
<b>Figure 04</b> : Structure de base des flavonoides.....	<b>08</b>
<b>Figure 05</b> : Structure de l'acide gallique (a) et structure de l'acide ellagique (b).....	<b>10</b>
<b>Figure 06</b> : Structure des tanins condensés.....	<b>11</b>
<b>Figure 07</b> : Structure de base des coumarines.....	<b>12</b>
<b>Figure 08</b> : Exemple de structures alcaloïdiques.....	<b>15</b>
<b>Figure 09</b> : Aspect microscopique du <i>F. oxysporum</i> (a, b, c) .....	<b>20</b>
<b>Figure 10</b> : Cycle de vie de l'agent pathogène de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	<b>21</b>
<b>Figure 11</b> : Globules rouges.....	<b>22</b>
<b>Figure 12</b> : Structure de la membrane érythrocytaire.....	<b>23</b>
<b>Figure 13</b> : L'arbre de <i>Abies numidica</i> dans région de Sétif (photo originale).....	<b>27</b>
<b>Figure 14</b> : Feuilles de <i>Abies numidica</i> fraîches (photo originale).....	<b>28</b>
<b>Figure 15</b> : Feuilles de <i>Abies numidica</i> sèches (photo originale).....	<b>28</b>
<b>Figure 16</b> : Feuilles de <i>Abies numidica</i> après broyage (photo originale).....	<b>28</b>
<b>Figure 17</b> : Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.....	<b>30</b>
<b>Figure 18</b> : Protocole de l'activité antifongique.....	<b>37</b>
<b>Figure 19</b> : Protocole de l'activité hémolytique.....	<b>40</b>
<b>Figure 20</b> : Rendement (%) des extraits des feuilles de <i>Abies numidica</i> .....	<b>41</b>
<b>Figure 21</b> : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	<b>44</b>
<b>Figure 22</b> : la courbe d'étalonnage de la quercétine.....	<b>46</b>
<b>Figure 23</b> : Activité d'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>49</b>
<b>Figure 24</b> : Activité d'extrait n-butanol vis-à-vis de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>49</b>
<b>Figure 25</b> : Activité d'extrait aqueux vis-à-vis de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>49</b>
<b>Figure 26</b> : Effet de l'extrait acétate d'éthyle sur la souche de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>50</b>
<b>Figure 27</b> : Effet de l'extrait n-butanol sur la souche de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>51</b>
<b>Figure 28</b> : Effet de l'extrait aqueux sur la souche de <i>F.oxysporum</i> .....	<b>52</b>

<b>Figure 29</b> : Taux d'inhibition de <i>F. oxysporum</i> par l'extrait acétate d'éthyle n-butanol et aqueux des feuilles d' <i>Abies numidica</i> .....	<b>53</b>
<b>Figure 30</b> : L'évaluation de Taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait acétate d'éthyle d' <i>Abies numidica</i> durant 60 min .....	<b>55</b>
<b>Figure 31</b> : L'évaluation de Taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait n-butanol d' <i>Abies numidica</i> durant 60 min.....	<b>56</b>
<b>Figure 32</b> : L'évaluation de Taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait aqueux d' <i>Abies numidica</i> durant 60 min.....	<b>56</b>
<b>Figure 33</b> : Evaluation de taux d'hémolyse (%) des différentes concentration d'extrait acétate d'éthyle après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.....	<b>57</b>
<b>Figure 34</b> : Evaluation de taux d'hémolyse (%) des différentes concentration d'extrait acétate d'éthyle après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.....	<b>58</b>
<b>Figure 35</b> : Evaluation de taux d'hémolyse (%) des différentes concentration d'extrait acétate d'éthyle après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.....	<b>58</b>

# Listes Des Tableaux

<b>Tableau 01</b> : caractéristiques morphologiques de l' <i>Abies Numidica</i> .....	<b>03</b>
<b>Tableau 02</b> : Classification de la plante <i>Abies Numidica</i> .....	<b>05</b>
<b>Tableau 03</b> : Les principales familles de flavonoïdes.....	<b>09</b>
<b>Tableau 04</b> : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes.....	<b>13</b>
<b>Tableau 05</b> : Les activités biologiques des composés phénoliques.....	<b>16</b>
<b>Tableau 06</b> : Les formes spéciales importantes de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	<b>18</b>
<b>Tableau 07</b> : Aspects, couleurs et rendement massique (%) des extraits obtenus .....	<b>40</b>
<b>Tableau 08</b> : Teste photochimique des extraits aqueux, acétate d'éthyle et n-butanol des feuilles d' <i>Abies numidica</i> .....	<b>42</b>
<b>Tableau 09</b> : Teneurs en polyphénols totaux.....	<b>44</b>
<b>Tableau 10</b> : Teneurs en flavonoides.....	<b>46</b>
<b>Tableau 11</b> : les effets des extraits des feuilles d'abies numidica sue la croissance de <i>F. oxysporum</i> .....	<b>48</b>

# *Listes Des Annexes*

**Annexe N° 01 :** Etapes de préparation de milieu PDA

**Annexe N° 02 :** Préparation des différents extraits testés

**Annexe N° 03 :** Ecoulement des boites de pétri

**Annexe N° 04 :** Repiquage successif

**Annexe N° 05 :** Dépôt des disques mycéliens

**Annexe N° 06 :** Les boites avant et après incubation

**Annexe N° 07 :** Evaporateur rotatif de type Buchi R-215

**Annexe N° 08 :** Broyeur mécanique de type « Moulinex »

**Annexe N° 09 :** Ampoule à décanter + support

**Annexe N° 10 :** Autoclave

**Annexe N° 11 :** Etuve

**Annexe N° 12 :** Centrifugeuse

**Annexe N° 13 :** Etuve

**Annexe N° 14 :** Spectrophotomètre

**Annexe N° 15 :** Balance

**Annexe N° 16 :** Agitateur

**Annexe N° 17 :** Vortex

**Annexe N° 18 :** Préparation de PBS (phosphate buffered saline)

**Annexe N° 19 :** Préparation des extraits pour l'activité hémolytique

**Annexe N° 20 :** Préparation de la suspension érythrocytaire

**Annexe N° 21 :** Evaluation de l'activité hémolytique

**Annexe N° 22 :** Préparation des réactifs pour tests phytochimiques

# *Listes Des Abréviations et Symboles*

- A** : *Abies*
- Sp** : Espèce
- Ac** : Acide
- Da** : Dalton
- UV** : Ultras Violets
- OH** : Groupement hydroxyle
- R** : Radical
- COA** : Coenzyme A
- N** : Azote
- F** : *Fusarium*
- Oxy** : *oxysporum*
- GR** : Globules Rouges
- RBC** : Red Blood Cell
- µm** : Micromètre
- O<sub>2</sub>** : Le gaz d'oxygène
- CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone
- ATP** : Adénosine triphosphate
- Na<sup>+</sup>** : Ion sodium
- Ca<sup>2+</sup>** : Ion calcium
- K<sup>+</sup>** : Ion potassium
- Cl<sup>-</sup>** : Ion chlorure
- Hco<sub>3</sub>** : Bicarbonate
- HB** : Hémoglobine

**LDH** : Lactate déshydrogénase

**MEOH** : Méthanol

**EAq** : Extrait aqueux

**EAc** : Extrait acétate d'éthyle

**EBut** : Extrait butanol

**Rd%** : Rendement en %

**Me** : Masse de l'extrait sec (en g)

**Mp** : Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (en g)

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

**Hcl** : Chlorure d'hydrogène

**Mg** : Magnésium

**NH<sub>4</sub>OH** : Ammoniaque

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

**V/V** : Volume par volume

**SM** : Solution mère

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**I** : Taux d'inhibition en %.

**C** : Croissance radiale de l'agent phytopathogène (en mm)

**T** : La croissance radiale de l'agent phytopathogène (en mm)

**PBS** : Tampon phosphate salin

**pH** : Potentiel hydrogène

**Abs** : Absorbance

**T-** : Témoin négative

**HT** : Hémolyse totale

## RÉSUMÉ

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique et biologique de 3 extraits des feuilles d'une plante médicinale, endémique, algérienne *Abies numidica*. L'étude phytochimique réalisée sur les 3 extraits (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) préparés par macération a permis de mettre en évidence la richesse de cette plante en métabolites secondaires notamment les tannins, les flavonoïdes, les saponosides, les composés réducteurs. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a montré que l'extrait acétate d'éthyle a une teneur plus élevée en polyphénols totaux (490,76 µg EAG/ml), et en flavonoïdes (143,19 µg EQ/ml) en comparaison avec les autres extraits.

Partant de ces données nous sommes intéressés à l'étude biologique et l'évaluation de deux activités biologiques de cette plante. Dans premier temps nous avons étudiés l'activité antifongique d'*Abies numidica* sur la souche *Fusarium oxysporum*, ce test est réalisé par la méthode de contact direct dans un milieu gélosé avec différentes concentrations d'extrait. Les résultats de l'activité antifongique montrent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus actif sur la souche testée avec un indice d'inhibition de 28.57 % dans la concentration de 160 mg/ml. D'autre part nous avons étudié la cytotoxicité de cette plante on a évalué l'activité hémolytique des extraits in vitro vis-à-vis les globules rouges humains. Les résultats montrent que cette plante possède un faible effet toxique sur les érythrocytes humains. L'effet hémolytique maximal est obtenu avec l'extrait acétate (38.1%).

**Mots clés :** *Abies numidica*, métabolites secondaire, activité antifongique, activité hémolytique, *Fusarium oxysporum*, Globules rouges

## ABSTRACT

Our work has been focused on the phytochemical and biological study of 3 extracts of the leaves of a medicinal plant, endemic, *Abies numidica*. A phytochemical study was conducted, based on phytochemical tests and an assay of total polyphenols and flavonoids. The ethyl acetate, n-butanol, and aqueous extract of *Algerian Fir* leaves extracted by maceration, were evaluated for their antifungal power against the pathogen *Fusarium oxysporum* and the hemolytic activity vis-à-vis the red blood cells humans.

The phytochemical screening showed the richness of this plant in secondary metabolites notably tannins, flavonoids, saponosides, reducing compounds. The results indicate that the determination of total polyphenols and flavonoids showed that the ethyl acetate extract had a higher total polyphenols content (490.76  $\mu\text{g}$  EAG / ml), and flavonoids (143.19  $\mu\text{g}$  EQ / ml) in comparison with the other extracts. Evaluation of the antifungal activity of the various extracts showed that the ethyl acetate extract is the most active of the other extracts (n-butanol, aqueous) which gives a 28.57 % inhibition rate in the concentration of 160 mg / ml. ml. The study of the hemolytic effect, performed in vitro, on erythrocytes isolated from human blood, has shown that the ethyl acetate extract which has a haemolytic effect with a maximum rate of 38.1%,

Key words: *Abies numidica*, secondary metabolites, antifungal activity, hemolytic activity, *Fusarium oxysporum*, , red blood cell

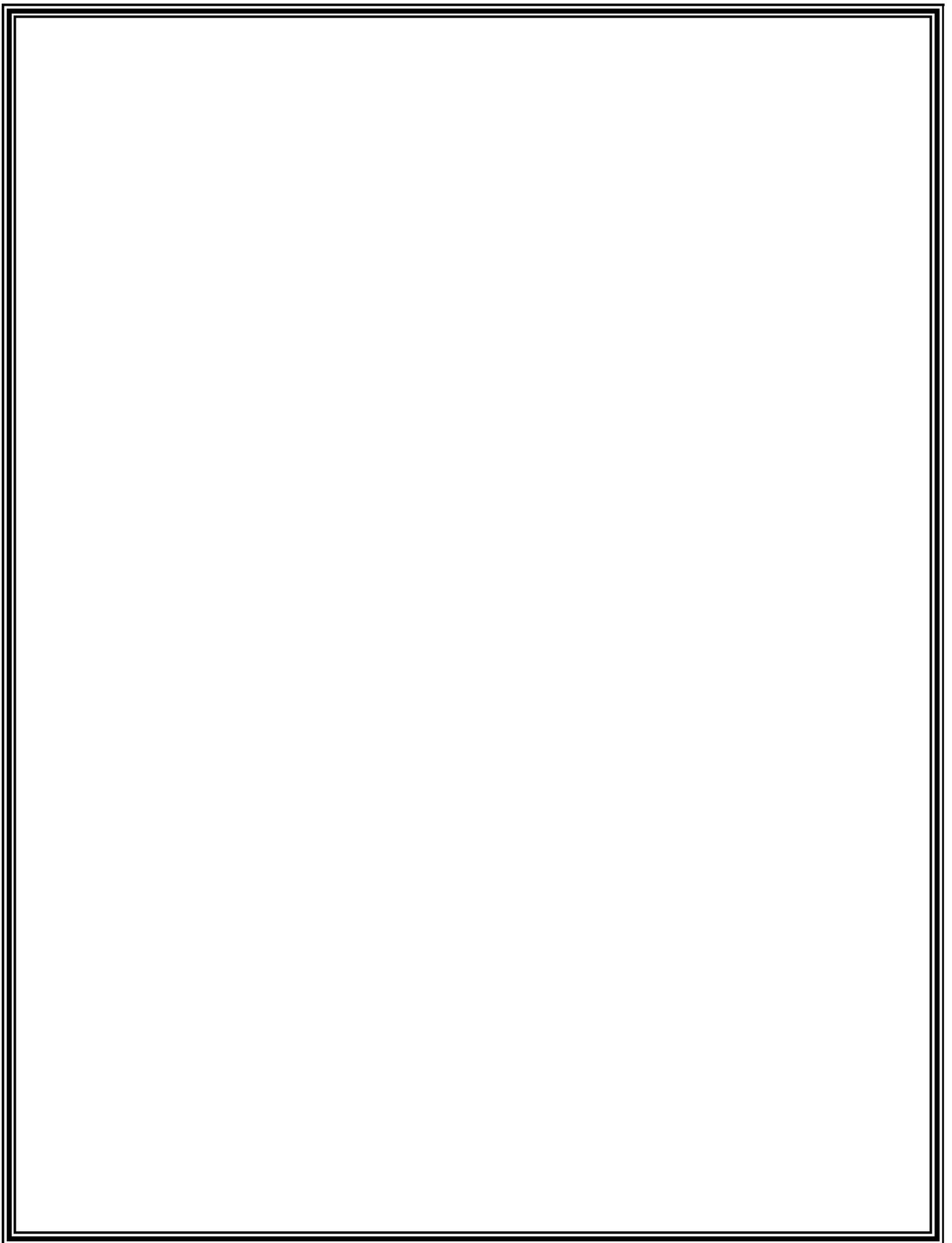
## ملخص

ركز عملنا على الدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية لثلاث مستخلصات من اوراق النبات الطبي التتوب الجزائري. تعتمد الدراسة الكيميائية النباتية على الاختبارات الكيميائية النباتية ومقايسة مجموع البوليفينول الكلي والفلافونويد. اثبتت الدراسة الكيميائية النباتية وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية في اوراق النبات المدروس. تم تقييم المستخلصات الثلاث (خلات الايثيل، المائي والبيوتانولي) لفعاليتها ضد الفطريات الممرضة (فوساريوم اوكسيسبوريوم). ونشاطها الانحلالي ضد كريات الدم البشرية.

النبات المدروس غني بالمستقبلات الثانوية نذكر منها (التنات، الفلافونويدات، الصابونين والمركبات المرجعة). اظهر الفحص الكلي للبوليفينول والفلافونويد ان مستخلص الاسيتات الايثيلي يحتوي على نسبة اعلى من البوليفينول الكلي (490.76 ميكروغرام / مل) والفلافونويدات (143.19 ميكروغرام مكافئ/ مل) مقارنة بالمستخلصات الأخرى. اظهر تقييم النشاط المضاد للفطريات ان مستخلص اسيتات الايثيل هو الأكثر نشاطا من المستخلصات الأخرى. حيث اعطى معدل تثبيطة 28,57 % عند تركيز 160 ملغ/مل

كما أظهرت نتائج النشاط الانحلالي التي أجريت على كريات الدم الحمراء المعزولة من دم الانسان ان مستخلص اسيتات الايثيل هو الأكثر سمية على كريات الدم الحمراء. مع اقصى تأثير للتحلل بنسبة 38.1 %

**الكلمات المفتاحية :** التتوب الجزائري , المستقبلات الثانوية , النشاط المضاد للفطريات , النشاط الانحلالي , كريات الدم الحمراء, فوساريوم اوكسيسبوريوم .



# *Introduction*

Chaque culture a une histoire d'utilisation des plantes médicinales pour guérir les maladies. En Algérie la grande diversité des plantes médicinales et leur usage dispose d'une flore singulièrement riche et variée, mais le recours à la médecine conventionnelle est à l'origine d'un délaissement de ces pratiques ancestrales qui risquent de tomber dans l'oubli [1]. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [2]. De tout temps, les plantes médicinales ont eu une grande influence et occupé une place importante dans la vie quotidienne en Algérie [3].

Cependant à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [4].

L'homme les utilise entre autres comme arômes, colorants, additifs alimentaires et comme matières actives dans de nombreux médicaments. Les plantes produisant ces molécules sont désormais recherchées et cultivées de manière intensive lorsque cela est possible, A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches qui amènent à l'identification des principaux éléments actifs de la plante [5] [6].

Actuellement Peu de recherches se focalisent sur l'études de l'activité antifongique des extraits d'*Abies* sp [7,8,9,10,11]. C'est dans cette perspective que nous avons essayé d'étudier l'action antifongique de quelques extraits d'une plante endémique appartenant à cette famille et qui n'est pas fréquemment employée par la population en Algérie qui s'appelle *Abies numidica*. Nous étudions dans le présent travail l'activité antifongique par l'interaction entre une espèce de *Fusarium* à savoir le *F. oxysporum f. sp. Lycopersici*, et les différents extraits des feuilles de l'*Abies numidica*, dans le but de rechercher d'autre alternatives de lutte contre ces champignons, entre autres par la lutte biologique.

Les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ainsi toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes doses ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. Cette toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition. Ce qui nous à mener d'étudier l'effet hémolytique *in vitro* d'*Abies numidica*, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de cette plante médicinale algérienne vis-à-vis des globules rouges humains. Ces deux activités sont réaliser donc dans le but de la valorisation de cette plante endémique.

Nous avons adopté le plan suivant pour la présentation de notre travail :

- Dans le chapitre 01, nous présenterons les éléments de bibliographie qui nous semblent indispensables à la compréhension du travail que nous avons effectué.
- Nous nous intéresserons en premier lieu à décrire la plante d'*Abies numidica*, nous aborderons ensuite une étude relative aux métabolites secondaires. Nous nous attacherons aussi Dans une troisième partie à décrire le champignon pathogène, et dans une quatrième partie à décrire le phénomène d'hémolyse.
- Dans le chapitre 02 Matériels et méthodes, nous présenterons le matériel et les techniques utilisées pour réaliser les expérimentations.
- Dans le chapitre 03 résultats et discussion, nous mentionnerons les résultats auxquels nous sommes parvenus au cours de notre étude expérimentale, Ce chapitre est suivi d'une conclusion générale portant sur les principaux points pour mieux approfondir le ce travail.



*Synthèse*  
*Bibliographique*

## 1. Historique

Le genre *Abies* existe depuis le tertiaire [12], ce terme a été employé par Miller en 1754 pour désigner ce genre [13]. Il fait partie de la famille des *pinaceae*, Il est néanmoins important de noter que Le genre *Abies* est considéré comme le plus complexe des autres genres de cette famille [14].

Les botanistes connaissent bien depuis le siècle dernier les diverses espèces de sapins végétant sur le pourtour de la Méditerranée [15] dont : *Abies alba*, *A. nordmanniana*, *A. pinsapo*, *A. borisii-regis*, *A. nebrodensis*, *A. marocana*, *A. equi-trejani*, *A. cilicica*, *A. tazaotana*, *A. cephalonica*, *A. bommuelleriana* et *A. numidica* [16,17].

L'espèce *Abies numidica* a été découverte en 1861 sur les montagnes des Babors par le capitaine Deguilbert. Letourneux et Cosson considèrent ce sapin comme une variété des sapins espagnols, il a de ce fait été appelé *Abies pinsapo baborensis*. Le botaniste De Lannoy décrit pour la première fois ce sapin en 1861 d'où l'appellation *A. numidica* De Lannoy, mais la publication valide était par Élie Abel Carrière en 1866 [18].

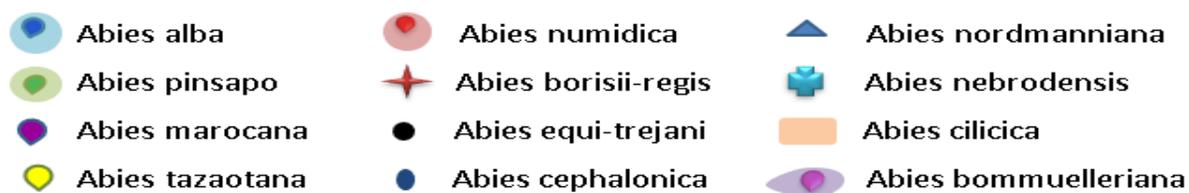
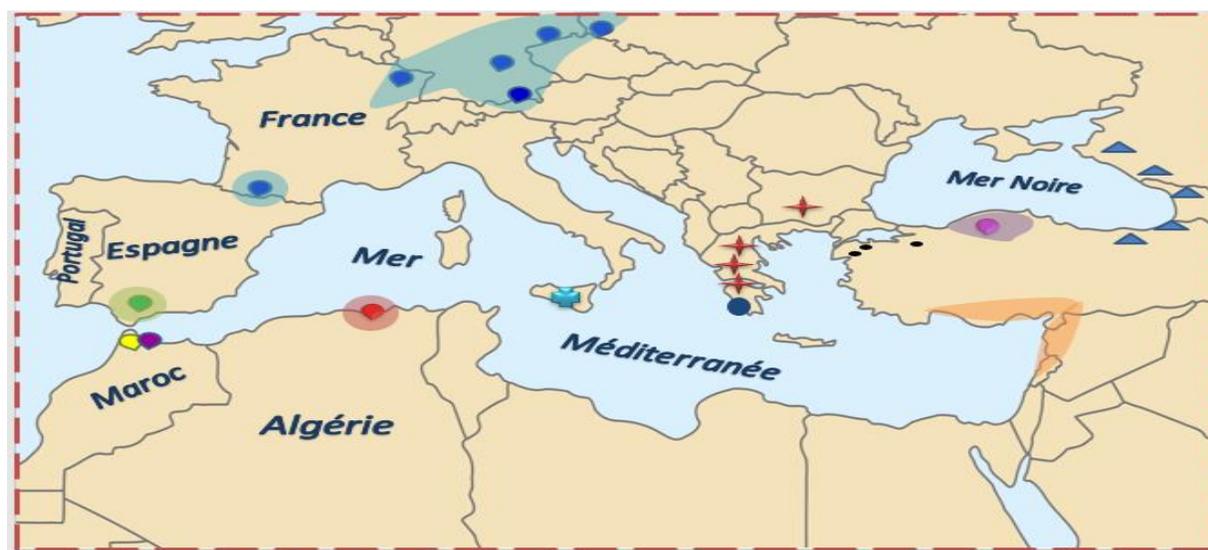
## 2. Distribution géographique

### 2.1. Répartition Dans le monde et la région méditerranéenne

Géographiquement les Sapins sont répartis dans 04 régions : Sibérie et Est de l'Asie, Amérique du Nord, Mexique, Guatemala et Région méditerranéenne [13].

La région méditerranéenne possède une diversité biologique exceptionnelle, sa richesse floristique estimée à 25000 espèces, ce qui correspond à 9.2 % de la flore mondiale, sur un territoire représentant seulement 1.5% de la surface terrestre. La moitié de ces espèces sont endémiques du pourtour et qui sont bien adaptées aux périodes sèches [19] (Fig.1).

Les Sapins méditerranéens à l'aire disjointe sont rencontrés en Afrique du Nord (*A. numidica*, *A. marocana*), en Espagne (*A. pinsapo*), dans les Balkans (*A. cephalonica*), en Asie mineur (*A. nordmanniana*, *A. bommuelleriana*, *A. cilicica*) [13] (Fig. 1).



**Figure 1.** Distribution géographique des espèces *Abies* dans la région méditerranéenne [16,17].

## 2.2. Répartition en Algérie

L'*Abies numidica* de Lannoy est une essence forestière algérienne, endémique des monts Babors où il couvre une superficie de 300 ha [20]. Au Tababors, on ne compte que quelques pieds déformés par la neige et le vent [17].

En Algérie *Abies numidica* a été introduite en dehors de son aire naturelle dans des zones telliennes, notamment dans les forêts de l'Est. Dans l'arboretum de Djbel Ouahch dans l'aire du Chêne liège, l'accroissement moyen annuel d'*Abies numidica* est de 5.28 m<sup>3</sup>/ha/an [21]. Dans la forêt de Serraidi à Annaba, cette espèce fructifie avec une régénération naturelle qui semble s'installer progressivement.

### 3. Description botanique

L'*Abies numidica* supporte les régions montagneuses mais aussi elle supporte mieux les conditions des villes que la plupart des autres sapins et s'adapte à tous les types de sol [22]. C'est un arbre de grande taille pouvant atteindre 25m de hauteur (**figure 2**) à feuillage persistant et touffu, les caractéristiques morphologiques d'*Abies numidica* sont résumées dans le **tableau 1**.

**Tableau 01** : Caractéristiques morphologiques d'*Abies numidica* [22,23,24]

	<b>Caractéristiques</b>
<b>Taille</b>	Pouvant atteindre 25m de hauteur
<b>Écorce</b>	Grise et lisse dans le jeune âge puis rhytidome brunâtre et divisée en écailles irrégulières.
<b>Rameau</b>	Rameau vert olive ou brun
<b>Bourgeons</b>	Bourgeons ovoïdes pointus d'un brun rouge résineux à la base
<b>Aiguilles</b>	Aiguilles des rameaux stériles droites de 15 à 25mm de longueur et épaisses. Aiguilles des rameaux fertiles disposées en brosse, relevées et épaisses
<b>Feuille</b>	Feuillage persistant et touffu
<b>Fruits</b>	Les cônes femelles de 12 à 18 cm avec un diamètre entre 3-5cm, cylindrique, gris brun à maturité, résineux a bractées incluses, se dressent verticalement sur les rameaux. Les cônes mâles teinté de rouge, jaune en s'ouvrant
<b>Fleurs</b>	Les fleurs mâles ont leurs boutons floraux de couleur rouge et deviennent jaune quand elles s'épanouissent.  Les fleurs femelles sont vertes et donnent naissance à des cônes de 15cm de long par 3 à 4 cm de diamètre, cylindriques, de couleur brun gris à maturité. Ils contiennent des graines ailées de 2 à 3 cm de long (graine plus aile).
<b>Face inférieur</b>	Deux bandes de stomates glauques argentées séparées par une nervure médiane saillante, canaux résinifères sous hypodermiques.
<b>Face supérieur</b>	Un sillon médian portant quelques lignes de stomates au sommet seulement
<b>Floraison</b>	Mois d'avril

*a. Abies numidica**b. Rameau d'Abies numidica**c. cones d'Abies numidica***Figure 02.** Description botanique d'*Abies numidica*

#### 4. Nomenclature

*Abies numidica* : vient du grec *Abies* qu'est l'arbre du sapin et *numidica* est l'ancien nom de l'Algérie.

- ❖ Nom latin : *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière, *A. baborensis*, *A. pinsapo* Boiss. var. *baborensis* Coss.
- ❖ Nom français : Le sapin de Numidie, sapin d'Algérie, sapin de Kabylie, *sapin des Babors*.
- ❖ Nom anglais: The fir of Numidia, the fir of Algeria [21].

## 5. Systématique

La classification classique d'*Abies numidica* selon [25] est représentée dans le **tableau 02**.

**Tableau 02** : Classification de la plante *Abies numidica*

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Coniferophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Abies</i>
Espèce	<i>Abies numidica</i>

## 6. Usage traditionnel et thérapeutique

En plus de sa valeur écologique indéniable, ces espèces présentent un intérêt majeur dans divers secteurs médicaux. Elles sont en effet employées pour leurs propriétés antibactériennes [26], anti-tumeur [27], anti-inflammatoire, anti-hypertension, anti-ulcérogène [28], antifongique [29] antitussive [30], et les activités de système nerveux central [31], en outre elles sont très efficaces pour la voie respiratoire, elles décongestionnent et calment l'inflammation [23].

Ainsi, dans la médecine traditionnelle, la gomme de sapin constitue un des remèdes essentiels utilisés comme antiscorbutique, comme antiseptique dans les blessures et en cataplasme sur les brûlures [23]. D'après [32] les cônes d'*Abies numidica* de Lannoy sont utilisés pour traiter certaines maladies (l'indigestion, ulcère, pulmonaire, vasculaire et les maladies vénérienne).

Des études récentes sur l'huile essentielle des aiguilles du sapin de Numidie montrent que cette dernière possède aussi un effet antibactérien sur certaines souches bactériennes pathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp.* Et *Staphylococcus aureus*) [23].

Autre étude réalisée sur les cônes d'*Abies numidica* a montré que cette plante peut être utilisée comme source potentiel de nouveaux agents antimicrobiens contre les bactéries qui deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques traditionnels [33].

Cependant, l'étude réalisée par [34] a montré que l'extrait méthanolique et les huiles essentielles d'*Abies numidica* possèdent des molécules bioactives responsables à l'activité antioxydants et antimicrobiens évaluer.

## Partie 02 : les métabolites secondaires

### 1. Les composés phénoliques

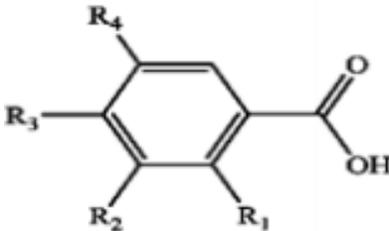
Les polyphénols forment un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans le règne végétal avec ce qui avoisine les 8000 structures phénoliques connues. La teneur d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [35].

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et sont présents dans toutes les parties de la plante [36].

#### 1.1. Les acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxyle et un hydroxyle phénolique [37]. Les acides phénoliques sont présents en abondances dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (**figure 03**) et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique [38].

Les acides phénoliques présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, anti radicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants [39].

	Composés	R1	R2	R3	R4
	Ac. Benzoïque	H	H	H	H
	Ac. Salicylique	OH	H	H	H
	Ac. P-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H
	Ac. Gallique	H	OH	OH	OH
	Ac. protocatéchuique	H	OH	OH	H

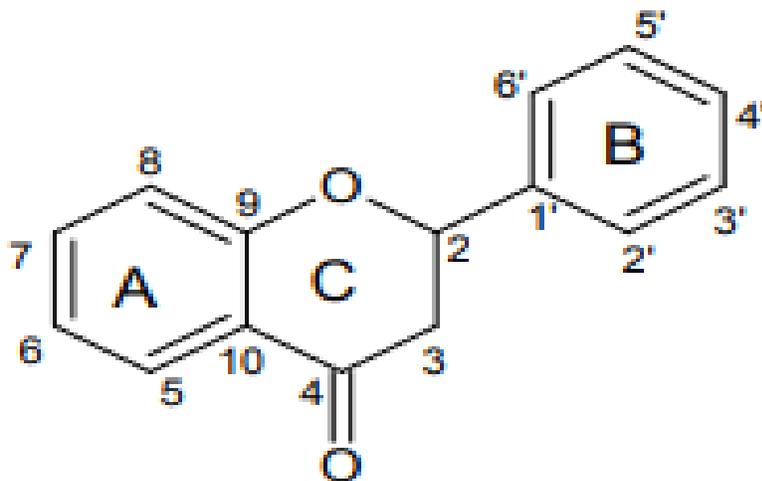
**Figure 03.** Formule générale des dérivés de l'acide benzoïque [40]

## 1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les principaux métabolites secondaires végétaux [41]. Ils constituent un grand groupe de composés phénoliques ayant une structure benzo- $\gamma$ pyrone et sont omniprésents dans les plantes, ils sont formés à partir des acides aminés aromatiques phénylalanine, tyrosine et du malonate. La structure de base de flavonoïde est le noyau flavane, qui se compose de 15 atomes de carbone disposés en trois cycles (C6-C3-C6) qui sont nommés cycle A, cycle B et cycle C [42] (Figure 04).

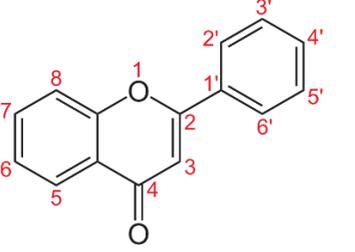
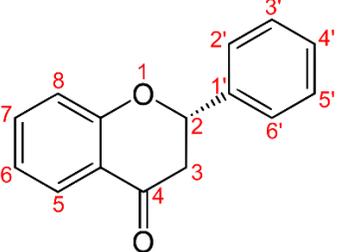
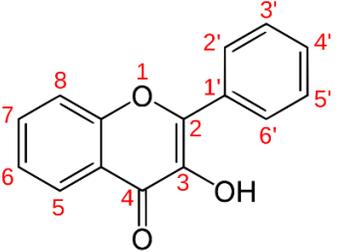
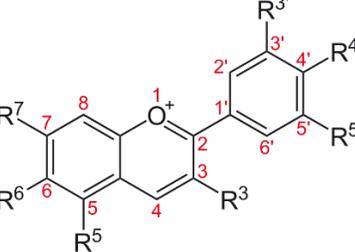
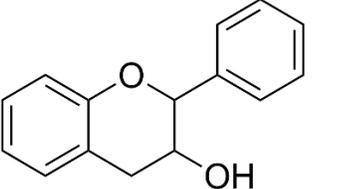
Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiés, dont beaucoup sont responsables des couleurs attrayantes de fleurs, de fruits, et des feuilles ainsi que d'autres parties végétales [43,44], ils ont également un rôle très important pour la santé humaine. A titre d'exemple, ils sont efficaces pour l'inflammation chronique, les maladies allergiques, les maladies coronariennes et le cancer [45,46].

Le **tableau 03** représente les principales familles de flavonoïdes.



**Figure 04.** Structure de base des flavonoïdes [42]

Tableau 03 : Les principales familles de flavonoïdes [43,47,48].

Famille	Exemple	Structure	Source de nourritures
Flavones	Apigénine, Lutéoline		Les oignons, les pommes, le brocoli, les baies et persil
Flavanones	Naringénine, Butine		Les agrumes
Flavonols	Kaempférol, Isorhamnetine, Quercétine, Myricétine		Le thé vert et noir, le vin rouge, oignons et tomate
Anthocyanidines	Cyanidine, delphicianidine, pelargonidine, péonidine, petunidine		Les fraises, les baies, les raisins, le vin et le thé
Flavone-3-ol= Flavanol	Catéchine, gallocatechine, Epicatechine, Gallate		Chocolat, abricot

### 1.3. Les tanins

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale, appartiennent aux polyphénols [49], solubles dans l'eau [50], selon [51], leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Da. Ils ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir [39]. Cette propriété de tannage (comme son nom l'indique) provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

Cette classe des molécules possède certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des autres protéines [52,53]. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [54]. Les tannins présentent aussi des propriétés antiseptiques, antibiotiques, astringentes, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, hémostatiques et vasoconstrictrices [55].

D'après [56] les tannins jouent également un rôle dans la protection des plantes contre la lumière UV et les radicaux libres, la défense contre les agents pathogènes (animaux, insectes, champignons et bactéries). En plus ils sont connus comme des agents protecteurs de quelques plantes contre la sécheresse due aux différents mécanismes moléculaires [57]. Sur le plan structurel les tanins sont divisés en 2 catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [58,59,60].

#### 1.3.1. Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou ses dérivés en particulier l'acide ellagique (Figure 05) [51,61]. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) [62].

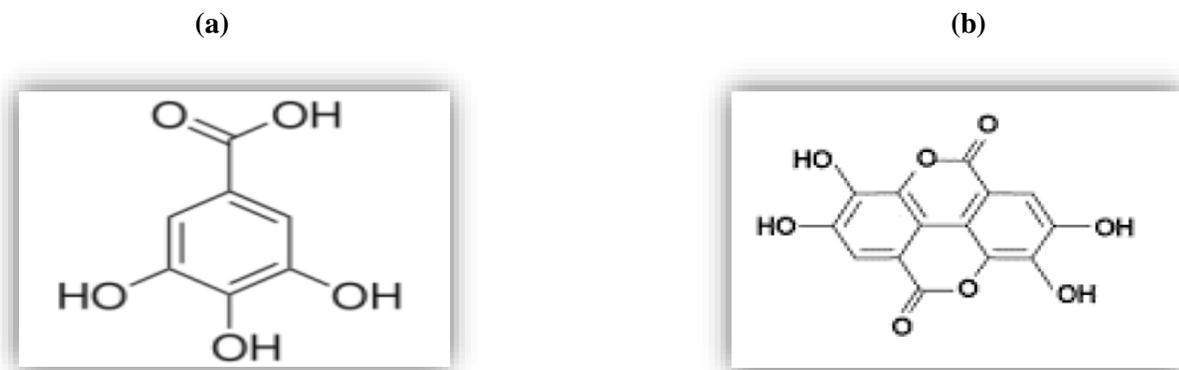


Figure 05. Structure de l'acide gallique (a) et structure de l'acide ellagique (b) [62]

### 1.3.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés, polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines [63]. Les tanins condensés sont caractérisés par l'absence de sucre [64] (Figure 06).

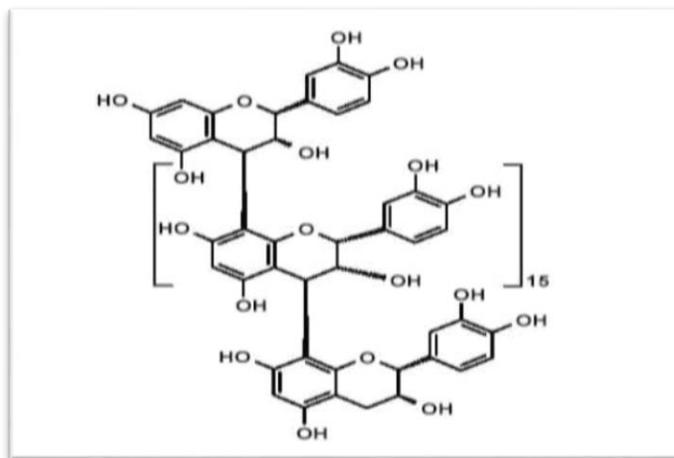


Figure 06. Structure des tanins condensés [65].

### 1.4. Lignines

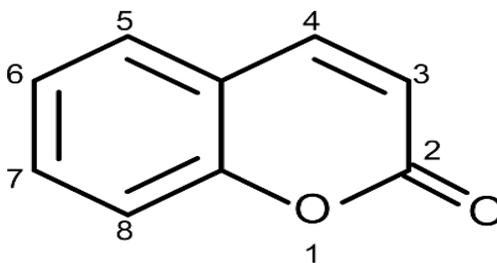
Les lignines sont les composants majeurs de la paroi cellulaire [41]. Ils forment une structure hétérogène et agissent à la fois sur le maintien de l'intégrité structurale de celle-ci. Ainsi qu'un échafaudage pour les polysaccharides.

Les polysaccharides augmentent le caractère hydrophobe de la structure de la lignine, ce qui facilite le transport de l'eau dans les tissus, en empêchant l'absorption d'eau [66].

La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations [67].

### 1.5. Les coumarines

Les coumarines sont des substances phénoliques des végétaux, dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale [68], portant un noyau benzopyrone dans leur structure [69]. Ils sont substitués par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle [70] (**Figure 07**).



**Figure 07.** Structure de base des coumarines [70].

Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée [71]. Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Cependant, les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique [72,73,74,75,76,77,78].

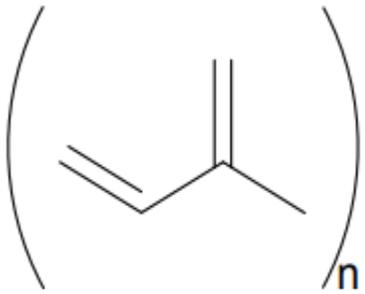
### 1.6. Terpenoides

Les terpenoides et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Ils sont issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène). Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes [79] (**Tableau 04**).

Les terpénoïdes sont des composés aromatiques de faibles poids moléculaires, volatiles [39,80]. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux (Limonène de citron) [81]. Synthétisés à partir de l'acétyl CoA ou le malonyl CoA. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques pour les végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent chez les animaux.

Dans la nature, les terpènes peuvent présenter diverses fonctions chimiques : alcools, oxydes, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, et esters. Ils constituent le plus important groupe des produits naturels, comprenant environ 30000 composés [82]. Cependant, un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques [83].

**Tableau 04 :**Quelques exemples des différents types de terpenoïdes [84].

<p>Isoprène = terpène</p> 	N	Classe		Exemple
	1	C5	Hemiterpène	Isoprène
	2	C10	Monoterpène	Nérol, myrcène
	3	C15	Sesquiterpène	La chaîne de la chlorophylle, vitamine E
	4	C20	Diterpène	Huiles essentielles
	6	C30	Triterpène	Phytostérols
	8	C40	Tétraterpène	Caroténoïdes
	>8	>40	Polyterpène	Protéines, cytoquinine

### **1.7. Saponosides**

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes [37]. Ils constituent un vaste groupe de glycosides, largement distribués chez les plantes supérieures [85]. Ils ont un large éventail de propriétés, qui incluent leur goût doux et amer [86,87,88].

Des travaux réalisés sur les saponines, montrent que cette classe de molécules possède certaines activités biologiques, on peut citer entre autres des activités molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice [89,90,91]. Ainsi qu'activités hémolytiques [92,93,94,95]. Ils forment des complexes avec des creux formant le cholestérol de la membrane des érythrocytes et des trous, ce qui conduit à une augmentation de la perméabilité et l'hémolyse [96,91].

En plus de sa valeur biologique importante cette catégorie possède des propriétés pharmacologiques telles que les effets analgésiques et antidépresseurs [97]. Elles agissent comme une barrière chimique dans la plante et forment le système de défense contre les agents pathogènes et les herbivores [98].

### 1.8. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des Produits azotés. Basiques, d'origine naturelle dont l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et dont l'activité pharmacologique est significative [79]. En général, ils portent le nom du végétal qui les contient [99]. Ils sont issus du seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont bio-synthétiquement formés à partir d'un acide aminé [39].

La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques et on les trouve dans plusieurs familles des plantes [100]. Tous les alcaloïdes ont une action physiologique intense, médicamenteuse ou toxique. Très actifs, les alcaloïdes ont donné naissance à de nombreux médicaments [55]. Certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques, dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens ou agents anticancéreux [101].

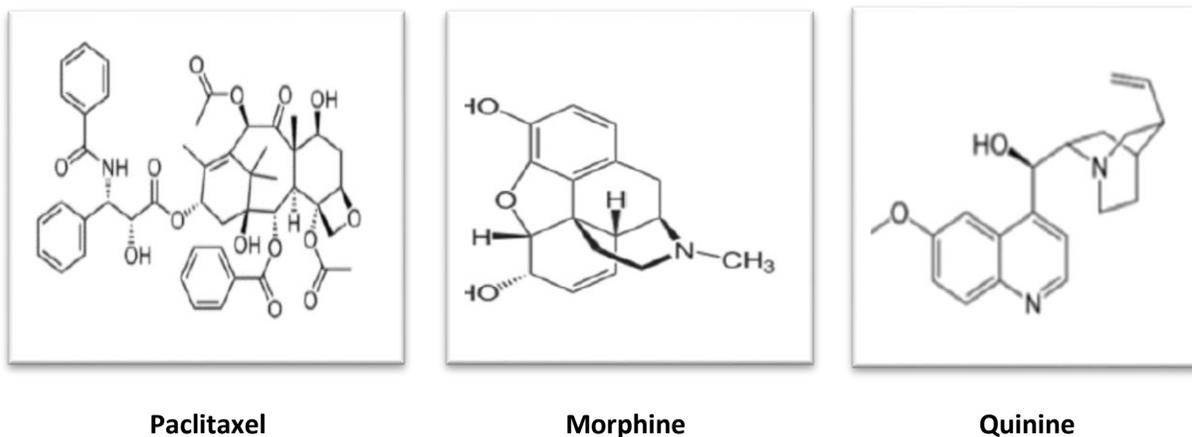


Figure 08. Exemple de structures alcaloïdiques [102].

## 2. Activités biologiques des composés phénoliques

Les principales activités biologiques des composés phénoliques sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 05** : Les activités biologiques des composés phénoliques [103].

Polyphénols	Activités	Exemple de plantes
Acides phénols (Cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes	<i>Paronychia argentea</i> [104]
	Antifongiques	<i>Daphne gnidium</i> [105]
	Antioxydants	<i>Tamarix pauciovulata</i> [106]
Coumarines	Protectrices vasculaires antioedémateuses	<i>Calendula officinalis</i> [107]
Flavonoïdes	Anti inflammatoires Anti tumorales	<i>Haloxylon scoparium</i> [108]
	Anti oxydantes	<i>Thymelaea hirsute</i> [109]
	Hypotenseurs et diurétiques	<i>Malva parviflora</i> [110]
Anthocyanes	Protectrices capillaroveineux	<i>Inula crithmoides</i> [111]
Tannins galliques et catéchiques	Anti oxydantes	<i>Paronychia chlorothyrsa</i> [112] <i>Capparis Spinosa</i> [113]

## Partie 03: le champignon pathogène

### 1. Les champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes sont des espèces de champignons parasites qui provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes. Ces champignons appartiennent au règne des eumycocètes, regroupant un large éventail de groupe des organismes pluricellulaires qui sont les moisissures [114].

Les champignons restent de potentiels producteurs de mycotoxines [115] et elles sont moins sensibles que les bactéries aux conditions du milieu et résistent bien aux conditions acides du sol [116].

Plusieurs moisissures, notamment les genres *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* et *Fusarium* sont connus pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques [117].

### 2. Le *Fusarium*

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées [118]. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Ils sont responsables des fontes de semis et contaminent les sols [119].

#### 2.1. *Fusarium oxysporum*

Le *fusarium oxysporum* est une espèce ubiquiste retrouvée dans tous les types de sols [120], ce champignon filamenteux décrit par Snyder et Hansen en 1940, appartient à la famille des tuberculiacées (classe des Hyphomycètes).

Ce champignon infecte le système racinaire d'un hôte susceptible (**Tableau 06**) et colonise finalement le système xylème où il bloque la translocation de l'eau et nutriments, entraînant une chlorose, une nécrose, un retard de croissance et un flétrissement [121,122].

**Tableau 06** : Les formes spéciales importantes de *Fusarium oxysporum* [123].

<b>Champignon</b>	<b>Hôte</b>
<i>F.oxysporum f.sp.batae</i>	Batterave
<i>F.oxysporum f.sp.cucumerinum</i>	Concombre
<i>F.oxysporum f.sp.fabae</i>	Fève
<i>F.oxysporum f.sp.phaseoli</i>	Haricot
<i>F.oxysporum f.sp.lentis</i>	Lentille
<i>F.oxysporum f.sp.melonis</i>	Melon
<i>F.oxysporum f.sp.albedinis</i>	Palmier dattier
<i>F.oxysporum f.sp.niveum</i>	Pastèque
<i>F.oxysporum f.sp.patatas</i>	Patate douce
<i>F.oxysporum f.sp.pisi</i>	Pois
<i>F.oxysporum f.sp.lycopersici</i>	Tomate

### 2.1.1. Classification

Le système Saccardo de classification des champignons imparfaits « fungi imperfecti ». [124] classe *Fusarium* comme suit :

**Embranchement** : Thallophytes

**Classe** : Deutéromycètes

**Ordre** : Monodiales

**Famille** : Tuberculariacées

**Genre** : *Fusarium*

**Especie** : *Fusarium Oxysporum*

### 2.1.2. Morphologie

Les *F. oxysporum* comportent un ensemble de formes morphologiquement identiques, mais présentant des spécificités parasitaires parfois très étroites. Ainsi, plus de 120 formes spécialisées et races ont été décrites chez *F. oxysporum* [125].

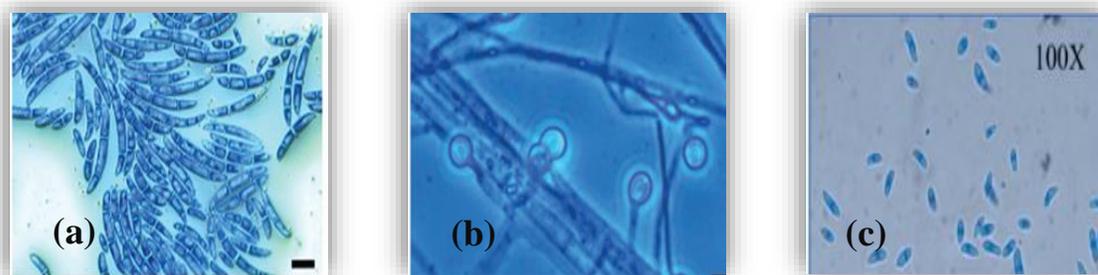
Au niveau macroscopique, l'aspect des souches de *F. oxysporum* peut fréquemment varier d'une culture à l'autre après des repiquages successifs, voire dans une même culture ou des sections de couleurs ou d'aspects différents peuvent apparaître, cependant l'aspect cultural de *F. oxysporum* sur milieu PDA correspond à un mycélium aérien de croissance rapide, et de couleur variable allant du blanc au rose ou violet [126,127].

Des observations microscopiques (**figure 09**) ont montré les caractéristiques suivantes :

Le *F. oxysporum* est caractérisé par la présence abondante de microconidies [128], ovale ou réniforme produite en fausse tête sur des conidiophores monophialides courtes [129].

Les macroconidies sont légèrement arquées [130], comportent quatre à six cellules [129], la cellule apicale en crochet, produite par des phialides sur des conidiophores ramifiés ou en sporodochie (27-46 x 3-4.5  $\mu\text{m}$ ) [130].

Les chlamydospores sont présentées solitaires, ou en paires, lisses ou rugueuses, globuleuses, terminales ou intercalaires de 5 à 15  $\mu\text{m}$  [129], elles sont connues pour être des structures de résistances entourées d'une paroi épaisse parfois ornementée. Elles résultent de condensation du contenu des hyphes ou des macroconidies [131].



**Figure 09.** Aspect microscopique du *F.oxysporum* :(a) macroconidies (b) chlamydospores, (c)microconidies [132].

#### 2.1.4. Cycle de vie

Le cycle de vie de *fusarium oxysporum* (**figure 10**) commence par une phase saprophyte suite à sa survie sous forme de chlamydospore dans le sol [133], en état de dormance [134] et cela peut durer plusieurs années jusqu'à ce que la germination est stimulée lorsque les conditions sont favorables [135], cependant les *F.oxysporum* ne sont pas des parasites obligatoire en absence de la plante hôte [136]. En contact de L'hôte, les chlamydospores germent et les jeunes filaments pénètrent au niveau des racines.

Toute foie, après la pénétration dans la cellule épidermique, le mycélium se ramifie, colonisent ainsi toutes les cellules avoisinantes [137], l'introduction de ce champignon provoque la production de toxines [138]. En effet, deux toxines ont été identifiées, la lycomarasmine et l'acide fusarique [139].

Ensuite la production de toxines entraîne un grand développement du champignon qui se produit dans les vaisseaux conducteurs de la sève, où le champignon arrive à boucher les vaisseaux du xylème [138]. Le développement du champignon (mycélium et conidies) obstrue ces vaisseaux [140,141], ce qui induit par conséquent à la production des macroconidies par les organes fructifères appelés sporodochies qui se forment à la surface des feuilles, en plus les macroconidies vont contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes [137].

L'infection de la plante s'accompagne d'une réduction de la chlorophylle et parallèlement d'une augmentation des acides organiques, des polyphénols et des hydrates de carbone [142,143,144], les feuilles des plantes affectées montrent une flaccidité suivie d'une coloration vert-terne et d'un dessèchement conduisant à la mort précoce de la plante.

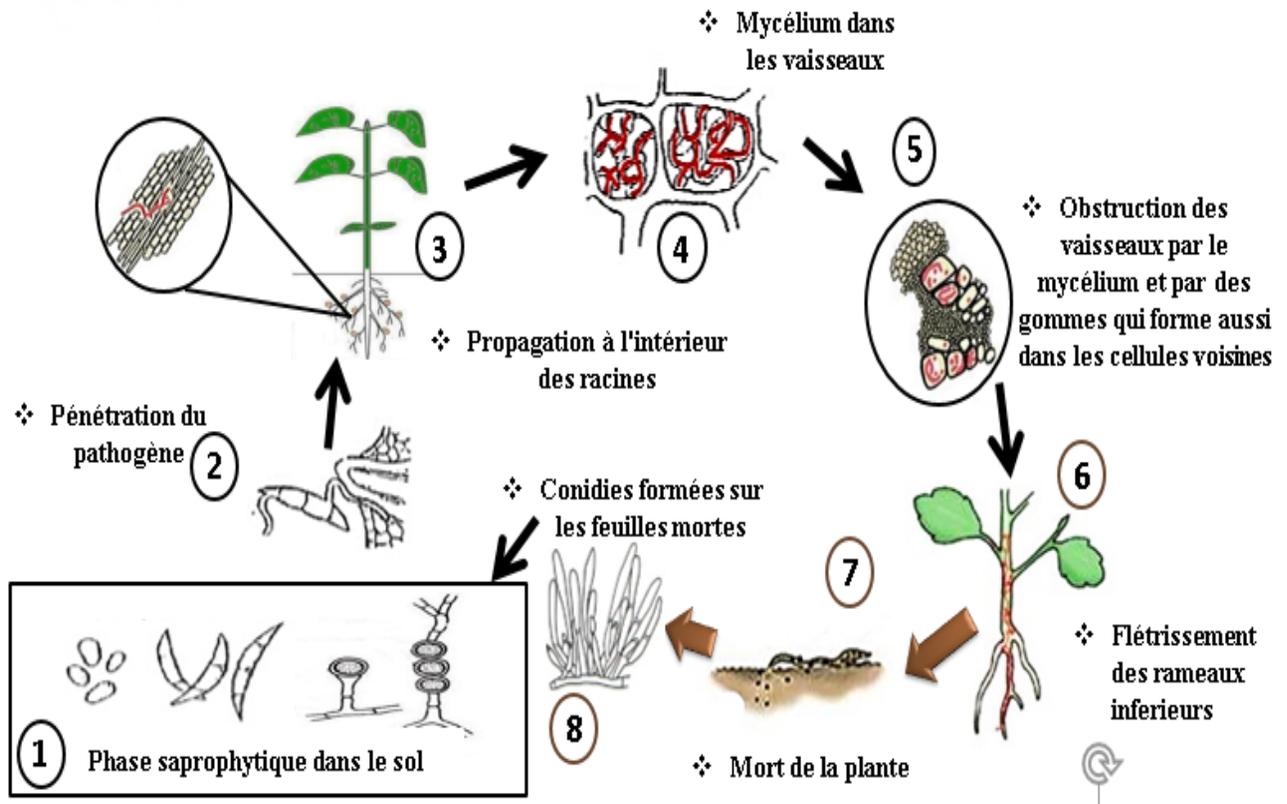


Figure 10. Cycle de vie de l'agent pathogène de *Fusarium oxysporum*

## Partie 04 : L'hémolyse

### 1. Les globules rouges

Les globules rouges sont les cellules les plus abondantes dans la circulation sanguine. Leur production quotidienne est de  $200 \cdot 10^9$  Cellules par jour [145]. Les globules rouges (RBC), Hématies ou Erythrocytes sont des cellules matures possèdent la forme d'une lentille biconcave avec un diamètre variant de 6.8 à 7.5  $\mu\text{m}$ . La durée de vie moyenne des hématies est de 120 jours [146]. La forme particulière du globule rouge lui permet d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui favorise les échanges d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) des poumons vers les tissus, et d'évacuer le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en sens inverse [147].

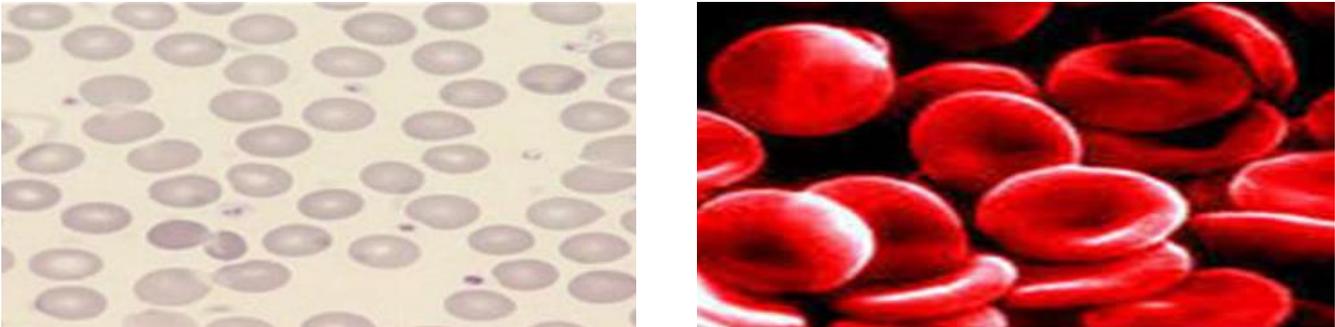
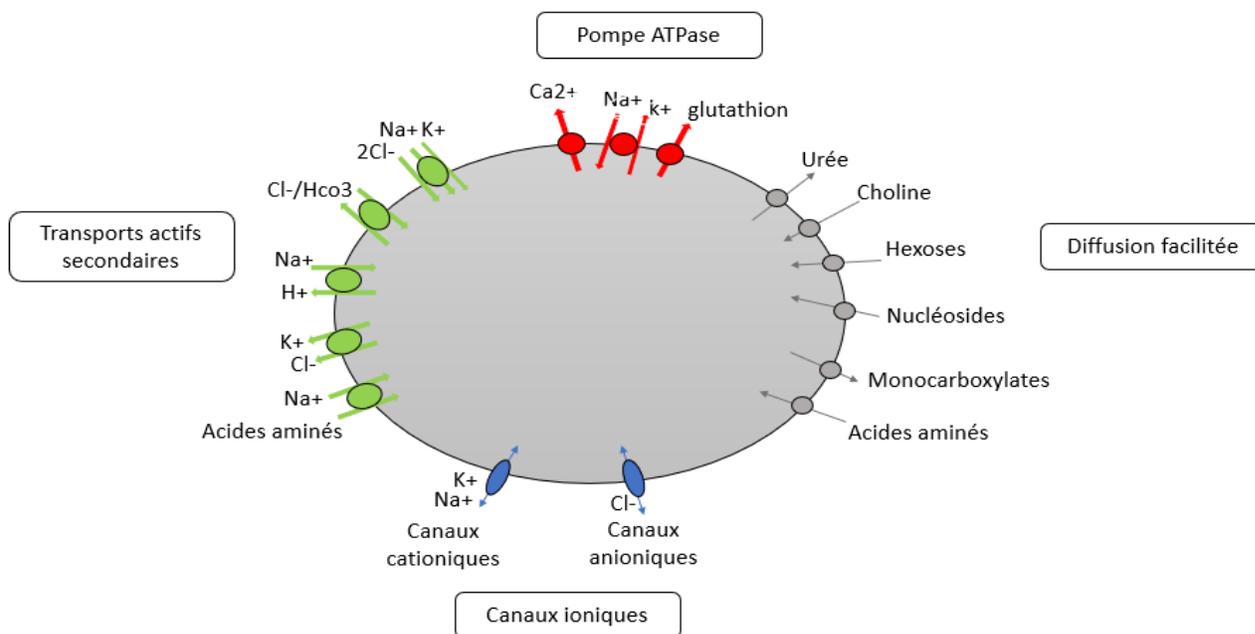


Figure 11. Globules rouges [148]

### 2. La membrane érythrocytaire

La membrane plasmique des globules rouges est composée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère un nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous membranaire [149]. Principalement (en poids) on trouve 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides. Les lipides membranaires comportent : les phospholipides (63%), les cholestérols non estérifiés (25%) et les glycosphingolipides [150].

Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du globule des déterminants des groupes sanguins [150]. Elle contient aussi des protéines membranaires qui jouent des rôles importants dans les échanges avec le milieu extérieur tel que les pompes d'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , les protéines de transport des anions, de l'eau et du glucose [151]. Ces protéines ayant aussi un rôle dans la stabilité et l'ancrage des hématies avec le cytosquelette cellulaire [152] (Figure 12).



**Figure 12.** Structure de La membrane érythrocytaire [153]

### 3. L'hémolyse

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leurs composants intracellulaires notamment l'hémoglobine (Hb) après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal [147,154]. Cependant, dans certains cas l'hémolyse est exagérée et réduisant ainsi la durée de vie des hématies, on parle alors d'une hyper hémolyse [155]. Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse [147].

Généralement, l'hémolyse provoque une augmentation du taux d'hémoglobine, de la lactate déshydrogénase (LDH) et une diminution du taux d'haptoglobine et de l'hémoglobine glycosylé [156]. Elle est la cause de pathologies spécifiques telles que les maladies vasculaires aiguës et

chroniques, l'inflammation, la thrombose et l'insuffisance rénale [157]. Cependant L'hémolyse physiologique doit être différenciée de l'hémolyse pathologique ou l'hyper hémolyse [158].

### **3.1. L'hémolyse physiologique**

#### **3.1.1. Hémolyse intravasculaire**

L'hémolyse intravasculaire n'intervient que pour une faible partie de l'hémolyse physiologique (5 à 10%). Elle se passe à l'intérieur des vaisseaux et libère de l'hémoglobine directement dans le plasma. [159]. Où elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisée par le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée [147].

#### **3.1.2. L'hémolyse intratissulaire**

Dans l'hémolyse intratissulaire les globules rouges âgés, après une durée de vie normale de 120 jours, sont phagocytés par les macrophages de système phagocytaire, ce processus est induit par la fixation de l'anticorps sur l'hématie sans activation (ou activation limitée) du complément. Les immunoglobulines G fixée sur les antigènes des groupes sanguins présents sur la membrane des hématies interagissent avec les récepteurs de leur fragment présent sur les cellules du système des phagocytes, entraînant ainsi la phagocytose des hématies et leur lyse [160].

### **3.2. Hémolyse pathologique**

C'est la destruction précoce et exagérée des GR circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (Hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire). Ce processus peut être congénital ou acquis, il affecte toujours un des constituants vitaux du GR : membrane, enzyme, Hémoglobine (Hb) [161]. L'hémolyse anormale du sang peut avoir différentes causes. Il peut s'agir d'une pathologie qui aboutit à la destruction des globules rouges dans les vaisseaux sanguins, cas de certaines anémies, des accidents transfusionnels, du paludisme, etc... Des parasites sanguins, des infections bactériennes et virales, des agents chimiques, des plantes toxiques peuvent entraîner aussi une hémolyse pathologique [162].

*Matériel*

*Et*

*Méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Université Frères Mentouri Constantine 1 et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

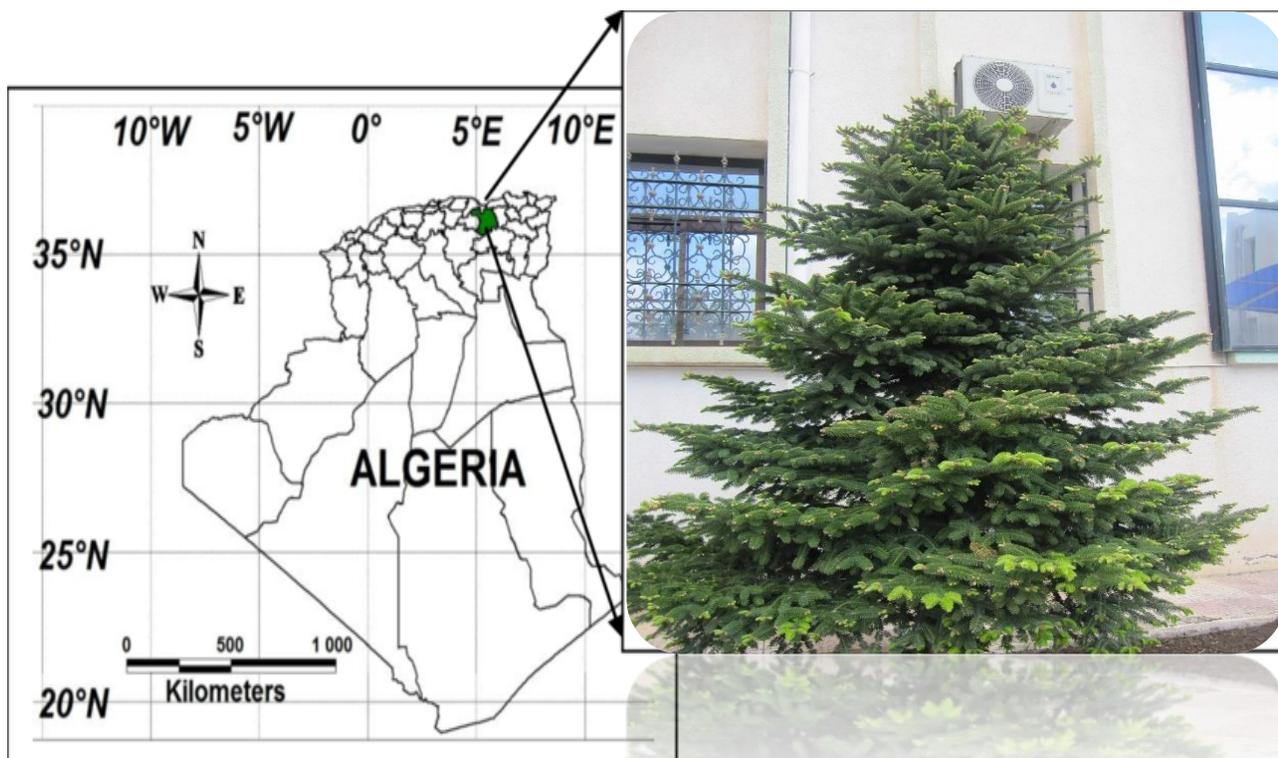
## 1. Préparation du matériel végétal

### 1.1. Echantillonnage

Les feuilles d'*Abies numidica* (**Figure 14**) ont été récoltées au mois de Mars 2019 de la région de Sétif et l'identification a été faite par le chef de la conservation des forêts la wilaya de Sétif.

Les aiguilles d'*Abies numidica* ont été séchées à l'air libre dans un endroit sec pendant 15 jours (**Figure 15**). Le matériel végétal a été ensuite broyé à l'aide d'un broyeur mécanique de type « Moulinex » (**Annexe 08**).

Après broyage la poudre obtenue (**Figure 16**) a été soumise à une extraction afin de récupérer les différentes classes de composés chimiques contenus dans les feuilles de la plante pour des tests phytochimiques et biologiques.



**Figure 13.** L'arbre d'*Abies numidica* dans la région de Sétif (photo originale).



**Figure 14.** Feuilles d'*Abies numidica* fraîches (photo originale).



**Figure 15.** Feuilles d'*Abies numidica* sèches (photo originale).



**Figure 16.** Feuilles d'*Abies numidica* après broyage (photo originale).

## 1.2. Extraction et fractionnement des métabolites secondaires.

### 1.2.1. Extraction par macération

La poudre végétale a été soumise à une extraction solide/ liquide par macération. 50 grammes de la poudre ont été macérée dans 400ml de méthanol 80% à température ambiante et sous agitation continue pendant 24 heure. Ensuite le macérât a été filtré à l'aide d'un coton, puis le solvant d'extraction (méthanol) a été évaporé à sec sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Buchi R-215 (**Annexe 07**). Cette étape a été répétée plusieurs fois dans les mêmes conditions (**Figure 17**).

### 1.2.2. Extraction par macération à l'eau (phase aqueuse)

L'extrait brut (MEOH) obtenu a été introduit dans un erlenmeyer et macéré dans 500 ml d'eau distillée pendant 24h à température ambiante. Après la solution est soumise à une agitation mécanique jusqu'à ce qu'elle devienne homogène (**Annexe 17**), puis elle est filtrée sur papier filtre, le filtrat est soumis à un fractionnement par des solvants organiques de différentes polarités [**163**].

### 1.2.3. Fractionnement de la phase aqueuse

Le fractionnement de la phase aqueuse a été effectué en utilisant trois solvants à polarité croissante (Dichlorométhane, l'Acétate d'éthyle, le n-butanol). Premièrement la phase aqueuse a été mélangée avec le Dichlorométhane (3V/V). Après séparation, la phase organique a été récupérée et la phase aqueuse est traitée avec l'Acétate d'éthyle (3V/V). L'acétate d'éthyle est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'Acétate d'éthyle (EAc). La phase aqueuse est soumise à un autre fractionnement par le n-butanol en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'Acétate d'éthyle, pour donner à la fin la fraction du Butanol (EBut) (**Annexe 09**). Les extraits sont conservés à 4°C (**Figure 17**) [**164**].

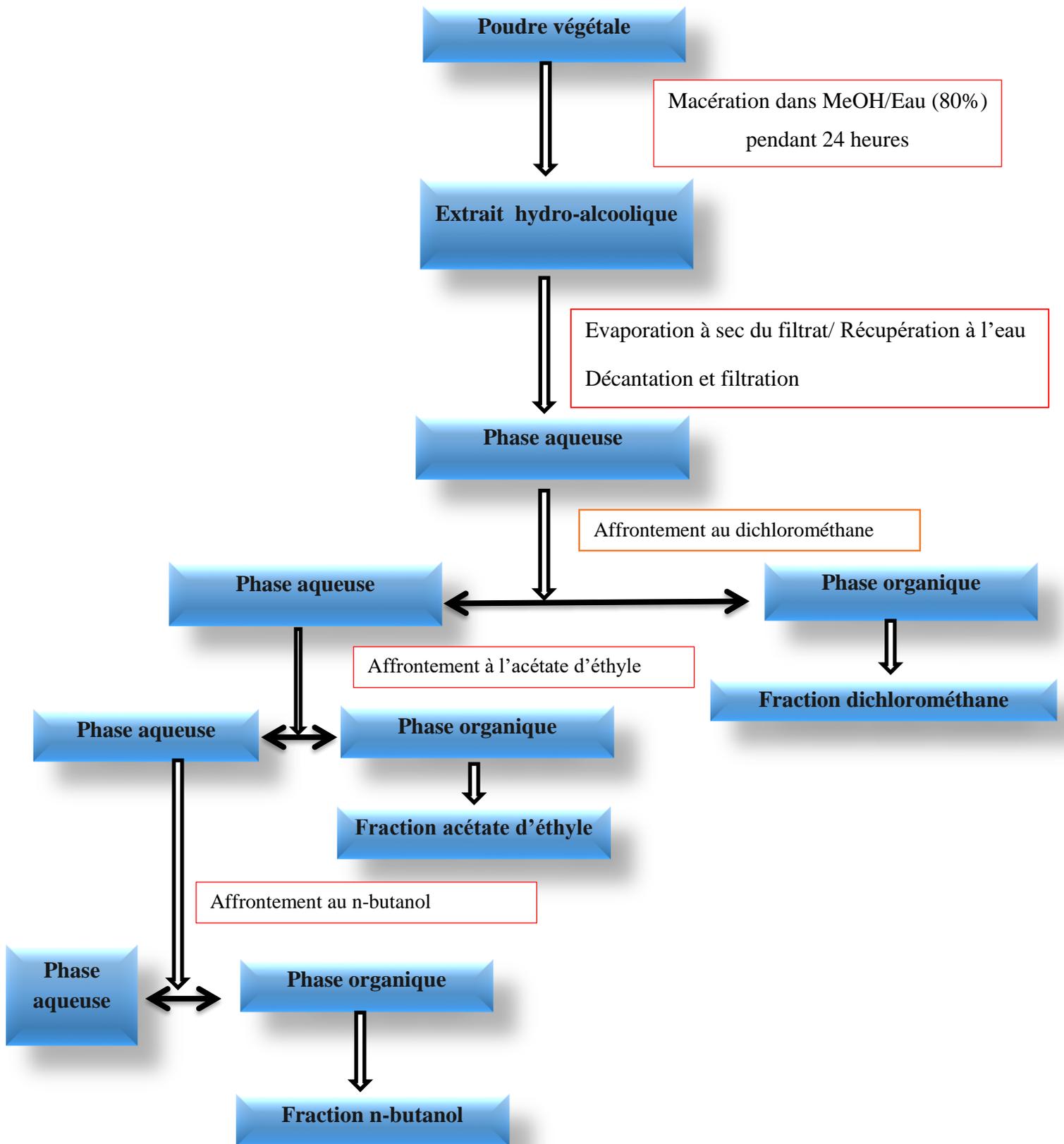


Figure 17. Extraction et fractionnement des métabolites

## 2. Le rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction correspondant au rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétale utilisée est calculé par l'expression suivante :

$$\text{Rd (\%)} = (\text{Me/Mp}) \times 100$$

**Avec :**

**Rd (%) :** Rendement en%

**Me :** Masse de l'extrait sec (en g),

**Mp :** Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (en g).

## 3. Screening phytochimique des feuilles d'*Abies numidica*

### 3.1. La recherche des tannins [165]

Dans un tube à essai, 1.5 g d'extrait (acétate d'éthyle, n-butanol, aqueux) a été placé dans 10 ml de méthanol (80%). Après agitation durant 15min, filtration puis ajout de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (1%), la présence des tanins galliques est indiquée par une coloration bleu-noirâtre, alors que la présence des tanins cathéchiques est indiquée par une coloration verte/Blue, verte.

### 3.2. Les Flavonoïdes [166]

5ml de l'extrait à tester, 1ml de HCl concentré et 0.5 g de tournure de magnésium (Mg) ont été mélangés dans un tube à essai. L'apparition d'une coloration rose ou rouge prouve la présence des flavonoïdes.

### **3.3. Les coumarines [167]**

Introduire 1ml de l'extrait à tester dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée (1ml). Ajouter 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 %, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

### **3.4. Les alcaloïdes [168]**

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et quelques gouttes de réactif de Wagner dans le second tube (**Annexe 22**). Après 15 min l'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence d'alcaloïdes.

### **3.5. Stérols et stéroïdes [165]**

Dans un bécher, introduire 10ml de l'extrait à tester, évaporation à sec, solubilisation avec 10ml de chloroforme anhydride. 5ml de la solution chloroformique est ajouté avec 5 ml de l'extrait obtenue, en ajoutant quelque gouttes d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Laisser reposer 20 min. L'apparition d'une coloration violacée virant au vert révèle la présence de stérols et stéroïdes.

### **3.6. Les composés réducteurs [165]**

Dans un tube à essai ajouter 1ml d'extrait à analyser, eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling (**Annexe 22**). Incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

### **3.7. Les anthocyanes [169,168]**

Dans un tube à essai, 2ml d'extrait à tester est ajouté à 5ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 5ml d'ammoniac  $\text{NH}_4\text{OH}$ . L'apparition d'une coloration rose/rouge ou bleue/violacée prouve la présence des anthocyanes.

### 3.8. Tri-terpènes [165]

10 ml de l'extrait à analyser est évaporé, le résidu est dissout dans un mélange d'anhydride acétique/chloroforme (5/5 V/V), filtration puis l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, l'apparition d'une coloration verte indique la présence des hétérosides stéroïdiques, alors que la coloration verte violette prouve la présence des triterpènes.

### 3.9. Les saponosides [109]

L'extrait à analyser à 2% dans l'eau distillée est porté à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement du mélange et filtration, ce volume est réajusté avec 100 ml d'eau distillée (SM).

10 tubes sont par la suite préparés comme suit :

Extrait (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L'eau (ml)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Après agitation avec énergie en position horizontale (15 secondes). On révèle la hauteur de la mousse persistante dans le 10<sup>ème</sup> tube. Ce qui indique la présence des saponosides.

## 4. Dosage des métabolites secondaires

### 4.1. Dosage des polyphénols

Le dosage de polyphénols totaux a été effectué en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) [170], selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par [171]. 20 µl d'extrait de plante est mélangé avec 100µl de FCR dilué (1 :10) et 75 µl de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est mis à l'obscurité et à une température ambiante pendant 2h. L'absorbance est mesurée à 765 nm par un lecteur de microplaque. La concentration des polyphénols totaux pour chaque échantillon est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits.

## 4.2 . Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. La méthode de [172] est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

Le protocole du dosage est effectué comme suit : 10 $\mu$ l de de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ), 10 $\mu$ l Potassium acétate ( $CH_3COOK$ ), 130 $\mu$ l méthanol sont ajoutés à 50 $\mu$ l extrait de plante. Le mélange est incubé pendant 40 min puis la lecture de l'absorbance est réalisée à 415nm. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol.

Les concentrations des flavonoïdes des extraits sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et sont exprimées en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EQ/ml d'extrait).

## 5.Activités biologiques

### 5.1. L'activité antifongique

Dans le présent travail l'activité antifongique des différents extraits de plante a été évaluée sur la croissance de champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici*. Cette espèce fongique a été identifiée par les soins de l'équipe de Monsieur Ali Debi chef de laboratoire de mycologie dans le Centre de Recherche en Biotechnologie. Constantine

#### 5.1.1. Préparation de champignon

Les isolats de *Fusarium* ont été cultivés sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour être réactivés et incubés durant 7 jours à 27°C à l'obscurité. Ils ont subi des repiquages successifs par la suite (Annexe 04).

#### 5.1.2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les Eppendorfs, les béchers, le réactif de DMSO, les embouts enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes (Annexe 10, 11).

### 4.3. Préparation des extraits (Annexe 02)

Pour préparer les différentes concentrations utilisées dans le test antifongique, on procède à une série de dilution de  $160 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $80 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $40 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg.ml}^{-1}$  et  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  de manière à obtenir une gamme de concentration finale dans les cupules comprises entre 160 et  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour les extraits EBut / EAc / EAq. Chaque concentration d'extrait a été mise en contact avec 100 ml de milieu PDA dans des erlenmeyers. Puis le contenu a été agité pour être homogénéisé (**Figure 18**).

### 4.4. Préparation de milieu de culture

Le choix d'un milieu de culture adéquat est indispensable au bon développement du pathogène, dans notre expérimentation on a utilisé le milieu PDA car il assure de bonnes conditions de cultures pour le *fusarium*.

Un volume de 1 ml de solution de DMSO pour chaque concentration d'extrait sec a été ajouté à 100 ml de milieu PDA préalablement préparé (**Annexe 1**) à  $60^\circ \text{C}$ . De même, 1 ml de DMSO a été ajouté à 100 ml de milieu PDA et a été considéré comme un contrôle positif. Le contrôle négatif contient le support PDA sans aucun autre produit [**173**].

Le mélange (PDA + extrait) a été coulé dans des boîtes de Pétri (**Annexe 03**). Ces dernières sont mises à sécher à température ambiante (**Figure 18**).

### 4.5. Applications des disques mycéliens

Après refroidissement et solidification du milieu de culture des disques mycéliens de 05 mm de diamètre d'une jeune colonie de *F. oxysporum* sont déposés de manière aseptique au centre de la boîte de Pétri sur le milieu PDA semi-solide et stérile contenant l'extrait préalablement stérilisé (1 disque par boîte) (**Annexe 05**). Il est à signaler que chaque concentration a été répliquée 4 fois. Les boîtes de pétri ont été incubées à  $28^\circ \text{C}$  de 4 à 7 jours (**Annexe 06**), et l'expérience s'est terminée lorsque la culture témoin négative (PDA sans extrait) a complètement colonisé la surface de la gélose (**Figure 18**).

La croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée à l'échelle millimétrique et les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance radiale par rapport au diamètre moyen des colonies de champignon cultivé dans un milieu témoin (positive). Ainsi, l'activité inhibitrice a été exprimée en pourcentage et a été calculée selon la formule de [174]

$$\mathbf{I (\%) = (C-T / C) \times 100}$$

**I** = taux d'inhibition en %.

**C** = croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA avec DMSO (témoin).

**T** = la croissance radiale, en mm, de l'agent phytopathogène sur milieu PDA contenant le complexe à tester.

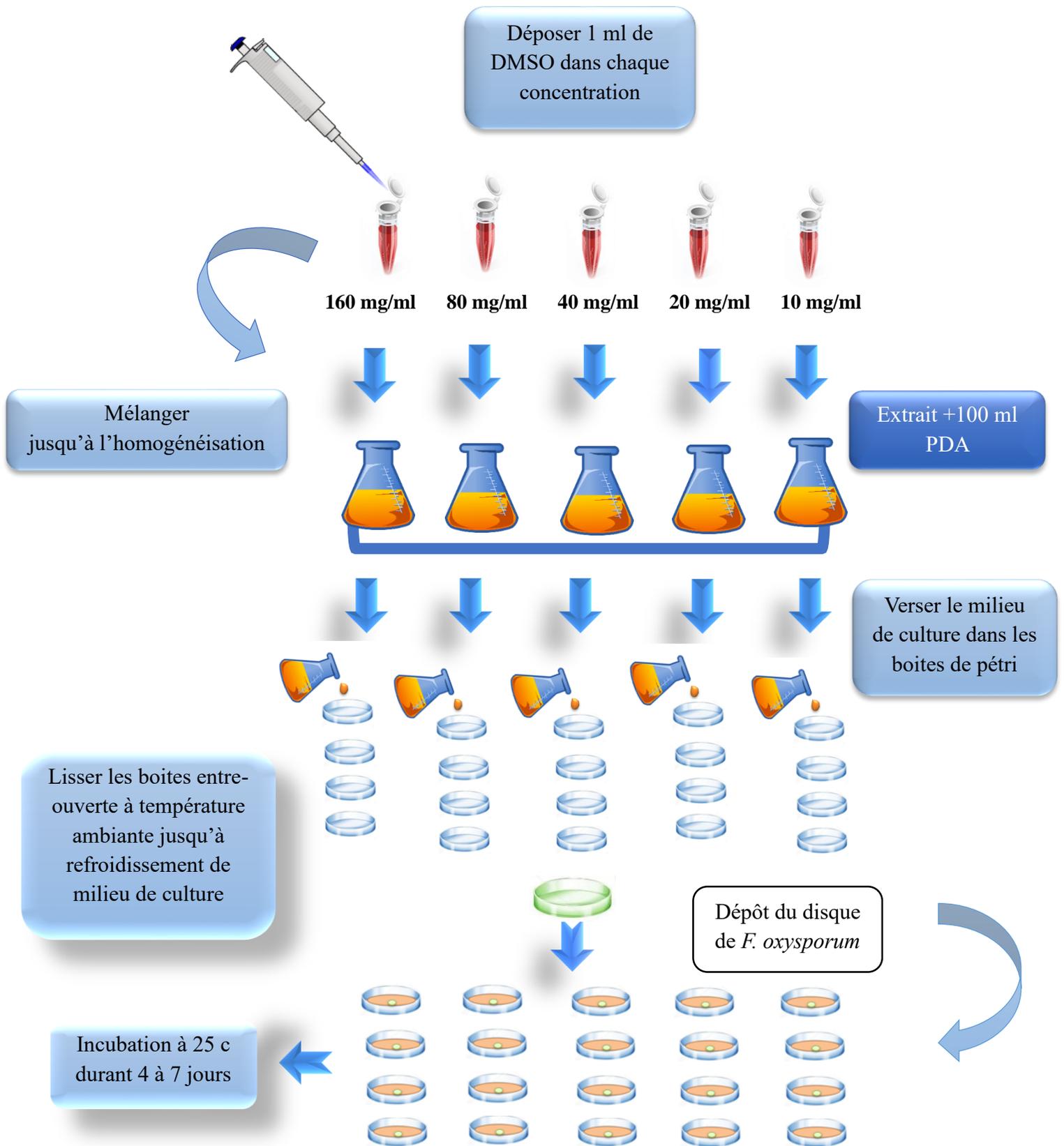


Figure 18 : Protocole de l'activité antifongique

## 5.2. Evaluation de l'effet hémolytique

Le test de l'effet hémolytique des extraits (aqueux, n-butanol, acétate d'éthyle) des feuilles de *Abies numidica* a été réalisé, *in vitro*, sur une suspension érythrocytaire du sang humain incubée dans un tampon phosphate salin (PBS), pH 7,4.

### 5.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé d'un donneur sain unique dans un tube hépariné, est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 10 minutes. Après élimination du plasma, le culot est lavé 2 fois avec une solution de PBS, le culot ainsi obtenu est resolubilisé à nouveau par le même volume du plasma éliminé, la suspension érythrocytaire ainsi obtenue est diluée 20 fois par PBS (**Annexe 20**).

### 5.2.2. Préparation des extraits

Les différents extraits (EAq, EBut, EAc) des feuilles d'*Abies numidica* sont dilués dans du tampon phosphate salin (PBS) (**Annexe 18**). Pour obtenir les différentes concentrations (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml et 160 mg/ml) (**Annexe 19**).

### 5.2.3. Test d'hémolyse

Le test d'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de [175], avec quelques modifications.

Mettre dans chaque tube à hémolyse 2950µl de la suspension érythrocytaire préparée, avec 50µl de l'extrait à différentes concentrations (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml et 160 mg/ml). Incuber les tubes dans l'incubateur agitateur à 37°C durant 60 min (**Annexe 13,16**). Des prélèvements de 500 µl sont réalisés chaque 15 min pour être repris dans 1500µl de PBS ; mélanger les tubes délicatement puis arrêter la réaction avec un bain glaçon.

La lecture de l'absorbance (Abs) de chaque tube est effectuée à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (**Annexe 14**) contre le blanc contenant du PBS après leur centrifugation à 4000 tour/minute durant 10 min (**Figure 19**).

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 2950µl de suspension érythrocytaire et 50µl du tampon phosphate (PBS), en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250µl de la suspension érythrocytaire et 2750µl d'eau distillée et en absence d'extrait.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 min d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs (extrait 60min)} - \text{Abs (témoin négatif 60min)}}{\text{Abs (hémolyse total 60min)}} \times 100$$

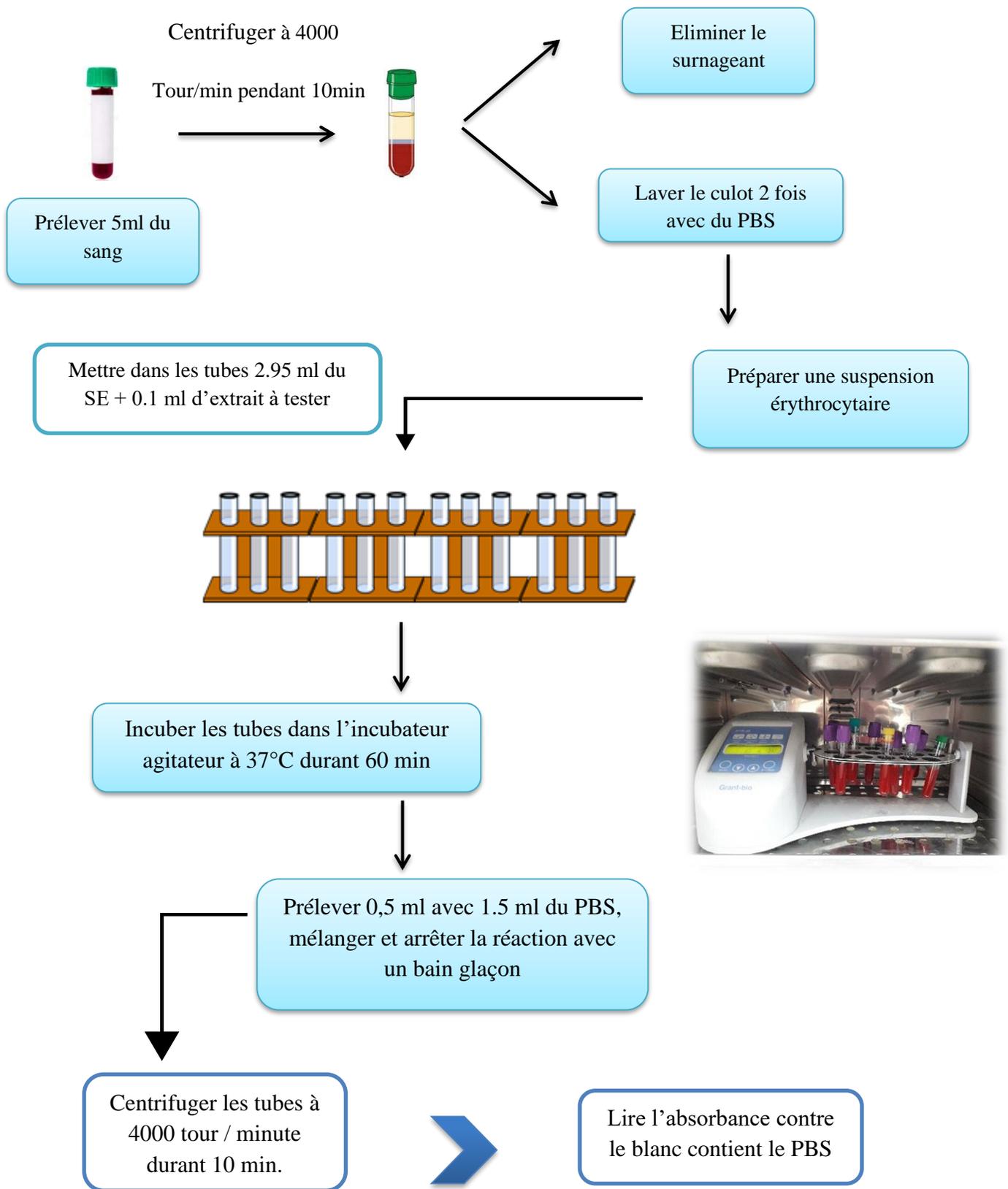


Figure 19. Protocole de l'activité hémolytique

*Résultats*

*Et*

*Discussions*

## 1. Etude phytochimique

### 1.1. Rendements d'extraction

Les extractions successives par des solvants de polarité croissante permettent de séparer les métabolites secondaires de la matière végétale des feuilles d'*Abies numidica* selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les différents rendements obtenus, ainsi que les aspects et les couleurs des différents extraits, sont présentés dans le **Tableau 07**.

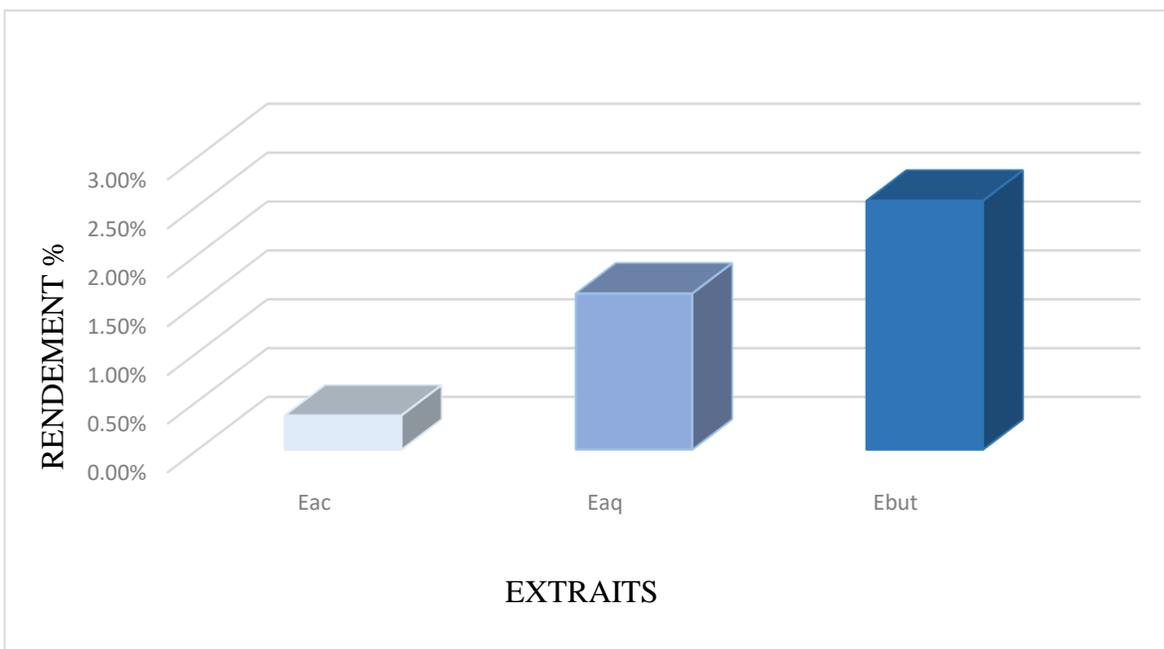
**Tableau 07** : Aspects, couleurs et rendements massique (%) des extraits obtenus

Parties de la plante	Extraits	Aspect	Couleur	Rendement %
<b>Les feuilles d'<i>Abies numidica</i></b>	Acétate d'éthyle	Visqueux	Marron	0,35%
	n-butanol	Visqueux	Marron foncé	2,549 %
	Aqueux	Visqueux	Marron	1.6 %

Le rendement des extraits des feuilles d'*Abies numidica*, calculé en fonction du matériel végétal sec varie de 0.35% à 2.549%, incluant extrait aqueux (1.6%), acétate d'éthyle (0.35%) et n-butanol (2.549%).

L'histogrammes (**Figure 20**) a montré un rendement plus élevé pour l'extrait n-butanol (2.549%), suivit de l'extrait aqueux (1.6 %), puis l'extrait acétate d'éthyle (0.35 %). Nous notons que les échantillons (3 extraits) sont obtenus à partir de la même partie de la plante étudiée et cette dernière a été récolté dans la même région.

Cette variation du rendement d'extraction donc peut être expliqué par la différence de solubilité des composés chimiques dans le solvant d'extraction, à leur degré de polymérisation ou à leur implication dans autres structures moléculaires formant ainsi des complexes insolubles [176].



**Figure 20.** Rendement (%) des extraits des feuilles d'*Abies numidica*

## 1.2. Screening phytochimique

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection et la visualisation des différentes classes des 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 [177].

Les résultats de l'analyse phytochimique de trois extraits des feuilles d'*Abies numidica* sont présentés dans le tableau suivant : (+) présent en petite quantité, (++) en quantité intermédiaire, (+++) en grande quantité, (-) absence ou présence en dessous du seuil de détection.

**Tableau 08 :** Tests phytochimique des extraits aqueux, acétate d'éthyle, n-butanol des feuilles de *Abies numidica*

Groupes chimiques	Réactifs	Acétate d'éthyle	N-butanol	Aqueux
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	+++	-	-
Flavonoïdes	Hcl concentré Tournure de Mg	+++	+++	+
Anthocyanes	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub> OH	+	-	-
Coumarines	H <sub>2</sub> O NaOH	-	-	-
Alcaloïdes	R de Mayer R de Wagner	-	-	-
Stérols et stéroïdes	Acide sulfurique	+	+	-
Tri-terpènes	Acide sulfurique	-	-	-
Saponosides	Réaction de la Mousse	++	+++	+++
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	++	+	+

D'après les résultats nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Abies numidica* est riche en tanins, flavonoïdes et saponosides. Les composés réducteurs sont aussi présents en quantité intermédiaire, alors que les anthocyanes et les stérols sont présents, en faible quantité. Nous remarquons aussi que l'extrait acétate d'éthyle est pauvre en coumarines, alcaloïdes et tri-terpènes.

En ce qui concerne l'extrait n-butanol, l'analyse de ce dernier révèle la présence de saponosides et flavonoïdes en grandes quantités, les stérols et les stéroïdes, les composés réducteurs avec une faible quantité, alors que les autres composés chimiques (tanins, anthocyanes, coumarines, alcaloïdes, tri-terpènes) sont absents dans cet extrait.

Pour l'extrait aqueux le test phytochimique indique sa richesse en saponosides, les flavonoïdes et les composés réducteurs sont présents en faible quantité. Les tanins, les anthocyanes, les alcaloïdes, les triterpènes ainsi que les stérols et les stéroïdes sont totalement absents, dans cet extrait.

Ces résultats sont similaires à ceux réalisés sur une autre espèce d'*Abies* (*A. webbiana*) qui montrent la présence de stéroïdes, de phénols, de flavonoïdes, de tanins, de saponines [178].

### 1.3. Dosage des métabolites secondaires

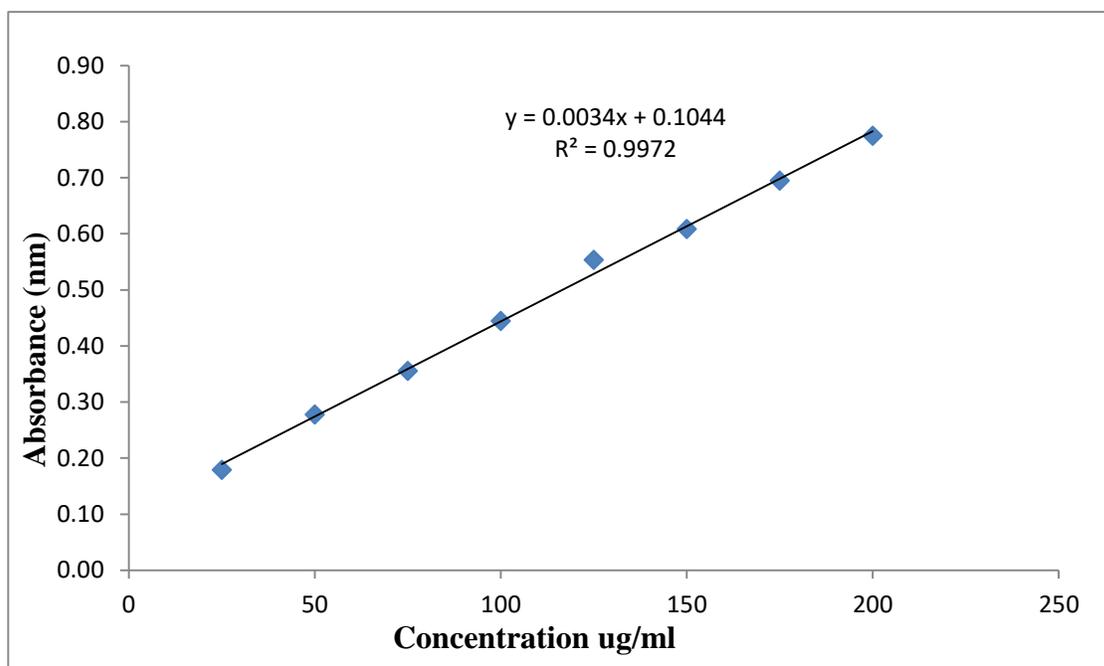
#### 1.3.1. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante *Abies numidica*, est déterminée selon la méthode Folin-Ciocalteu. La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ) réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations et l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm (**Figure 21**).

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation :

$$Y = 0.0034X + 0,1044$$

$$R^2 = 0,9972$$



**Figure 21.** La courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La relation entre la concentration et l'absorbance est proportionnelle donc la loi de Beer Lambert est vérifiée dans la gamme des concentrations utilisées. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme d'extrait ( **$\mu\text{g EAG/ml d'extrait}$** ). La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 765nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 09 :** Teneurs en polyphénols totaux

	Extrait acétate	Extrait n-butanol	Extrait aqueux
Contenu en phénols totaux ( $\mu\text{g EAG/ml}$ )	490,76	381,15	99.294

A la première lecture des résultats rapportés dans le **Tableau 09**, il ressort que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols totaux ( $490,76 \pm 6,65 \mu\text{g EAG/ml d'extrait}$ ) suivi par l'extrait n-butanol ( $381,15 \mu\text{g EAG/ml d'extrait}$ ), puis l'extrait aqueux ( $99,294 \mu\text{g EAG/ml d'extrait}$ ).

En revanche, l'analyse phytochimique réalisée par [179,180] des extraits des feuilles d'une autre espèce montre que l'extrait méthanolique et l'extrait acétate d'éthyle d'*Abies Webbiana* présentent une teneur élevée en polyphénols totaux.

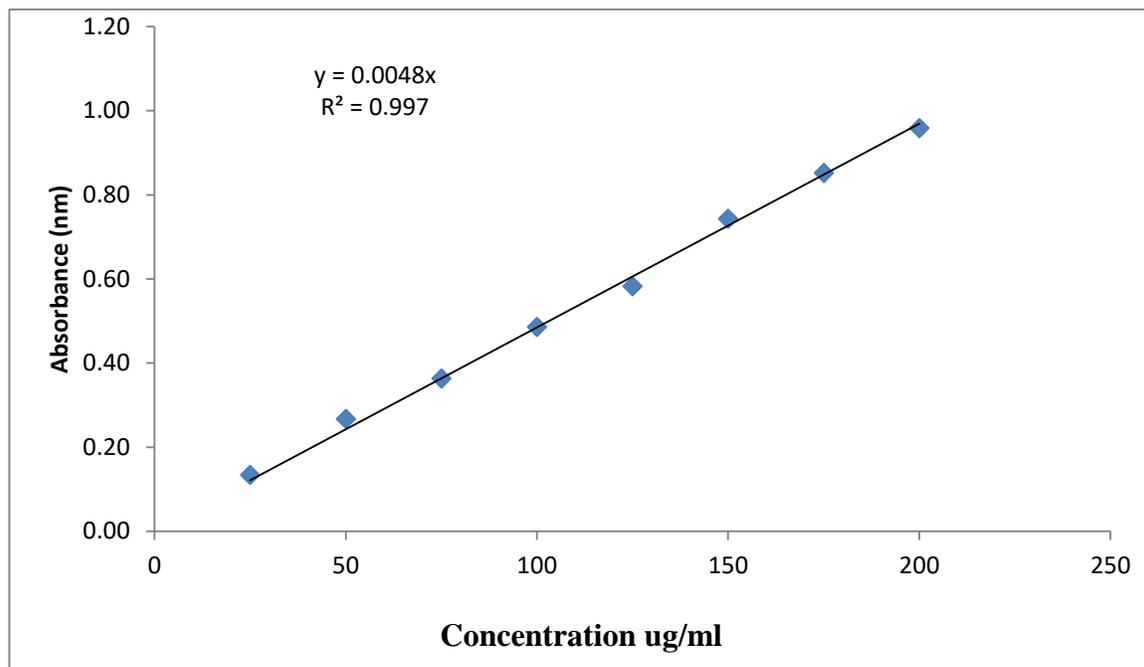
Cette variation du taux de polyphénols peut être due à la diversité aux différents procédés d'extraction tels que le type de solvant, la température et le temps d'extraction [181]

Parce que les polyphénols est une classe de molécules caractérisées comme l'indique le nom par la présence de plusieurs groupes phénoliques associés en structures plus au moins complexes, sont solubles dans les solvants organiques polaires et peu solubles dans les solvant moins polaire [182], ainsi les solvants qui ont donnés les teneurs les plus élevées sont l'acétate éthyle avec une polarité moyenne et l'eau dont la polarité est plus élevée.

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques, mais également certains sucres et de protéines [183]. Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé [184].

### 1.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ). La quercitine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où a été calculé la teneur en flavonoïdes de extraits des feuilles d'*Abies numidica* (Figure 22).



**Figure 22.** La courbe d'étalonnage de la quercitine.

Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercitine par millilitre d'extrait ( $\mu\text{g EQ/ml d'extrait}$ ) dans le tableau suivant

**Tableau 10 :** Teneurs en flavonoïdes

	Extrait acétate	Extrait n-butanol	Extrait aqueux
Contenu en Flavonoïdes ( $\mu\text{g EQ/ml}$ )	143,19	49,79	28.538

D'après les résultats du **Tableau 10** nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle a une teneur très importante (143,19  $\mu\text{g EQ/ml d'extrait}$ ) par rapport aux autres extraits (n-butanol et aqueux) (49,79  $\mu\text{g EQ/ml d'extrait}$  et 28.538  $\mu\text{g EQ/ml d'extrait}$  respectivement). Ceci peut être expliqué par la diversité structurale et les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes [51].

Autres études réalisées par [185,186] ont montré que l'extrait acétonique de feuilles de *A. pindrow* était le plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes.

De toute les façons, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux réalisés sur d'autres espèces, car l'utilisation de différents solvants et de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. En plus cette différence peut être liée à l'espèce étudiée, la région de la récolte et le climat [187].

## 2. Activités biologiques

### 2.1. Activité antifongique

L'activité antifongique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques. En effet, les composés antifongiques majeurs chez les végétaux peuvent appartenir à différentes classes de métabolites secondaires telles que : les acides phénols, les quinones, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les terpenoïdes, les alcaloïdes, les saponosides, les lectines ou encore les polypeptides.

Dans cette étude, on a tenté de comparer l'influence de 3 extraits (aqueux, n-butanol, acétate d'éthyle), sur la croissance mycélienne de champignon pathogène *F. oxysporum*, dans le but d'estimer l'évolution de la croissance mycélienne, par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon.

Cette lecture est réalisée en comparaison avec celles des témoins, qui sont démarrés dans les mêmes conditions et le même jour du test. Toute pousse même légère de champignon sera considérée comme action négative, c'est-à-dire que l'extrait en question n'est pas inhibiteur vis-à-vis de la croissance fongique.

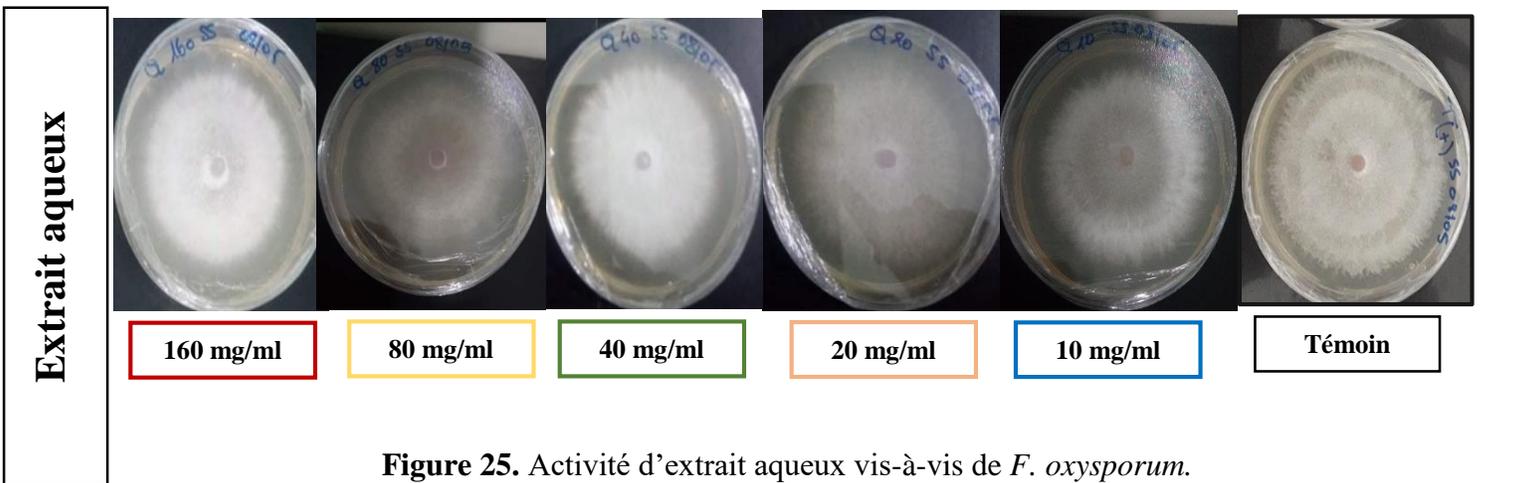
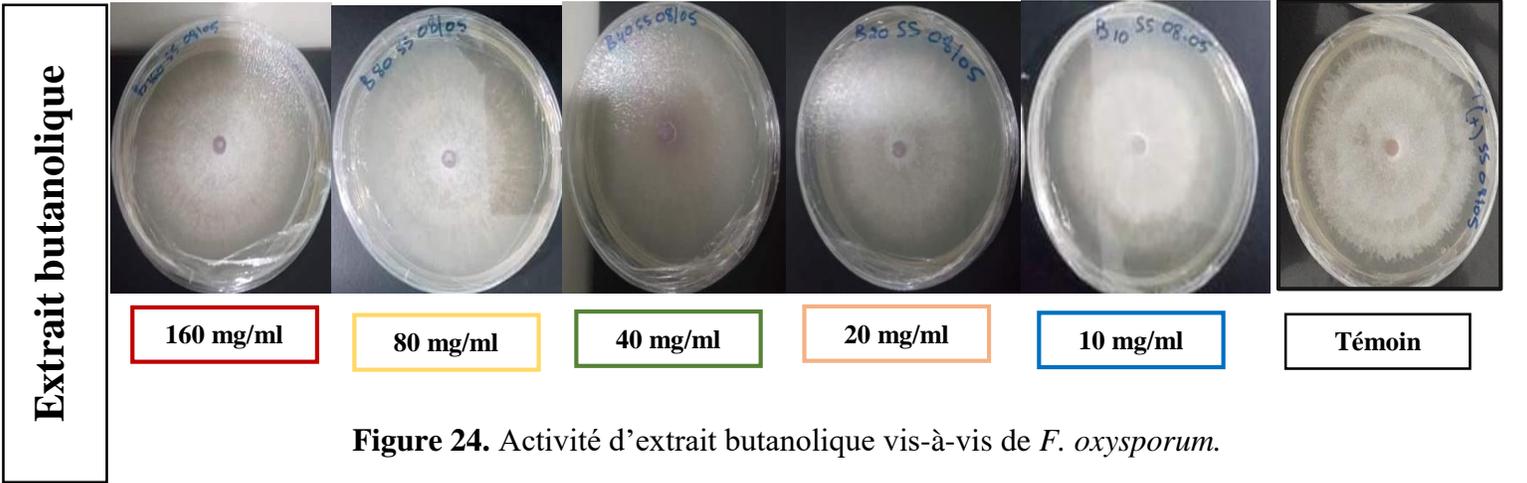
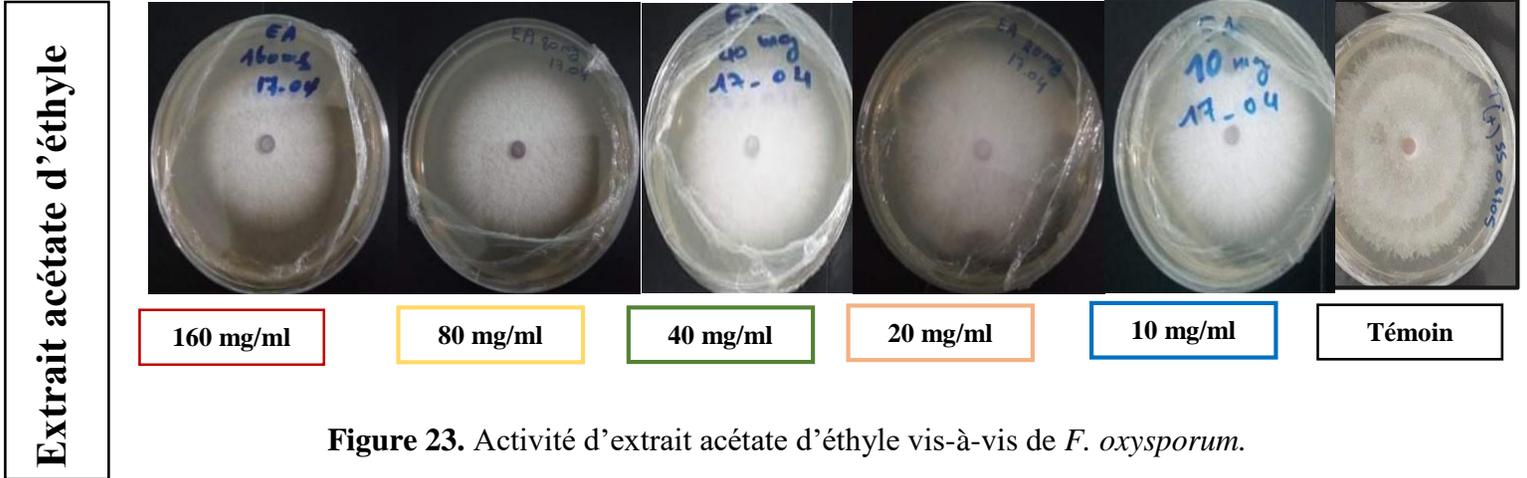
#### 2.1.1. Evaluation de la croissance mycélienne

En premier temps, la croissance mycélienne de souche fongique était normale (témoins), ce paramètre évolue dans le temps (incubation 7 jours) et il se diffère en présence des différentes concentrations d'extraits des feuilles d'*Abies numidica*. L'utilisation des témoins a favorisé une comparaison juste et fiable de l'effet des extraits contre ce champignon.

Les diamètres de la croissance mycélienne en mm (y compris le diamètre de disque qui est 8mm) ainsi que les taux d'inhibition (%) des 3 extraits (acétate d'éthyle, n-butanol, aqueux) des feuilles d'*Abies numidica*, *in vitro* sur la souche fongique *F. oxysporum* sont résumées dans le **tableau 11**.

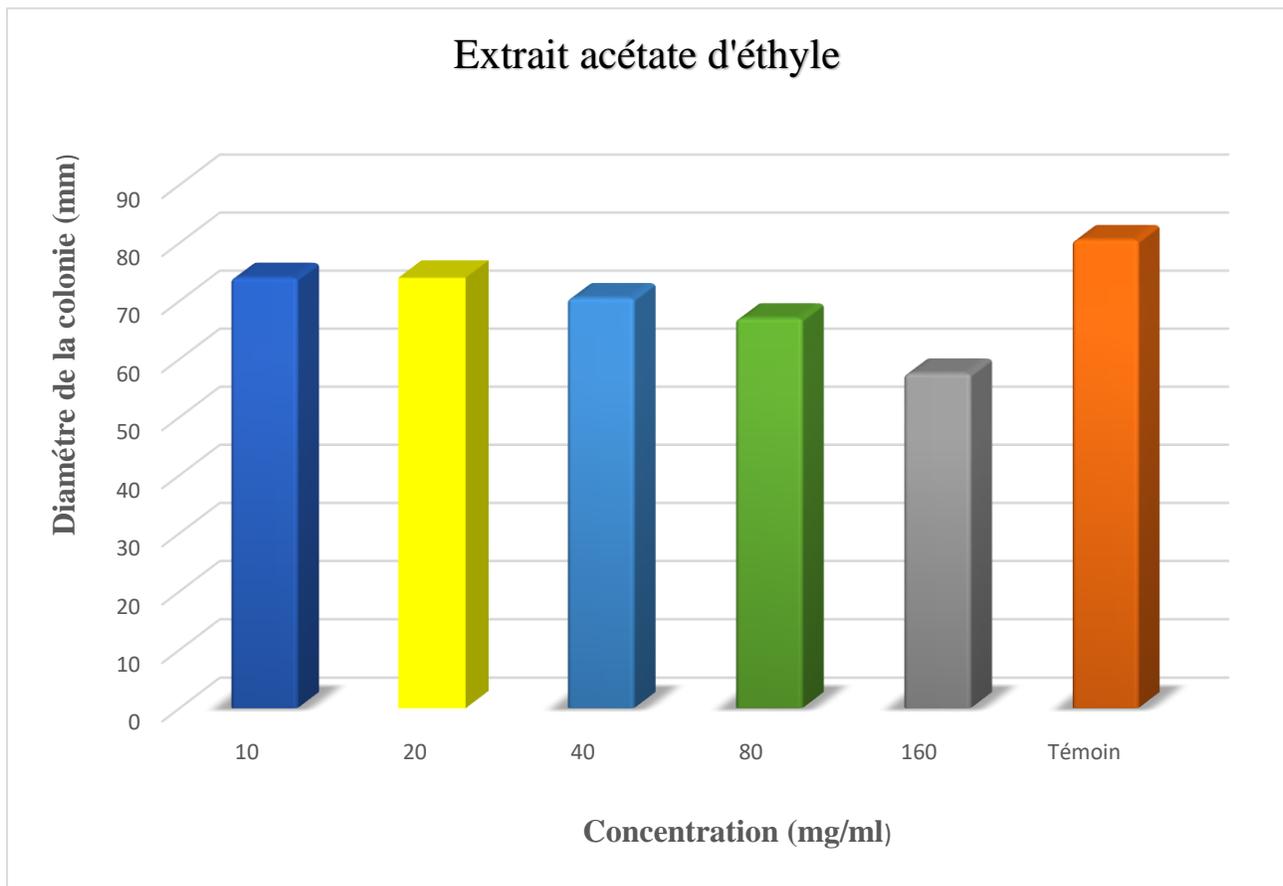
**Tableau 11** : les effets des extraits des feuilles d'*Abies numidica* sur la croissance de *Fusarium oxysporum*

Extrait	Concentration	Diamètre de la colonie (mm)	Taux d'inhibition (%)
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	160 mg/ml	57.5	28.57 %
	80mg/ml	67	16.77 %
	40mg/ml	70.5	12.42 %
	20mg/ml	74	8.07 %
	10mg/ml	74	8.07 %
<b>Extrait butanolique</b>	160 mg/ml	67	16.77%
	80mg/ml	72	10.55%
	40mg/ml	72	10.55%
	20mg/ml	78	3.10%
	10mg/ml	78	3.10%
<b>Extrait aqueux</b>	160 mg/ml	67	16.77%
	80mg/ml	66.2	17.76 %
	40mg/ml	70.2	12.79%
	20mg/ml	68	15.52 %
	10mg/ml	74	8.07 %
<b>Témoin (-)</b>		80.25	
<b>Témoin (+)</b>		80.50	



➤ En présence d'acétate d'éthyle :

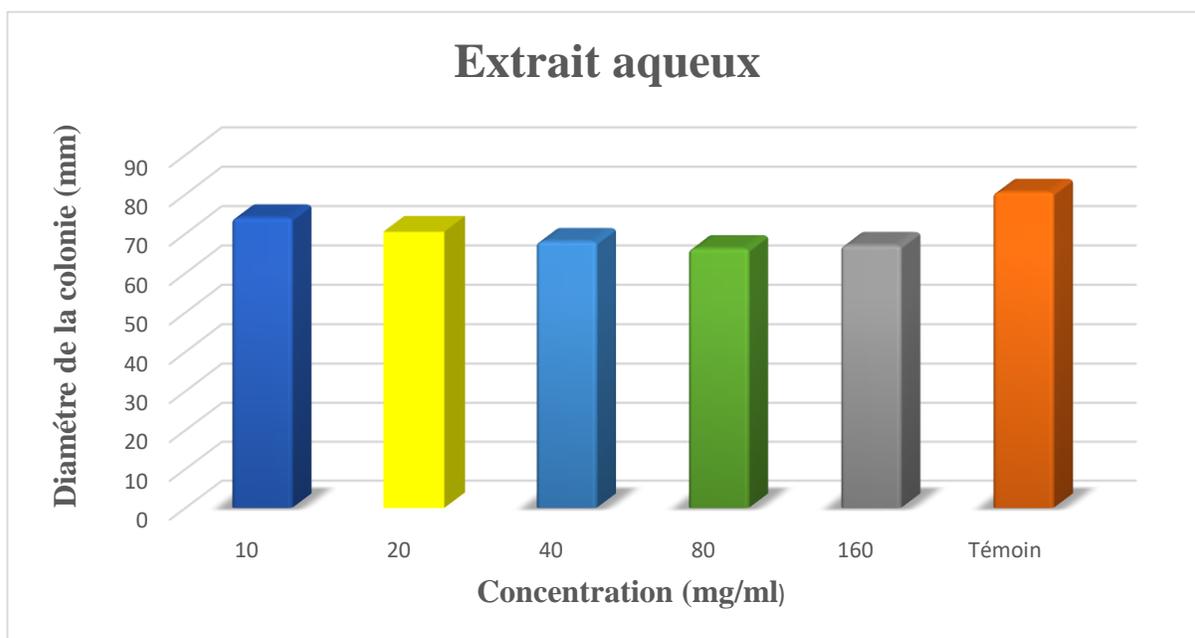
L'évaluation du diamètre de croissance mycélienne est représentée dans la **Figure 26**. On remarque que le degré de l'efficacité de l'extrait acétate d'éthyle d'*Abies numidica* sur la croissance mycélienne de souche fongique testée augmente en fonction de concentration (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml, 160 mg/ml). D'après les résultats nous avons noté que la concentration de 160 mg/ml donne l'inhibition la plus élevée sur la croissance (57.5 mm), celle du témoin est égale à 80mm. Ce qui se défaire aux autres concentrations (80mg/ml,40mg/ml,20mg/ml,10mg/ml) qui ont montré un effet léger sur la croissance mycélienne (67mm,70.5mm,74mm,74mm respectivement).



**Figure 26.** Effet de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Abies numidica* sur la croissance de *F. oxysporum*

➤ En présence de l'extrait aqueux

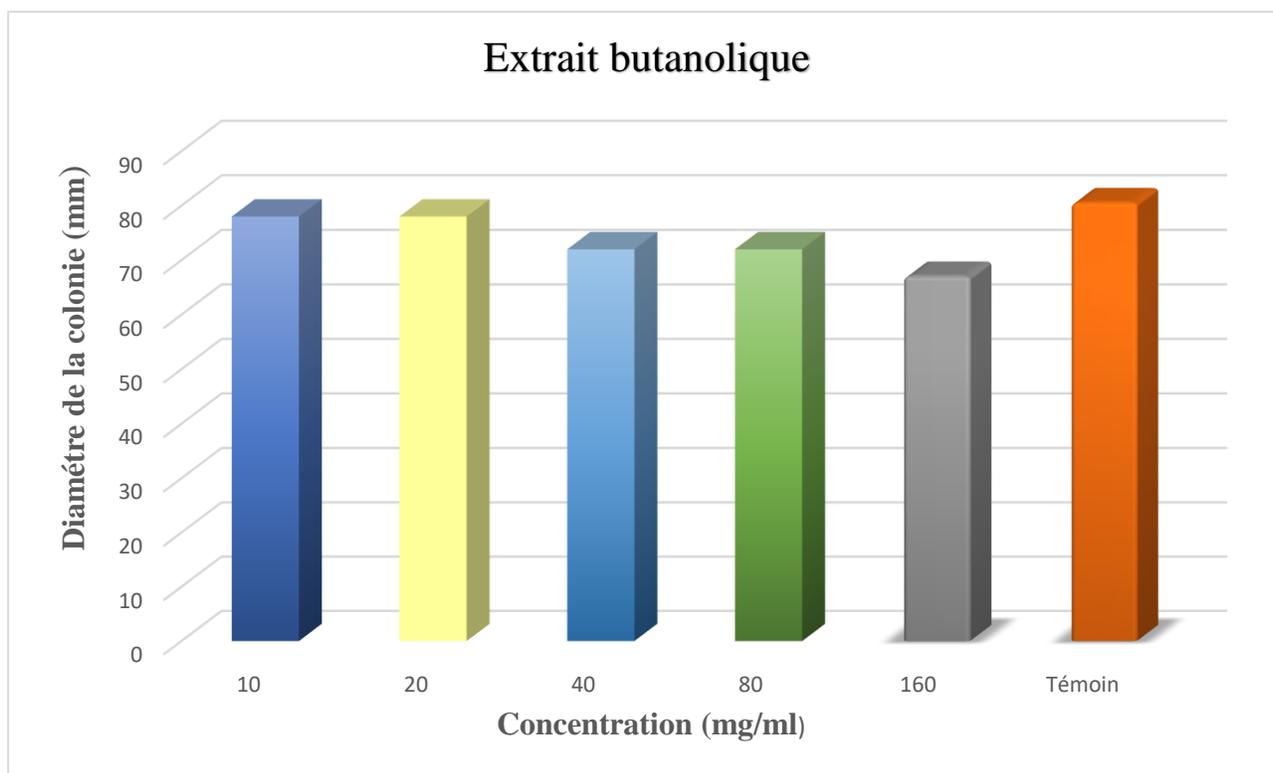
On observe dans la **figure 27**, que l'effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*A. numidica* est léger et donne une moyenne de diamètre de (74mm,68mm,70.2mm,66.2mm,67mm) pour les concentrations (10mg/ml,20mg/ml,40mg/ml,80mg/ml,160mg/ml respectivement), par rapport au témoin qui présente une moyenne de diamètre égale à 80mm.



**Figure 27.** Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Abies numidica* sur la croissance de *F. oxysporum*

➤ En présence de l'extrait n-butanol

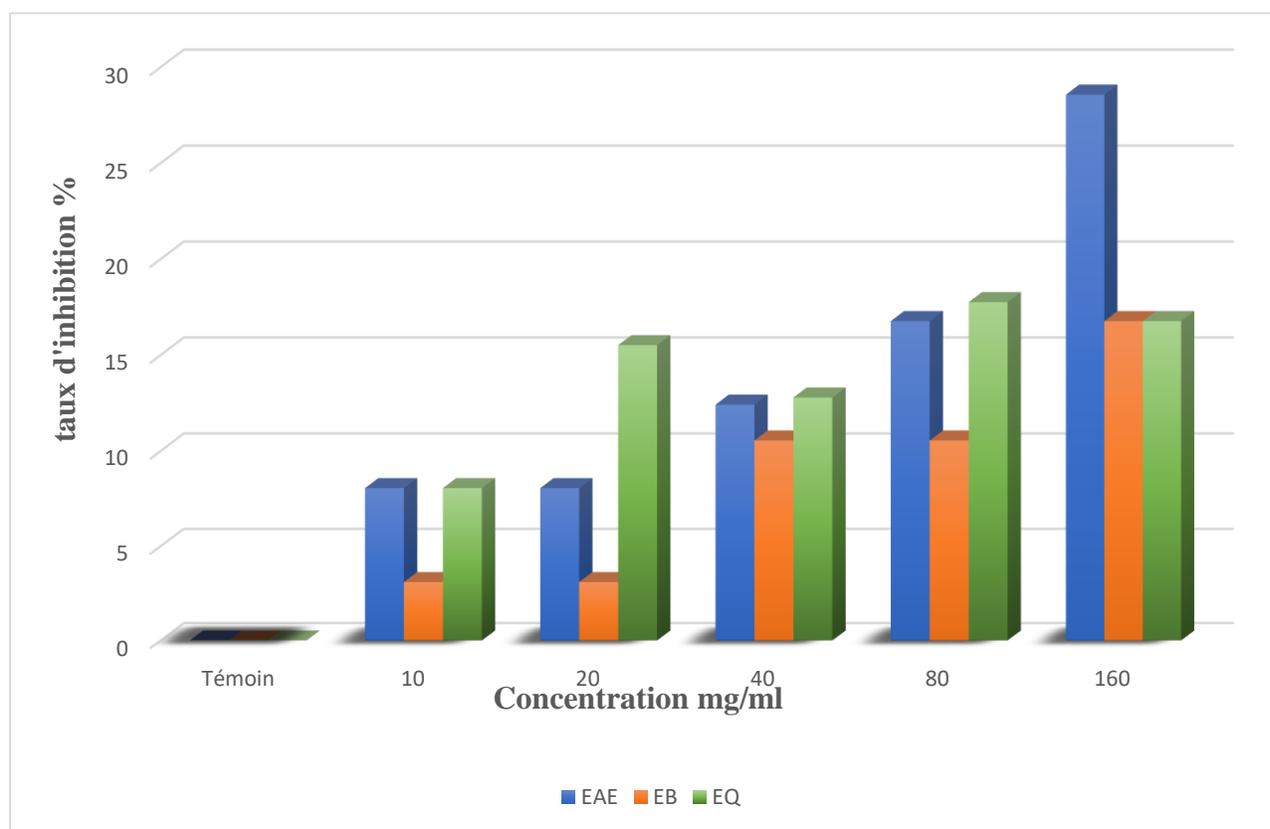
En ce qui concerne l'effet de l'extrait n-butanol d'*Abies numidica* les résultats présentés dans la **figure 28** montrent que cet extrait possède aussi un léger effet fongicide, il donne la moyenne de diamètre de (78mm, 78mm, 72mm, 72mm, 67mm) pour les concentrations (10mg/ml,20mg/ml,40mg/ml,80mg/ml,160mg/ml respectivement).



**Figure 28.** Effet de l'extrait butanolique des feuilles d'*Abies numidica* sur la croissance de *F. oxysporum*

### 2.1.2. Pouvoir antifongique

Les résultats du pourcentage d'inhibition des extraits (butanolique, acétate d'éthyle et aqueux) de feuilles d'*Abies numidica* (**figure 29**), montrent que l'extrait acétate d'éthyle a inhibé la croissance de *Fusarium oxysporum* avec un pourcentage d'inhibition de 28.57 %. Cet extrait contient plus des substances antifongiques inhibitrices par rapport à tous les extraits utilisés dans cet essai antifongique. Cependant, l'extrait aqueux présente un faible taux d'inhibition compris entre 8.07% et 17.76%. En parallèle, l'autre extrait butanolique présente aussi un faible taux d'inhibition mais cette activité est très distante et modeste en comparaison avec l'extrait acétate, son pouvoir inhibiteur se situe entre 3.10% et 16.77%.



**Figure 29.** Taux d'inhibition de *F. oxysporum* par l'extrait acétate d'éthyle, butanolique et aqueux des feuilles d'*Abies numidica*.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait acétate éthyle est plus actif que l'extrait aqueux et butanolique. Cette différence peut être due à l'origine de la composition chimique différente entre les trois extraits, Ces résultats peuvent également être expliqués par le taux élevé des flavonoïdes par rapport aux phénols totaux dans l'extrait acétate d'éthyle (143,19  $\mu\text{g EQ/ml}$ ) par rapport à l'extrait aqueux (28.538 $\mu\text{g EQ/ml}$ ) et l'extrait n-butanol (49,79 $\mu\text{g EQ/ml}$ ). Les composés phénoliques sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées *in vitro* ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes [188]. De nombreuses études ont révélé la relation contradictoire entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir antimicrobien.

[189] rapportent que les flavonoïdes qui sont caractérisés par l'absence du groupement hydroxyle sur le noyau B présentent une activité antimicrobienne plus élevée que ceux ayant le groupe-OH. D'autre part, [190] ont montré que les flavonoïdes les plus substitués par le groupement hydroxyle libre sont impliqués dans l'activité antimicrobienne en particulier les molécules trihydroxylées en C3', C4', C5' sur le noyau B et hydroxylé en C3 (3-OH). Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antifongique des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires à effet antifongique tels que les stéroïdes, les saponosides qui ont par ailleurs déjà été signalés par plusieurs auteurs [191,192,103].

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique pour chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antifongique.

Des travaux réalisés par [33] montrent que l'extrait hydrométhanolique et les huiles essentielles des feuilles d'*Abies numidica* présentent une activité antifongique vis-à-vis de deux espèces de *candida*.

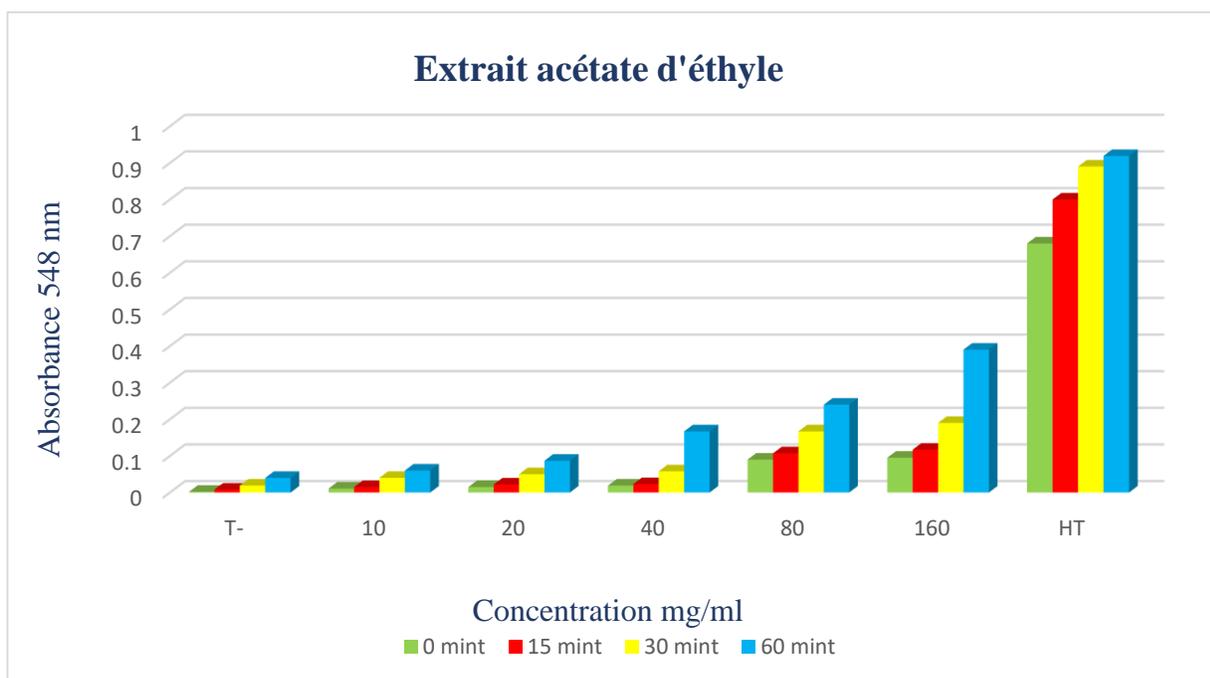
De plus, [34] ont montré que les cônes de l'extrait hydro-méthanolique de la même plante a un pouvoir antifongique vis-à-vis de cinq levures avec une CMI de 5 mg / ml contre *Candida glabrata* et avec un CMI de 10 mg / ml contre *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* et *Candida albicans*.

Cependant, autres études réalisées par [194] sur les cônes d'*Abies cilicica* de Turquie et qui ont montré que cette espèce présente une activité antifongique.

D'après [195] l'extrait méthanolique, éthanolique et acétonique des feuilles et fleurs des cônes de la plante *A. cilicica ssp. Cilicica* ont été évalués pour leur activité antifongique contre deux champignons pathogènes (*Candida albicans* and *Aspergillus niger*). L'enquête en cours a prouvé l'activité potentielle des extraits d'*A. Cilicica* en tant que source antifongique cultivée naturellement en Syrie.

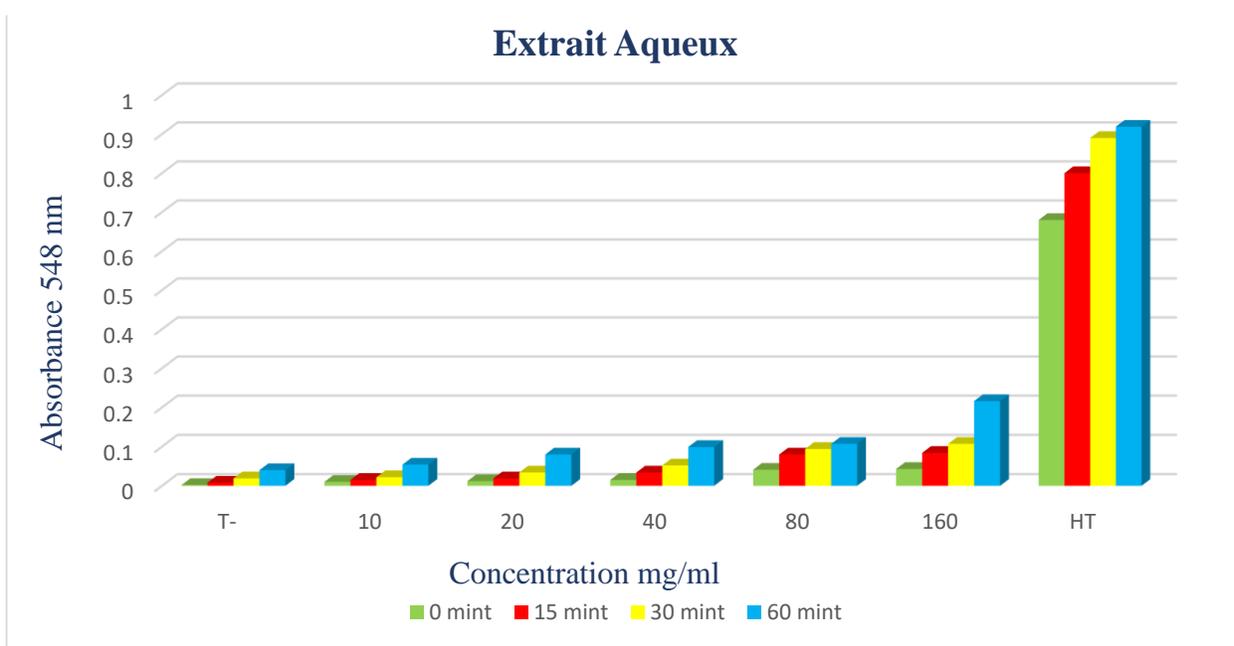
## 2.2. Evolution de l'effet hémolytique des feuilles d'*Abies numidica*

Dans cette partie la cytotoxicité est suivie par la fuite d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains. Les **figures (30,31,32)** présentent l'évolution de l'effet hémolytique, (par absorbance), durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations (10 mg/ml, 20mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml, 160 mg/ml ), d'extrait (Aqueux, N-butanol, Acétate d'éthyle) des feuilles d'*Abies numidica*, comparée à un tube témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse totale provoquée par l'eau distillée (**Annexe 21**).

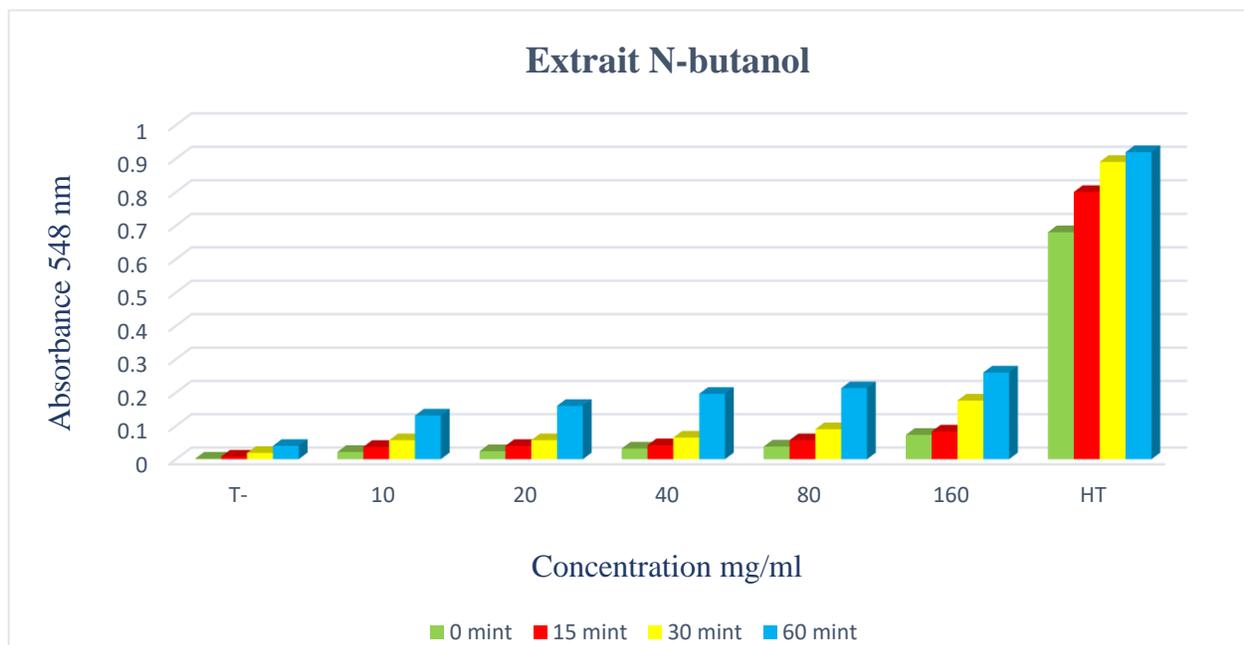


**Figure 30.** L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Abies numidica*, durant 60 minutes

T- : témoin négatif ; HT : hémolyse totale



**Figure 31.** L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait aqueux des feuilles d'*Abies numidica*, durant 60 minutes.

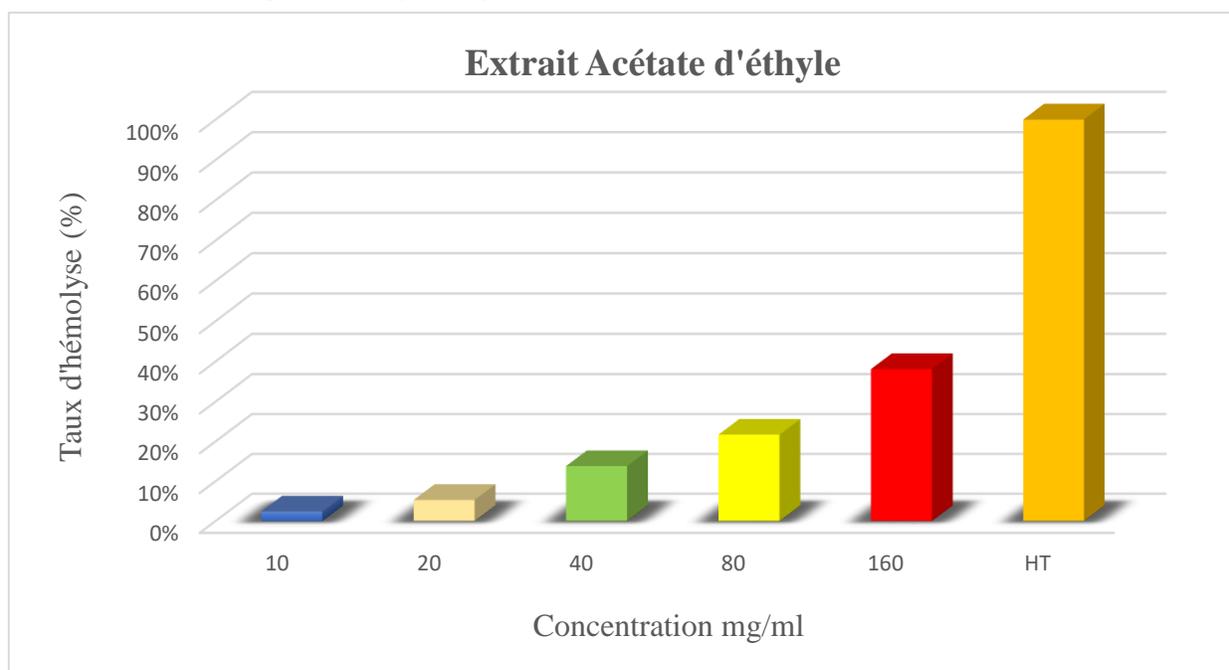


**Figure 32.** L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait n-butanol des feuilles d'*Abies numidica*, durant 60 minutes.

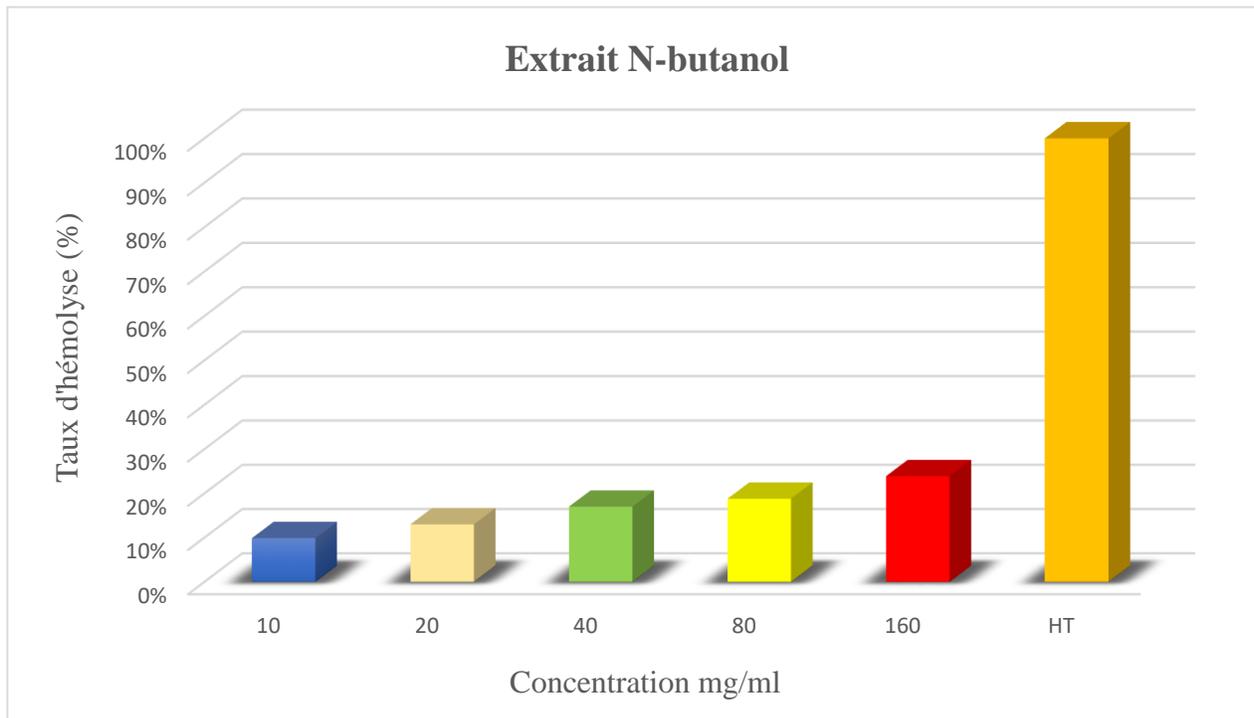
D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des absorbances (taux d'hémolyse) durant les 60 min d'incubation des érythrocytes isolés dans du PBS (pH 7,4) en présence des différents extraits (Aqueux, Acétate, N-butanol) d'*Abies numidica*.

De même, nous avons noté que les absorbances augmentent aussi en fonction des concentrations (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml, 160 mg/ml), mais elles ne dépassent pas une valeur de (0,39, 0,260, 0,216) pour l'extrait (Acétate d'éthyle, N-butanol, Aqueux) respectivement à une concentration finale de 160mg/ml à 60 min d'incubation. Cette valeur est largement inférieure par rapport à l'absorbance de tube d'hémolyse totale, qui dépasse 0,919 à 60 min dans les mêmes conditions.

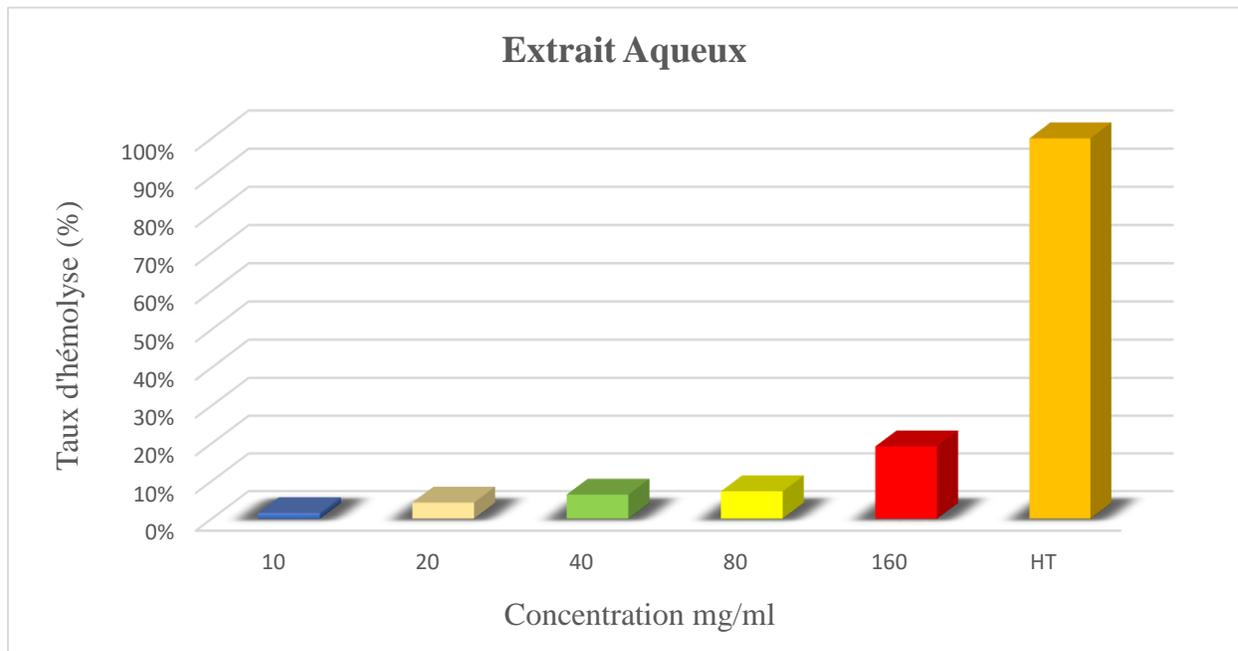
Les **figures (33,34,35)** présentent les taux d'hémolyse, par pourcentage (%) après 60 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations (10 mg/ml, 20 mg/l, 40 mg/ml, 80 mg/ml, 160 mg/ml) d'extrait (Aqueux, Acétate d'éthyle, N-butanol) des feuilles d'*Abies numidica* par rapport au tube d'hémolyse totale contenant la suspension érythrocytaire et l'eau distillée (**Annexe 21**).



**Figure 33.** Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait Acétate d'éthyle, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.



**Figure 34.** Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait n-butanol, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.



**Figure 35.** Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait aqueux, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.

Les résultats relatifs aux taux d'hémolyse induit par les différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle d'*Abies numidica* sont présentés dans la **Figure 33**. D'après les résultats nous avons noté des taux d'hémolyses très bas d'ordre de (2.4%, 5.3%), par rapport à l'hémolyse total pour les concentrations (10, 20 mg/ml respectivement). Ce taux est moyennement augmenté d'ordre de (13.8%, 21,7%) à des concentrations de (40, 80 mg/ml), alors que nous avons noté un taux plus élevé (38.1%) pour une concentration maximale de 160 mg/ml d'extrait étudié, par rapport au témoin positif (hémolyse totale).

En ce qui concerne l'effet de l'extrait n-butanol d'*Abies numidica* sur les globules rouges les résultats présentés dans la **Figure 34** montrent que cet extrait est plus moins toxique que l'extrait Acétate, l'hémolyse maximale estimée à 23,9% avec une concentration finale de 160 mg/ml. En revanche cet extrait présente des taux d'hémolyse de (10%, 13%, 17%) pour les concentrations (10, 20, 40 mg/ml respectivement), ces valeurs sont plus élevées que celle enregistré pour l'extrait Acétate d'éthyle dans les même concentrations (10, 20, 40 mg/ml).

Nous avons testé également la toxicité de l'extrait aqueux, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 35**. L'extrait aqueux a montré une légère activité hémolytique avec des pourcentages inférieurs à 8% à des concentrations de 10 mg/ml jusqu'à 80mg/ml. Le taux d'hémolyse est plus élevé (19.2%) à une concentration finale 160mg/ml. Donc l'extrait aqueux présente une très faible toxicité même à des concentrations élevées (80, 160 mg/ml) par rapport aux autres extraits des feuilles d'*Abies numidica* après une heure de contact avec les érythrocytes humains.

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

Les globules rouges ont été choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* à cause de leurs facilités d'isolement et leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire [196].

Les propriétés hémolytiques d'un agent sont attribuables à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ce qui induit à une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions : entrée de Na<sup>+</sup> et H<sub>2</sub>O, sortie de K<sup>+</sup>, la membrane éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine [197].

L'analyse biologique sur l'influence de 3 extraits des feuilles d'*Abies numidica* réalisée *in vitro* sur des érythrocytes isolés du sang humain incubé dans un milieu tampon PBS à PH=7,4 a montré que pour le pourcentage d'effet hémolytique des extraits de plante augmente au cours du temps en fonction de la concentration. L'hémolyse maximale (38.1%) est obtenue avec l'extrait acétate d'éthyle à la concentration 160 mg/ml. Cet extrait à 160 mg/ml est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, à une concentration maximale de 160mg/ml l'extrait n-butanol et aqueux présentent un taux d'hémolyse de (23.9%,19.2% respectivement). Ces extraits sont plus ou moins toxiques que l'extrait acétate.

Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes doses ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets indésirables, voire nocifs. La cytotoxicité des feuilles d'*Abies numidica* à une concentration très élevée sur les globules rouges est probablement due à la richesse de cette plante des flavonoïdes et des tanins et saponosides [198].

Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses. Il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie surtout pour les modes d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.). De même l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait est nécessaire pour situer les limites de tolérance de la plante et éviter l'hémolyse [198].

Vu que les saponines aussi sont des composants terpéniques, l'effet hémolytique de cette plante peut être expliqué, aussi par la présence de ces molécules, qui ont la capacité d'induire la formation de pores à travers les membranes cellulaires, entraînant l'hémolyse et la libération de l'hémoglobine dans le plasma [199].



# *Conclusion*

L'Algérie présente un patrimoine végétal important par sa richesse et sa biodiversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes. Cette richesse floristique est considérable et comporte des milliers d'espèces de plantes qui présentent divers intérêts médicaux et autres. Les plantes médicinales font l'objet des recherches scientifiques en vue de les valoriser comme source de substances naturelles bioactives.

Au terme de ce travail visant à étudier les activités antifongique et hémolytique des extraits des feuilles de la plante endémique algérienne *Abies numidica* préparé par macération. Il ressort que cette plante possède des vertus pouvant justifier leur utilisation en médecine traditionnelle.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que le rendement des extraits des feuilles d'*Abies numidica* récoltée dans la région de Sétif, calculé en fonction du matériel végétal sec varie de 0.35% à 2.549%, incluant extrait aqueux (1.6%), acétate d'éthyle (0.35%) et n-butanol (2.549%).

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence que les feuilles d'*Abies numidica* sont très riches en tanins, flavonoïdes et saponosides, elle contient aussi les composés réducteurs, les anthocyanes, les terpénoïdes et les stérols.

L'analyse quantitative des extraits hydroalcooliques par dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes réalisés selon la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement, a révélé des teneurs importantes. Les résultats indiquent que l'extrait acétate d'éthyle préparé par possède un teneur plus élevée en polyphénols totaux (490,76 µg EAG/ml), et en flavonoïdes (143,19µg EQ/ml) en comparaison avec les autres extraits.

Par ailleurs, l'activité antifongique des différents extraits (acétate éthyle, n-butanol, aqueux) est testée vis-à-vis le champignon pathogène *fusarium oxysporum* par la méthode de contact directe sur milieu gélosé et la détermination de taux d'inhibition. Nous avons noté que la variation de taux d'inhibition est en fonction de nombreux facteurs, notamment la nature et la concentration de l'extrait. Le pourcentage d'inhibition maximal est obtenu avec l'extrait acétate d'éthyle (28.57%), suivi par l'extrait

aqueux (17.76 %), puis l'extrait n-butanol (16.77 %). L'extrait acétate donc est le plus active sur la souche pathogène testé.

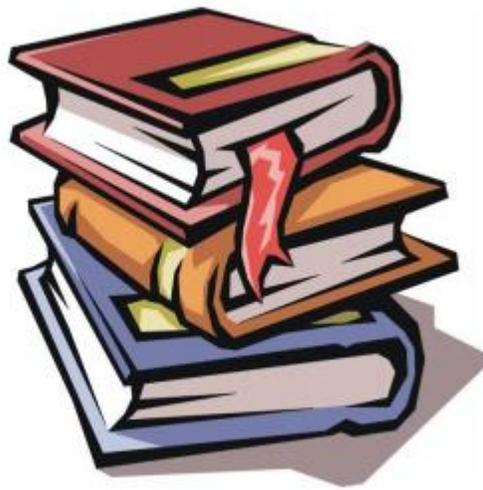
L'extrait acétate, l'extrait n-butanol et aqueux sont sélectionnés pour évaluer l'activité hémolytique d'*Abies numidica* vis-à-vis les globules rouges humains dans le but d'étudier la cytotoxicité de cette plante. Les résultats montrent que le pourcentage d'effet hémolytique augmente en fonction du temps et de concentration d'extrait, le taux maximal (38,1%) est obtenu avec l'extrait acétate à une concentration de 160 mg/ml et cet extrait est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis les érythrocytes humains, comparés aux autres extraits (n-butanol, aqueux) qui présentent un taux d'hémolyse de (23.9%,19.2% respectivement). Ces extraits sont plus moins toxiques que l'extrait acétate.

En générale, on peut conclure que notre plante est riche en métabolites secondaires ce qui les confère une valeur thérapeutique et médicinale importante, mais cette étude reste préliminaire et pas indicative sur le mécanisme réel par lesquelles agit cette plante, et elle ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement actives.

C'est pour cela il est intéressant d'approfondir cette étude par :

- ❖ Savoir quelle molécule qui a le principe actif parmi ces polyphénols et essayer l'isoler.
- ❖ Identification et caractérisation de la molécule par les méthodes d'analyse (RMN, Spectrophotomètre de masse).
- ❖ Evaluer les expérimentations *in vivo*, sur un modèle animal.
- ❖ Elargir le panel des activités biologiques *in vitro* et *in vivo*, et pourquoi pas réalisés d'autres tests biologiques : antidiabétique, anticancéreuse et anti-inflammatoire.
- ❖ Etude de la toxicité aigüe et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

# *Références bibliographiques*



- [1] Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R., Ramdani, M., Djellouli, Y., and Alatou, D. 2012. Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'Sila, Algérie). *Phytothérapie*. 10:131-141.
- [2] Gaussen, H., Leroy, H. F., 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs. Masson. Paris. 426.
- [3] Belbache, H., 2012. Investigation Phytochimique de l'extrait Chloroforme de *Centaurea Parviflora* Desf. Mémoire de master : chimie organique. Université Mentouri Constantine.
- [4] Jeun, J. M., Annie, F., and Chrystian. J. L., 2005. Les composés phénoliques des végétaux, 203- 204.
- [5] Curtin M. E. 1983. Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnol.*, 1, 649-657.
- [6] White R.L., Burgess D.S., Manduru M., and Bosso J.A., 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 40, 1914–1918.
- [7] Dayisoğlu, K.S., Duman, A.D., Alma, M.H., and Digrak, M. 2009. Antimicrobial activity of the essential oils of rosin from cones of *Abies cilicica* subsp. *cilicica*. *African Journal of Biotechnology*, 8: 5021-5024.
- [8] Lee, J.H., Hong, S.K. 2009. Comparative analysis of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 372-377.
- [9] Kizil, M., Kizil, G., Yavuz, M., and Aytakin, C. 2002. Antimicrobial activity of rosins obtained from the roots and stems of *Cedrus libani* and *Abies cilicica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38: 144-146.
- [10] Digrak, M., Alma, M.H., and Ilcim, A. 1999. Antibacterial and antifungal effects of various commercial plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 37: 216-220.
- [11] Bağcı, E., Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Babaç, T., and Çelik, S. 1999. Study of the essential oil composition of two subspecies of *Abies cilicica* (Ant. et Kotschy) Carr. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 47-49.
- [12] Liu, T.S., 1979. A monograph of the genus *Abies*. Dep of For Colleg. of National Taiwan Univ, 508P.
- [13] Liu, T., 1971. A Monograph of the Genus *Abies*. Department of Forestry, College of Agriculture,

National Taiwan University.

[14] **Parducci, L., Szmidt, A.E., Madaghiele, A., Anzidei, M., and Vendramin, A., 2001.** Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theor Appl Genet.* 102:733-740.

[15] **Quezel, P., 1998.** Diversité et répartition des sapins sur le pourtour méditerranéen. *Forêt méditerranéenne.* 19 (2) : 93-104.

[16] **Jose, M., Sánchez-Robles., Francisco Balao, b., Anass Terrab, Juan, L., García-Castaño., María, A., Ortiz, Errol Vela, c., and Salvador Talavera., 2014.** Phylogéographie SW fi Méditerranée rs. Différentes origines européennes pour le Nord de l'Afrique *Abies* espèce, *Moléculaire Phylogenetics et Evolution.* 79 (2014), 42-53.

[17] **Alizoti, P.G., Fady, B., Prada, M.A., and Vendramin, G.G., 2011.** Euforgen technical guidelines for genetic conservation and use of Mediterranean firs (*Abies* spp.). *Bioersivity International, Rome,* p 6.

[18] **Barbey, A., 1934.** Une relique de la sapinière méditerranéenne : Les monts Babors. *Librairie Agricole de la maison rustique, Paris.* (1-11).

[19] **Vela, E., and Benhouhou, S., 2007.** Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *C. R. Biologies.* 330 : 589-605.

[20] **Kolai, L., 1986.** La sapinière d'*Abies numidica* dans les monts Babors. *Ann. Rech. For, INRF Bainem (Algérie).* 85-97.

[21] **Nailli, O., 2016.** Effet des extraits de *Abies numidica* de Lannoy sur la croissance et sur la microflore caecale et fécale des poussins de chair, Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1. 133p.

[22] **Actualités du pays des Babors. Sapin de Kabylie, sapin de l'Algérie, sapin de Babors.** Disponible en ligne sur : <http://www.jijel-echo.com/Sapin-de-kabylie-Sapin-d-algerie> (consulté le 14/03/2019)

[23] **Tlili Ait Kaki, Y., Bennadja, S.,and Abdelghani, D., 2013.** The Therapeutic Importance of Products Extracted from the Fir Tree of Numidia (*Abies numidica*) and Research on its Antibacterial Activity. *Kastamonu Univ., J. Forest. Fac. Special Issue:* 279-282.

[24] **Maire, R., 1952.** Flore de l'Afrique du nord. Université d'Alger., *Encyclopédie biologique.* (371) 132 p.

[25] **Quezel, P., and Santa, S., 1962-1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *C.N.R.S. Paris.* 1170 p.

- [26] Vishnoi, S.P., Ghosh, A.K., Debnath, B., Samanta, S., Gayen, S., and Jha, T., 2007. Antibacterial activity of *Abies webianna*. *Fitoterapia*. 78:153–155.
- [27] Kim, H.J., Choi, E.H., and Lee, I.S., 2004. Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*. *Phytochemistry*. 65: 2545– 2549.
- [28] Singh, R.K., Bhattacharya, S.K., and Acharya, S.B., 2000. Pharmacological activity of *Abies pindrow*. *J, Ethnopharmacol*. 73 :47–51.
- [29] Aoyama, M., and Doi, S., 1992. Antifungal activities of wood extractives of todomatsu, *Abies sachalinensis* Masters against pathogenic fungi causing turfgrass diseases. *Mokuzai Gakkaishi*. 38:101–105.
- [30] Nayak, S.S., Ghosh, A.K., Srikanth, K., Debnath, B., and Jha, T., 2003. Antitussive activity of *Abies webbiana* Lindl. leaf extract against sulphur dioxide-induced cough reflex in mice, *Phytother Res*. 17:930–932.
- [31] Nayak, S.S., Ghosh, A.K., Debnath, B., Vishnoi, S.P., and Jha, T., 2004. Synergistic effect of methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J, Ethnopharmacol*. 93:397–402.
- [32] Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., and Takaishi, Y., 1995. Traditional medicine in Turkey. VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions, *Econ Bot*. 49:406–422.
- [33] Belhaj Mostafa, M., Abedini, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Gangloff, S.C., Kabouche, A., and Kabouche, Z., 2016. Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* de lannoy ex carrier (*Pinaceae*) and *in vitro* evaluation of their antimicrobial properties. *Natural Product Research* .1478-6419.
- [34] Ghedbane, M., Bounar, R., Khellaf, R., Medjekal, Samir. Belhadj, H., Benderradji, L., Smaili, T., and Harzallah, D., 2016. Antioxidant and antimicrobial activities of endemic tree *Abies numidica* growing in Babor Mountains from Algéria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*. 2277-4289.
- [35] Halmi, S., 2015. Etude botanique et phytochimique: Approche biologique et pharmacologique d'Opuntia ficus indica, These de doctorat.
- [36] Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., and Biro, L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 47(1-4), 119-125.
- [37] Brunton, J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>éd</sup>, Tec&Doc, lavoisier. Paris.

- [38] **Pandey, K.B., and Rizvi, S.I., 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. P 270-278.
- [39] **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques et Documentation. Lavoisier. Paris. 1120p.
- [40] **Perret, C., 2001.** Analyses de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cygne Pers.* Thèse pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences, Neuchâtel, Université de Neuchâtel- Institut de chimie. 1035–1042.
- [41] **Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., and Yu, and O., 2005.** Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. *Plant Physiology*. 137(4): 1375-1388.
- [42] **Stalikas, C.D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007. 30, 3268–3295.
- [43] **Nijveldt, R.J., Nood, E.V., Hoorn, D., Boelens, P., Norren, K., and Leeuwen, P., 2001.** Flavonoids, a review of probable mechanisms of action and potential application. *American Society for Clinical Nutrition*. 74: 418-425.
- [44] **Batra, P., and Sharma, A.K., 2013.** Anti-cancer potential of flavonoids, recent trends and future perspectives. 3(6): 439-459.
- [45] **Ebadi, M., 2001.** Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. CRC Pres LLC.
- [46] **Ghedira, k., 2005.** Les flavonoïdes. Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 3(4) : 162-169.
- [47] **Massimo, A., Carmela, F., Roberta, D.B., Raffaella, G., Claudio, G., and Roberta, M., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 43: 348-361.
- [48] **Malešev, D., and Kunti, V., 2007.** Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of Serbian*.
- [49] **Berthod, A., Billardello, B., and Geoffroy, S., 1999.** Polyphenols in countercurrent chromatography. An exemple of large scale separational analysis. *EDP sciences, Wiley-VCH*. 27, 750-75.
- [50] **Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, O., and Iwatsuki, K., 2001.** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*jac. 48 (4): 487-491.
- [51] **Cowan, 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinicalmicrobioloyreviews*. 12(4) :564-570.

- [52] **Reed, J.D., 1995.** Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal and science.* 73: 1516-1528.
- [53] **Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., and Nacro, M., 2010.** Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du Burkina Faso. *Journal des sciences,* 10 : 24.
- [54] **Muanda, F.N., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat université Paul Verlaine-Metz.
- [55] **Ali-dellile, L., 2013.** Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Edition Alger. 6-11.
- [56] **Tondi, G., Schnabel, T., Wieland, S., and Petutschnigg, A., 2013.** Surface properties of tannin treated wood during natural and artificial weathering. *Int. Wood Prod. J.* 4, 150–157.
- [57] **Pizzi, A., and Cameron, F.A., 1986.** Flavonoid, tannins, structural wood components for drought-resistance mechanisms of plants. *Wood Sci. Technol.* 20, 119–124.
- [58] **Haslam, E., 1994.** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* p11, 41-66.
- [59] **Clifford, M., and Scalbert, A., 2000.** Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Sei. Food Agric.* 80: 1118-1125.
- [60] **Santos-Buelga, C., and Scalbert, A., 2000.** Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Jornal of Sei. Food Agric.* 80 :1094-1117.
- [61] **O'Connell, J.E., Fox, and P.F., 2001.** Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products. *International Dairy Journal.* 11(3) : 103-120.
- [62] **Ribéreau-Gayon, P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris. Pp : 173-201.
- [63] **Hopkins, W.G., 2003.** *Physiologie végétale.* 2<sup>ème</sup> édition américaine, de Boeck et Lancier S.A, Paris : 514.
- [64] **Allal, A., 2016.** Etude phytochimique et activités antioxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen : Psoralebituminosal. Mémoire de master. Chimie. Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid. Algérie. Page :16.
- [65] **Gavot, A., 2009.** Support des cours sur les métabolites secondaires. Université de Rennes.1-L2. U2 PHR.
- [66] **Holderness, J., Hedges, J.F., Daughenbaugh, K., Kimmel, E., Graff, J., Freedman, B., Jutila, and M.A., 2008.** Response of  $\gamma$   $\delta$  T Cells to Plant-Derived Tannins. *Critical Reviews in Immunology.* Pages 377-402.

- [67] Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., and Fujisawa, S., 2005. Molecular requirements of lignin carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*. 66 (17): 2108-2120.
- [68] O'Kennedy, R., and Thomes, R.D., 1997. *Coumarins: biology, application and mode of action*. New York.
- [69] Alignan, M., 2006. Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse. France.
- [70] Harkati, B., 2011. Valorisation et identification structurales des principes actifs de la famille Asteraceae. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.
- [71] Hoffman, L., 2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg. 245p.
- [72] Ochockda, R.J., Rajzer, D., Kowalski., and Lamparczyk, H., 1995. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*. p709, 197- 202.
- [73] Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., and Okazaki, M., 2000. Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*. P151, 153-161.
- [74] Ojala, T., Rames, S., Haansu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., and Vuorela, P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*. p73, 299-305.
- [75] Chen, C.N., Weng, M.S., Wu, C., and Lin, J.k., 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells. *Food Chemistry*, 1(2):175 185.
- [76] Khan, I., Kulkari, M.V., Gopal, M., and Shahabuddin., 2005. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. p15, 3584 3587.
- [77] Thati, B., Noble, A., Rowan, R., Creaven, S.B., Walsh, M., Egan, d., and Kavanagh, K., 2007. Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*. p21, 801-808.
- [78] Stefanova, T., Nikolova, N., Michailova, A., Mitov, I., Iancovii., Zlabinger, G.I., and Neychev, H., 2007. Enhanced resistance to *Salmonella enteric sero var typhimurium* infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*. p9, 7-14.

- [79] **KRIEF., S. 2003.** Surveillance Sanitaire et Observations de L'alimentation de Chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) En Ouganda Activités Biologiques et Etude Chimique de Plantes Consommées, thèse de Doctorat, Université .348P.
- [80] **Harborne, J.B., 1998.** Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Springer. Netherlands. 302p.
- [81] **Larousse. 2008.** Disponible sur: [www.Larousse.fr](http://www.Larousse.fr) (consulté le 15/04/2019).
- [82] **Janoussi, B., Romdhane, M., Abderraba, A., Ben Hassine, B., El Gadri, A., and Flavour Fragrance, J., 2005.** 20,274
- [83] **Klaas, C.A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R.D., Bomme, U., PAHL, H.L., and Merfort, I., 2002.** Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers, *Planta Med.* 68, 385-391.
- [84]
- [85] **Tyler, N.J., Gusta, L.V., and Fowler, D.B., 1981.** The influence of nitrogen, phosphorus and potassium on the cold acclimation of winter wheat (*Triticum aestivum* L). *Canadian Journal of Plant Science.* 61(4): 8.
- [86] **Grenby, T.H., 1991.** Intense sweeteners for the food industry: an overview. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 2–6.
- [87] **Kitagawa, I., 2002.** Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine, *Pure Appl. Chem.* 74, 1189–1198.
- [88] **Heng, L., Vincken, J.P., van Koningsveld, G.A., Legger, L., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., Roozen, J.P., and Voragen, A.G.J., 2006.** Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1225–1231.
- [89] **Lacaille-Dubois, M.A., and Wagner, H., 1996.** A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 2, 363–386.
- [90] **Lacaille-Dubois, M.A., 2005.** Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity. recent developments, In: Attar-ur-Rahman (Ed). *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32,209–246.
- [91] **Hostettmann, K., and Marston, A., 1995.** Chemistry and pharmacology of natural products, Saponins. Cambridge. Cambridge University Press.
- [92] **Hassan, S.M., Haq, A.U., Byrd, J.A., Berhow, M.A., Cartwright, A.L., and Bailey, C.A., 2010.** Hemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry.* 119, 600–605.

- [93] Sun, H., Chen, L., Wang, J., Wang, K., and Zhou, J., 2011. Structure, function relationship of the saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity. *International Immunopharmacology*. 11, 2047–2056.
- [94] Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., and Yoshikawa, M., 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry*. 381, 67–74.
- [95] Sparg, S.G., Light, M.E., and van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94(2–3), 219-243. 79-885.
- [96] Chwalek, M., Plé, K., and Voutquenne-Nazabadioko, L., 2004. Synthèse et l'activité hémolytique de certains diglycosides d'hédéragénine. *Chimiques et Pharmaceutical Bulletin*. 52, 965-971.
- [97] Attele, A.S., J.A., Wu, and C.S., Yuan. 1999. Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochem, Pharmacol*. 58: 1685–1693.
- [98] Augustin, J.M., Kuzina, V., Anderson, S.B., and Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 72, 435–457.
- [99] Kunkele, U., and Lobmeyer, T.R., 2007. *Plantes médicinales, Identification, Récolte, Propriétés et emplois*. Edition parragon Books. 33-318.
- [100] Wichtl, M., and Anton, R., 2009. *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Édition LAVOISIR, Paris : 38-41.
- [101] Pengelly, A., 2004. *Constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. CABI Pub.
- [102] Badiaga, M., 2011. *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II)*.
- [103] Bahorun, T., 1997. Substances Naturelles actives, La flore Mauricienne, Une source d'approvisionnement potentielle *Food and Agricultural Research .council Mauritis*, 83-94.
- [104] Bouanani, S., Henchiri ,C., Migianu-Griffoni, E., Aouf ,N., and Lecouvey ,M., 2010. Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in expérimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 129(1), 38-45.
- [105] Cottiglia, F., Loy ,G., Garau, D., Fions ,C., Caus ,M., Pompei ,R., and Bonsignore ,L., 2008. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium L.* *Phytomedicine* ; 8, 302-305.

- [106] Younos ,C., Soulimani ,R., Seddiqi ,N., Baburi, O., and Dicko, A., 2005. Etude ethnobotanique et historique des tamaris (*Tamarix sp.*, tamaricaceae) et leurs usages actuels en Afghanistan. *Phytothérapie*, 6, 248-251.
- [107] Kabera, J. N., Kakana, P., Bigendako, M., and Tomani, J.C., 2000. Centre de Recherche en Phytomédicaments et Sciences de la Vie de l'IRST A la recherche des composés bioactifs à base de plantes : cas du RWANDJA. *Lebanese Science Journal*, Vol.14, No.2.
- [108] El-Shazli, A.M., Dora, G., and Wink, M., 2005. Alkaloid of *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss. (Chenopodiaceae). *Pharmazie* ; 60(12), 949-52.
- [109] Dohou, N., Yamni, K.,Tahrouch, S., Hassani, L.M., BADOUC, A., and Gmira,N.,2003. Phytochemical screening of an ibero-moroccan endemic, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, 61-78.
- [110] Boual, Z., Kemassi, A., Oudjana, H.A., Michaud, P., and Didi, E., 2013. Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *malva parviflora* I. (malvaceae): activité prébiotique. Université Kasdi Merbah- Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semiarides, 41.
- [111] Belloum, M., Bouheroum, F., Benayache, H., and Benayache, S., 2013. Secondary metabolites from the aerial part of *Inula crithmoides*. *Chemistry of Natural Compounds*; 17(5): 54-61.
- [112] Chaudhri, M., Paronychia, C., and Murbeck, S., 1988. *Chlorothyrsa* (Caryophyllaceae) in the Iberian Peninsula. *Anales del Jardin Botanico de Madrid* ; 45(1), 361.
- [113] Meddour, A., Yahial, M., Benkiki,N .,Ayachi, A., 2013. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* I. *Lebanese Science Journal* ; Vol. 14, No. 1, 49.
- [114] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Fungi> (consulté le 06/04/2019).
- [115] Quillien,J.F., 2002.Les mycotoxine In “programme 5th Framework Programme under the Quality of Life and Management of Living Resources,key Action 1”.Paris: INRA.24p.
- [116] Delahaye, N. F., Rusakiewicz, S., Martins, I., Ménard, C., Roux, S., Lyonnet, L., Minard-Colin, V. 2011. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine*, 17(6), 700.
- [117] Cahagnier, B., Richard-Molard, D., 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. *Tec & Doc, Paris*, 140-158.

- [118] Benhamou, N., Rey P., Cherif, M., Hockenhull J., Tirilly, Y., 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici*. *Phytopathology* 87,108–121.
- [119] Trenholm, H. L., Prelusky, D. B., Young, J. C. and Miller, J. D., 1988. « Reducing Mycotoxins in Animal Feed », Publication 1827E, No. A63-1827/1988E, Agriculture Canada Ottawa, p 22.
- [120] Burgess, J.W., 1981. Development of social spacing in normal and mentally retarded children. *Journal of Nonverbal Behavior*, 6(2), 89-95.
- [121] Muhammed, M., Anagnostou, T., Desalermos, A., Kourkoumpetis, T. K., Carneiro, H. A., Glavis-Bloom, J., & Mylonakis, E. 2013. *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine*, 92(6), 305.
- [122] Nucci, M., Anaissie, E., 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695-704.
- [123] Massiaen, C.M., Cassini, R., 1981. Taxonomy of *Fusarium*. In " *Fusarium*; Disease , Biology and Taxonomy". Pennsylvania State University Park, 427-445.
- [124] Henni, J.E., 1998. Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran, 171.
- [125] Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. In: P.E. Nelson, T.A. Tousson and R.J. Cook (Eds), *Fusarium : Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 391-399.
- [126] Burnett, J.H., 1984. Aspect of *Fusarium* genetics. In " The Applied Mycology of *Fusarium* "(Moss M.O. Et Smith J.E., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 39-69.
- [127] Windels, C.E., 1992. *Fusarium*. In "Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi "(Singleton L.L, J.D.M et Rush C.M., eds), American Phytopathological Society Press, St. Paul, 115-128.
- [128] Tivoli, B., 1988. Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement. *Agronomie*, 8(3) :211-222.
- [129] Komi, A., 1993. Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum f.sp.vasinfestum* (ATK)SN. Et H : Agent de la Fusariose du colporteur. Thèse de doctorat d'état. Université de Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc.

- [130] **Messiaen, C.M., R, Cassini., 1968.** Recherche sur les fusarioses.IV-la systématique *Fusarium*.Ann.Epiphyt.19,387-454.
- [131] **Nelson, P., 1991.** History of *Fusarium* systematic. Phytopathology, 81: 1045 – 1048.
- [132] **Gray ., 1988.** Report on plant pathology: Wilt diseases of pea, RPD No.912
- [133] **Senthilkumar, G., Madhanraj, P., Panneerselvam, A., 2011.** Studies on saprophytic survival of *Fusarium oxysporum* using precolonized paddy straw bits.J. Nat. Prod. Plant Resour. 1(3): 15-19.
- [134] **Booth,C., 1971.**The Genus *Fusarium*, Common wealth Mycological Institute,Kew,Surrey,England.237.
- [135] **Amir, H., Amir, A., 1988.** Les relations plante-sol-microflore dans le déterminisme du Bayoud. Table ronde sur le Bayoud, Alger, 19- 20.
- [136] **Smith, H.C., 1965.**The morphology of *Verticillium albo-atrum*,dahlia,and *V.tricopus*.New Zealand J.Agric.Res.8:450-478.
- [137] **El Mahdjoub, M., 1972.**Etude des relations hôte parasite dans le cas trachéomycoses. I.N.R.A.T. ARIANA ,17.
- [138] **Rahmania, F., 1988.**Histopathologie : Relation hôte-parasite. Table ronde sur le Bayoud, Alger, INRAA-Beraki,19-20.
- [139] **Darles, B., 2013.** Évaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle, pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*. Rapport de stage, « Bioingénierie » option Biotechnologie végétales, Université Paul Sabatier, Toulouse, 35.
- [140] **Grewal, J.S., Pal, M. and Kulshrestha, D.D., 1974.** A new record of wilt of gram caused by *Fusarium solani*. Current Science, 43(23).
- [141] **Gupta, O.M., Kotasthane, S.R., 1978.** Efficacy of fungicidal seed treatment on pre-and post-emergence mortality in different varieties of Bengal Gram (*Cicer arietinum*).International chickpea newsletter, 6(32).
- [142] **Nene, Y.L., Haware M.P., Ready. M.,1979.** Diagnosis of some chickpea (*Cicer arietinum*). ICRISAT Information bulletin, 3: 1-44.
- [143] **Trapero-Casas, A., Jimenez-Diaz, R.M.,1985.** Fungal wilt and root rot disease of chickpea in southern Spain. Phytopathology. tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas, 76(5): 873-883.

- [144] **Hawar, M.P., 1988.** *Fusarium* wilt and other important diseases on chickpea. In the mediterranean area. Proceeding of international workshop on present status and future prospects on chickpea crop production and improvement mediterranean countries CIHEAM/EEC,AGRIMES/ICARDA, Zaragoza, Spain,11-13.
- [145] **Guillaume, L., 2007.** Elasticité de squelette de globules rouge humain-une étude en pince optique. Thèse de doctorat, université de paris 4, 17.
- [146] **Mohandas, N., Gallagher, P. G., 2008.** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948.
- [147] **Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C. and Cubas, P., 2007.** Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *The Plant Cell*, 19(2),458-472.
- [148] **Bain, J.B., 2004.** A Beginner's Guide to Blood Cells. 2ème Ed, Blackwell Publishing Ltd, London, 3.
- [149] **Mannargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pognas, J.L., Perrin, C., 2016.** Hemolysis by Surfactants. A review. *Advances in colloid and interface science*, 228:1-16.
- [150] **Dodge, J. T., Mitchell, C., & Hanahan, D. J., 1963.** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 100(1), 119-130.
- [151] **Bichis, M., Huber, A.R., 2000.** Les maladies héréditaires de la membrane érythrocytaire: du tableau clinique aux mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents. *Annales de biologie clinique*, 58 : 277 – 289.
- [152] **Elgsaeter, A., Stokke, B. T., Mikkelsen, A., Branton, D., 1986.** The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234(4781), 1217-1223.
- [153] **Jaureguierry, S., 2015.** Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisine, université pierre,54.
- [154] **Thomas, L., 2013.** Haemolysis as influence and interference factor. *EJIFCC* vol 13 n 4.
- [155] **Ucar, K., 2002.** Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncology*, 16(9 suppl 10):163-70.
- [156] **Marchand, A., Galen, R. S., Van Lente, F., 1980.** The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. *Jama*, 243(19), 1909-1911.
- [157] **Schaer, D.J., Buehler, P.W., Alayash, A.I., Belcher, J.D. and Vercellotti, G.M., 2013.** Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8),1276-1284.

- [158] Dahmani, S., Orliaguet, G.A., Meyer, P.G., Blanot, S., Renier, D., Carli, P.A., 2000. Perioperative blood salvage during surgical correction of craniosynostosis in infants. *British journal of anaesthesia*, 85(4),550-555.
- [159] Bossyt, X., Boeynaems, J.M., 2001. Louvain Garant Repères en Diagnostic de laboratoire ISBN 90-441-1022-5,30-31
- [160] Festus,B., Aguiah,V., 2006.Contribution à l'étude de l'Allo immunisation posttransfusionnelle chez les patients transfusés à Cotonou Bénin Université d'Abomey- Calavi (Bénin).
- [161] Beaumont, F., Hergaux, C., 2005.Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hépcidine, *Transfusion Clinique et Biologique*,23–130.
- [162] Rebar, A.H., 1991. Conduite Diagnostique en Médecine Canine des Carnivores Domestiques. Editée par FORD R B Edition du Point Vétérinaire, France,75,75-100.
- [163] Sanogo R, Maiga A, Diallo D. 2006. Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis*, *Stereospermum kunthianum* et *Trichilia emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. *Pharm Méd Trad Afr*. XIV:123–136.
- [164] Zhang, C., Rexrode, K.M., van Dam, R.M., Li, T.Y. and Hu, F.B., 2008. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality. *Circulation*, 117(13), pp.1658-1667.
- [165] Trease GE, Evans WC. 1987 A text book of Pharmacognosy. Tindal, Oxford: ELSB/Bailliere.
- [166] Cavé, A. 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales
- [167] Rizk, A. M. 1982. Constituents of plants growing in Qatar. I. a chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*.
- [168] Paris, D. T., & Hurd, F. K. 1969. *Basic electromagnetic theory*. McGraw-Hill Companies.
- [169] Debray, J., Krulik, M., & Giorgi, H .1971. Le purpura rhumatoïde de l'adulte (syndrome de Schoenlein-Henoch). A propos de 22 observations. *Semaine des Hôpitaux de Paris* 47: 1805-1819.
- [170] Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), pp.144-158.
- [171] Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M. and Böhm, V., 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), pp.992-999.
- [172] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M. and Ulubelen, A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), pp.816-822.

- [173] Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., and Liu, X., 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop. Protect.* 23, 243–247.
- [174] Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57 (3): 363–369.
- [175] Li, G.X. and Liu, Z.Q., 2008. The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and chemical toxicology*, 46(3), pp.886-892.
- [176] Cacace, J. E., & Mazza, G. 2000. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 5939-5946.
- [177] Hagerman, A., Harvey-Mueller, I., Makkar, H., 2000. Quantification of tannins in tree foliage—a laboratory manual. FAO/536 IAEA, Vienna. 537 : 4-7.
- [178] Rajalakshmi, P., Vadivel, V., Ravichandran, N., Sudha, V., Brindha, P., 2016. Pharmacognostic Evaluation of *Abies webbiana* Leaf: A Siddha Herbal Ingredient, *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, Vol 9, Issue 4,
- [179] Parkash, O., Kumar, D., Kumar, S. 2015. Screening of methanol extract and ethyl acetate fraction of *Abies webbiana* Lindl. For neuropharmacological activities. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 77(5), 536.
- [180] Vadivel, V., Anand, P., Manijkumar, S., Rajalakshmi, P., & Brindha, P. 2018. Chemical Fingerprints of an India Traditional Herbal Drug Talisapatra (*Abies webbiana*) and Comparison with English yew (*Taxus baccata*). *Int J Pharmcog Phytochem Res*, 10(2), 84-91.
- [181] Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*,(4). P 25-39 [187]
- [182] Macheix, J. J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C. 2005. *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- [183] Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. 2005. Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8492-8497.
- [184] Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S.J., Wheaton, W.D., Falkinham, J., Oberlies, N.H. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *21(12):1121-31.*

**[185] Verykokidou, Vand Voyo,E.C. 1986.**Methylated flavones from teucriumplolium.

*Plantamedica*, 5,343-432

**[186] Gupta, D., Bhardwaj, R., & Gupta, R. K. 2011.** In Vitro antioxidant activity of extracts from the leaves of *Abies pindrow* Royle. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(4).

**[187] Dubey, S., Saha,S.,Saraf, S.A.2015.** *in vitro*anti-cataract evaluation of standardised *Abies pindrow* leaf extract using isolated goat lenses. *Natural product research* , 29(12), 1145-1148.

**[188] Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull,J.,Feron,V.J.,Goodman,J.I.,Marnet,L.J.,Portoghese,P.S., Waddell,W.J.,Wagner,B.M.2005.** A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food chem.toxicol*, 43:345-363

**[189] Chabot, S., Bel-Rhlid, R., Chênevert, R. and Piché, Y. 1992.**Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoïd compounds under CO<sub>2</sub>-enriched condition. *New Phytol*; 122: 461-467.

**[190] Mori A., Nishino C., Enoki N. and Tawata S. 1987.**Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*;26: 2231-2234.

**[191] Morris, J.A., Khettry, A. and Seitz, E.W. 1997.** Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils.*J. Am. Oil Chem. Soc.*; 56: 595-603.

**[192] Yousef, R.T. and Tawil, G.G. 1980.**Antimicrobial activity of volatile oils.*Die Pharm.*; 35: 698- 701.

**[193] Bajpai, V.K., Rahman, A. and Kang, S.C. 2007.**Chemical composition and anti-fungal properties of the essentialoil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu.Ind. *Crop.Prod.*; 26: 28- 35.

**[194] Bagci,E .,and Digrak, M.,1996.**Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* species from turkey,*Flavour and Fragrance journal* 11(4),251-256.

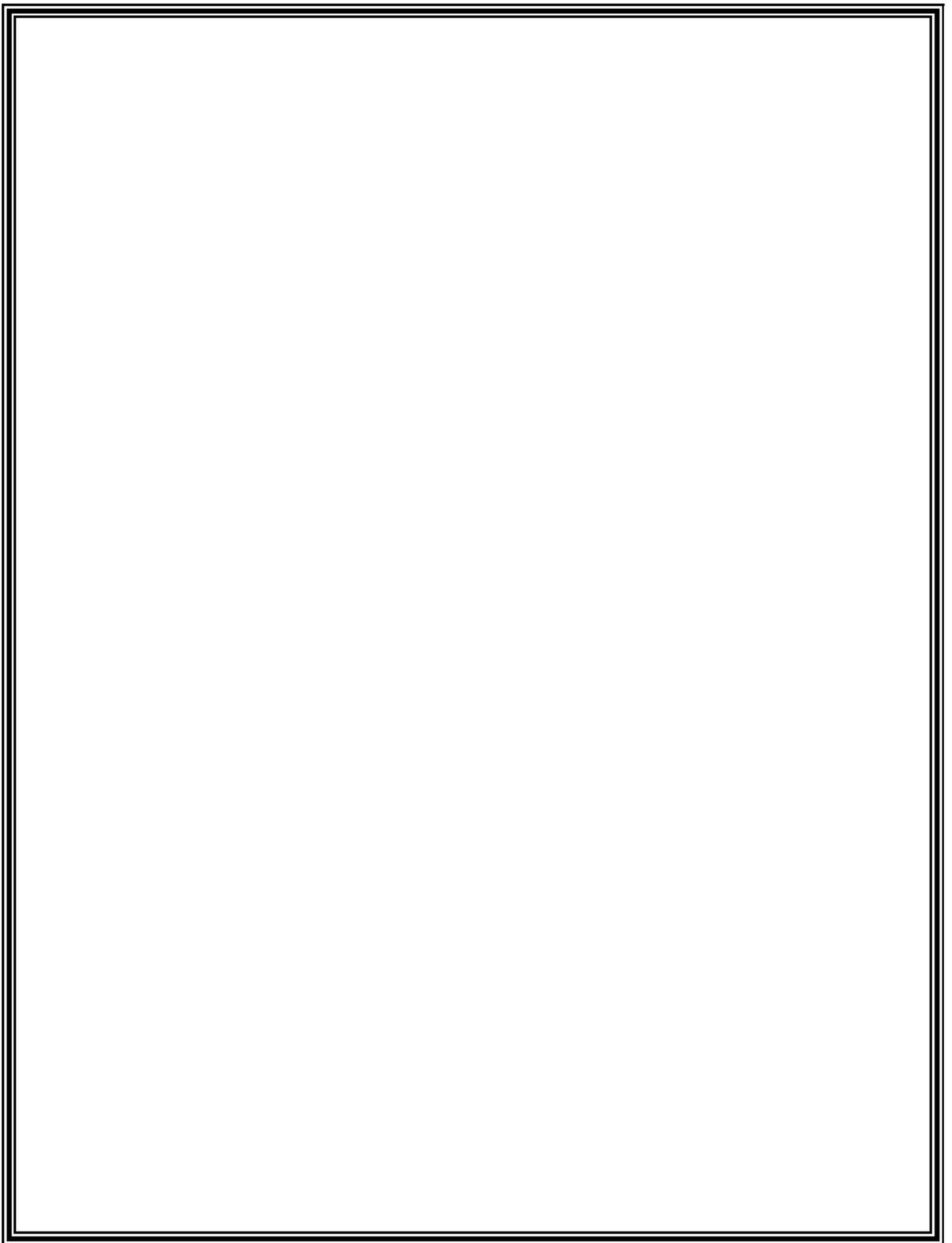
**[195] Saleh, B.,and Al-Mariri, A. 2016.** Antimicrobial activity of leaf and flowering cones of *Abies cilicica* ssp. *cilicica* (Pinaceae) crude extracts. *Herba Polonica*, 62(1), 55-65.

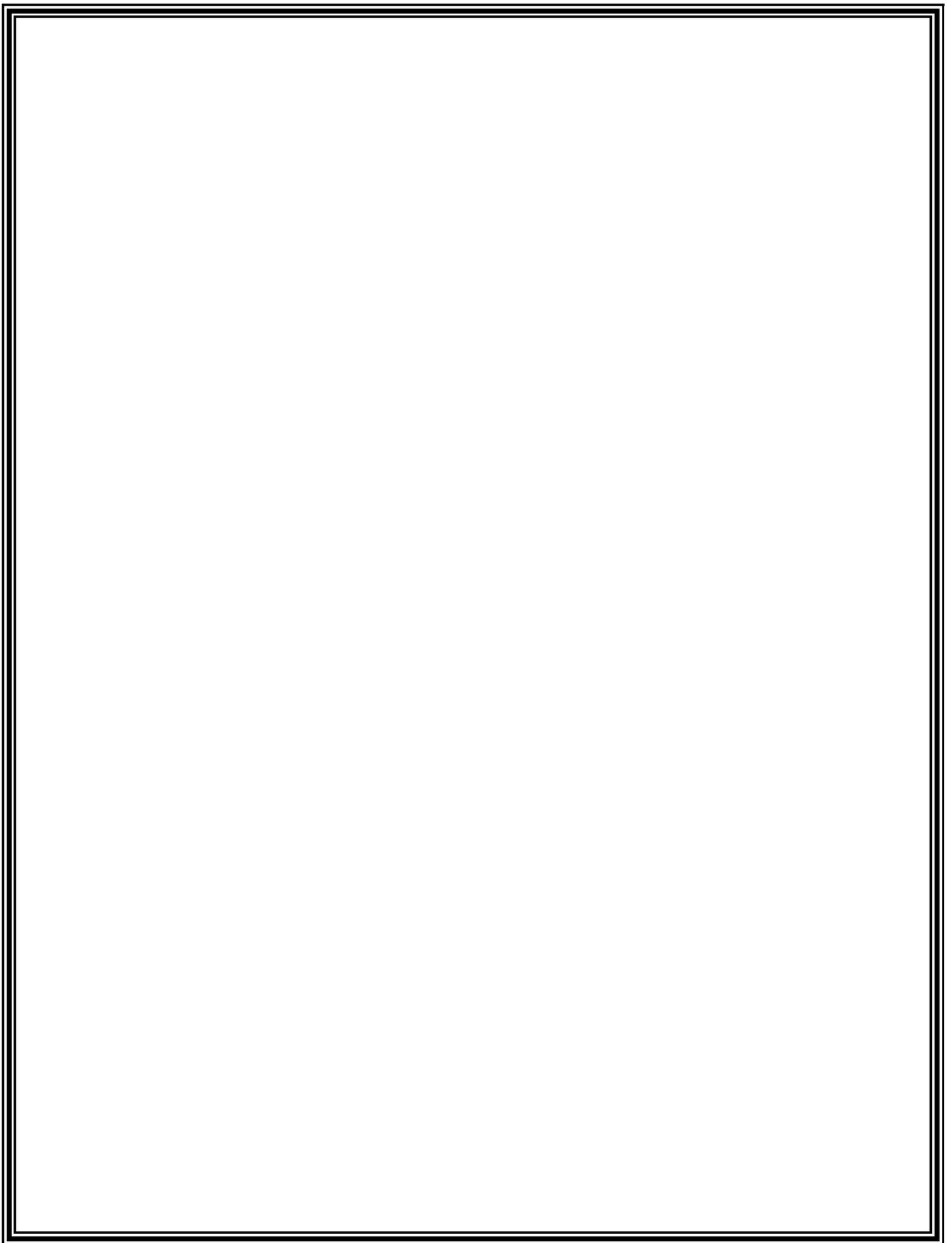
**[196] Wajeman, H., Lantz, B., and Girot, R., 1992.** Les maladies du globule rouge.2eme édition ; Paris : INSERM.

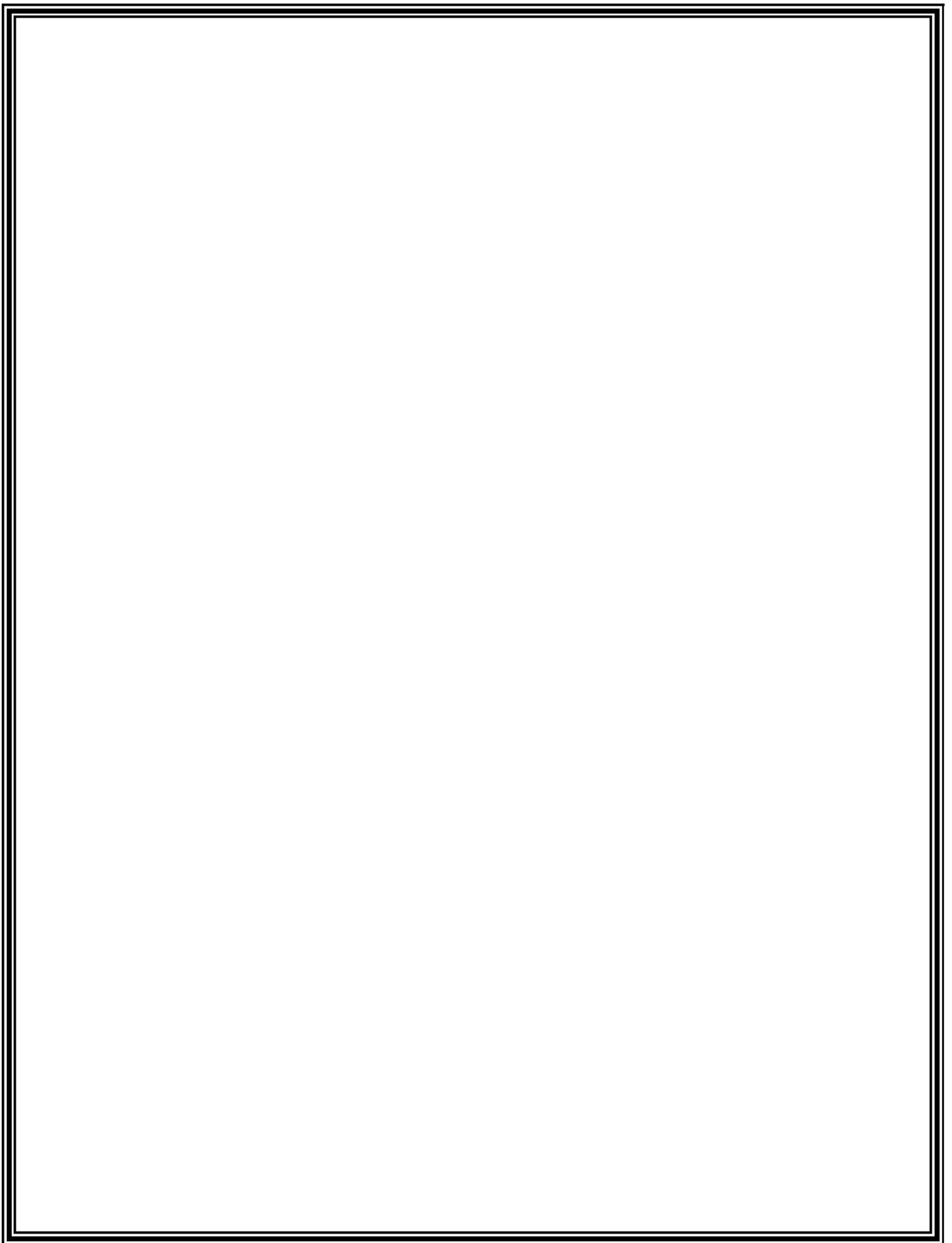
**[197] Majester-Sabornin, B., Elias,R., Diaz-Lanza,A.M.,Balansard,G., Gasquet, and Delmas, F.,1991.** Saponines of the ivy plant. *Hedera helix* and their leishmanicidic activity. *Planta Med.* 57,260-262.

**[198] Nacoulma ,O.,Ouedrago, Y.,Guissou, I., and Guede, G., 2001.**Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la Toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racine de *Mitragyna inermis* (Willd).O. (Rubiaceae) ;Faculté des sciences et technique, Université de Ouagadougou.

**[199] Makkar, H., and Becker, K., 1997.** Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumenmicrobes. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 243-245.





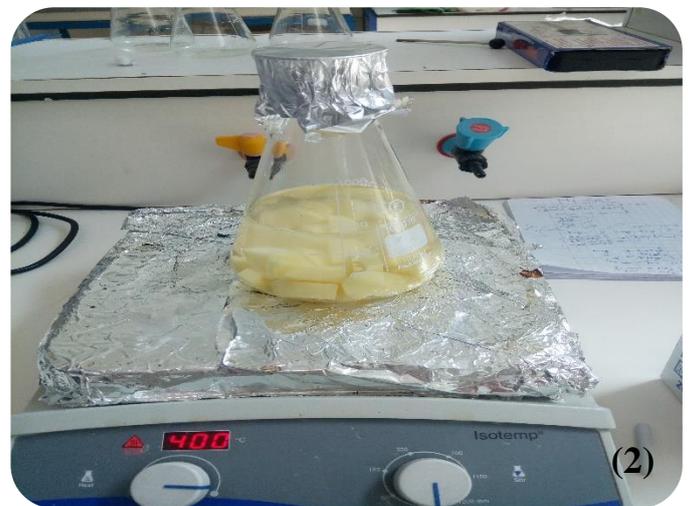
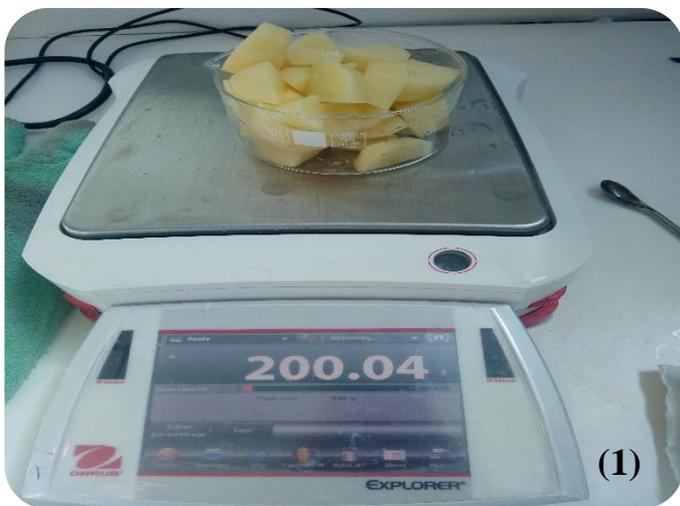


# *Annexes*

## Annexe N° 01 : Etapes de préparation de milieu PDA

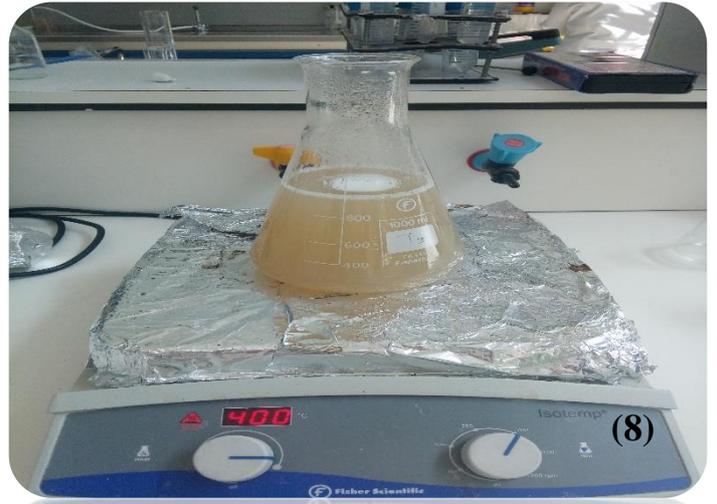
Ce milieu de culture a été préparé de la manière suivante.

L'infusion de pomme de terre a été préparée en faisant bouillir 200 g de tranches de pommes de terre (lavées) dans un litre d'eau pendant 15 à 20 minutes. Le mélange obtenu a été filtré, le filtrat du bouillon résultant est ensuite dilué avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final d'un litre. On y ajoute 20 g d'agar et 20 g de gélose sous forme de poudre. Le mélange a été versé dans des erlenmeyer avant d'être stériliser à l'autoclave à une température de 120 C° pendant 2 h 30 minutes.

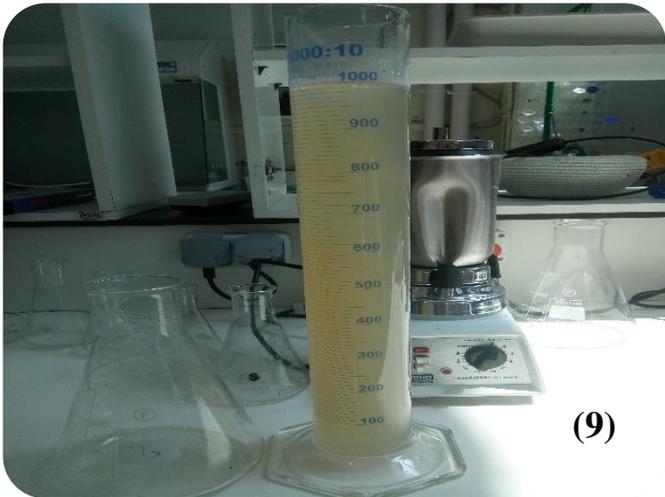




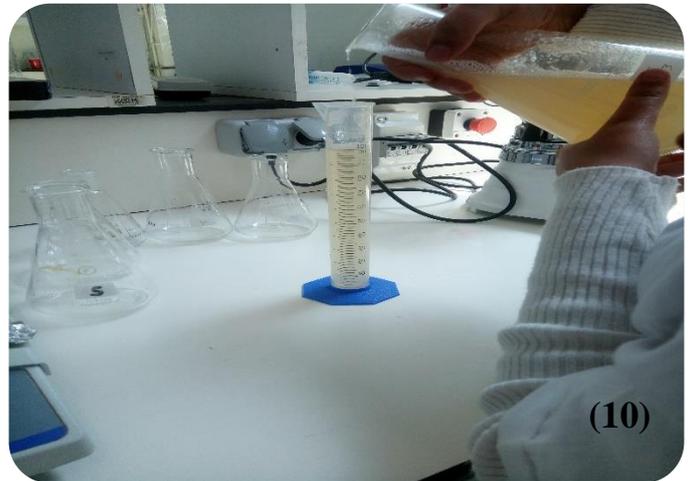
(7)



(8)



(9)



(10)

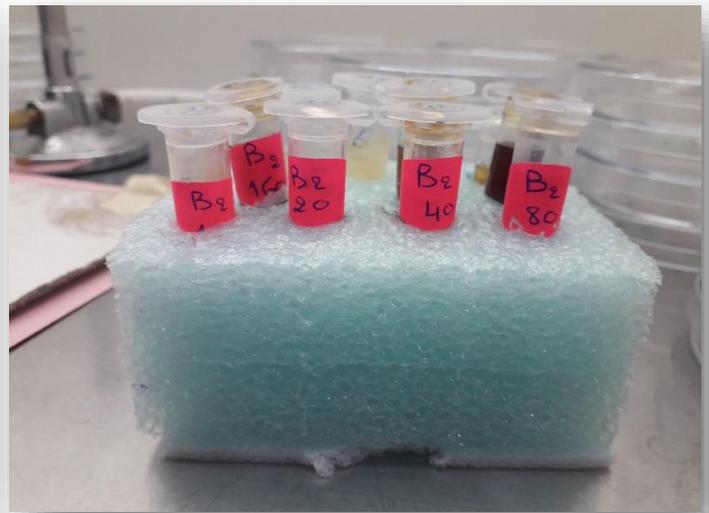
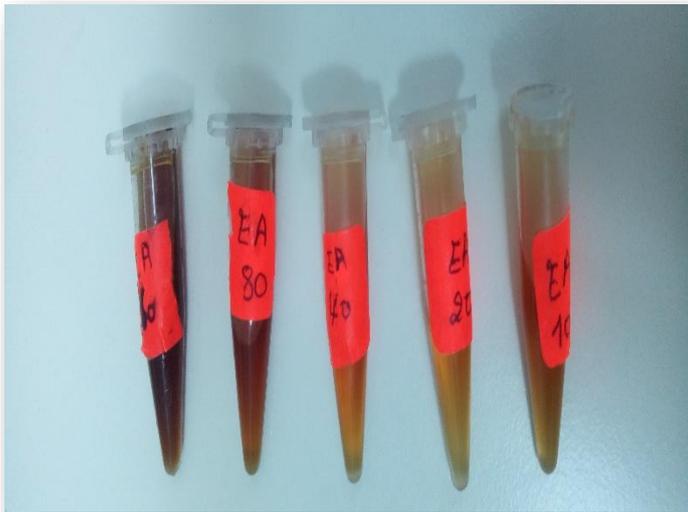


(11)



(12)

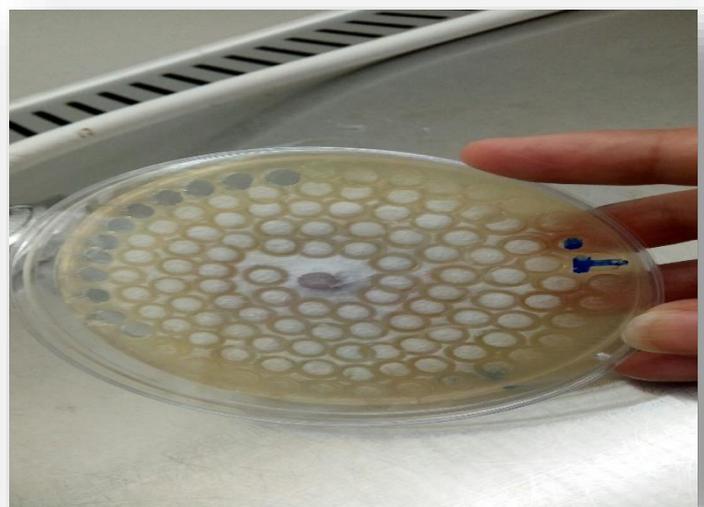
**Annexe N° 02 : Préparation des différents extraits testés**



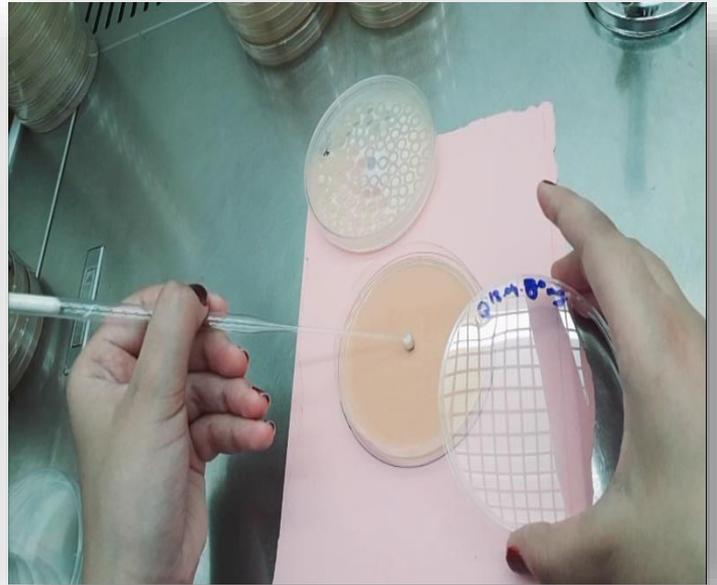
**Annexe N° 03 : écoulement des boîtes de pétri**



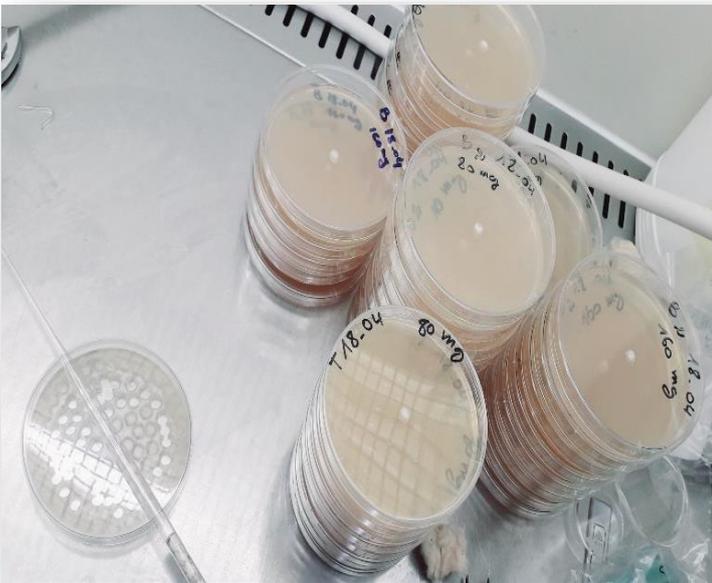
**Annexe N° 04 : Repiquage successif**



**Annexe N° 05 : Dépôt des disques mycéliens**



**Annexe N° 06 : Les boîtes avant et après incubation**



## Annexe N° 07 : Rotavapeur

Système de refroidissement

Ballon d'évaporation

Ballon de récupération

Bain marie



## Annexe N° 08 : Broyeur mécanique



## Annexe N° 09 : Ampoule à décanter + support



**Annexe N° 10 : Autoclave**



**Annexe N° 11 : Etuve**



**Annexe N° 12 : Centrifugeuse**



**Annexe N° 13 : Etuve**



**Annexe N° 14 : Spectrophotomètre**



**Annexe N° 15 : Balance**



**Annexe N° 16 : Agitateur**



**Annexe N° 17 : Vortex**



### Annexes N° 18 : Préparation de PBS (phosphate buffered saline)

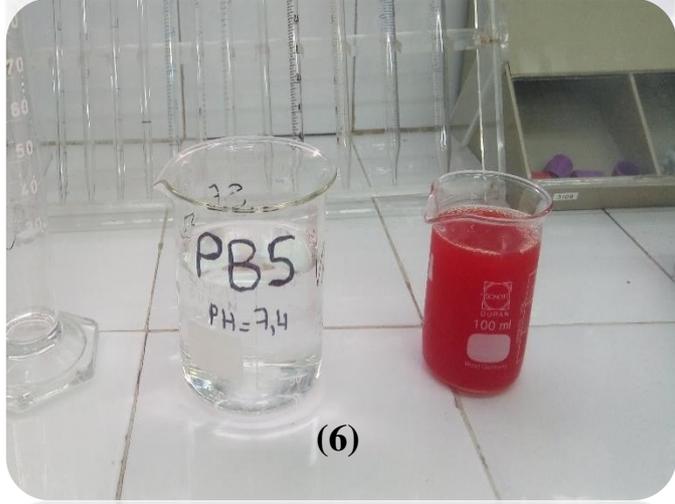
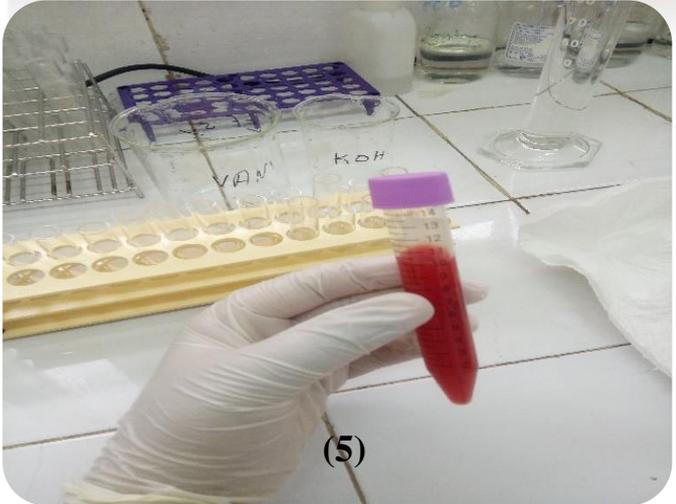
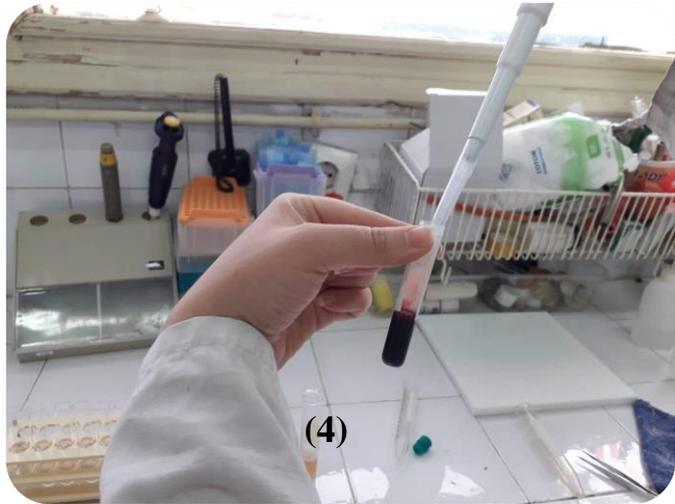
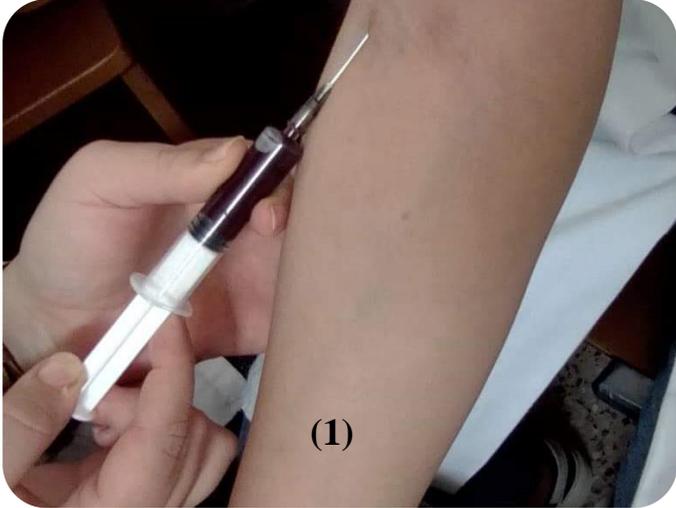
Nous avons préparé une solution tampon phosphate saline (PBS) à  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,02$  par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), KCl (2,7mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2mM)



### Annexe N° 19 : Préparation des extraits pour l'activité hémolytique



Annexe N° 20 : Préparation de la suspension érythrocytaire



**Annexe N° 21 : Evaluation de l'activité hémolytique**

**Tableau 01 :** Evolution des absorbances des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence d'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Abies numidica*, incubé à 37 C° durant 60 minutes à 548 nm.

Temps	T <sup>-</sup>	10mg/ml	20mg/ml	40mg/ml	80mg/ml	160mg/ml	HT
0 min	0.002	0.011	0.015	0.019	0.09	0.095	0.68
15 min	0.008	0.015	0.022	0.023	0.107	0.117	0.8
30 min	0.019	0.04	0.05	0.058	0.167	0.19	0.89
60 min	0.04	0.06	0.087	0.167	0.24	0.39	0.919

**Tableau 02 :** Evolution des absorbances des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence d'extrait n-butanol des feuilles d'*Abies numidica*, incubé à 37 C° durant 60 minutes à 548 nm.

Temps	T <sup>-</sup>	10mg/ml	20mg/ml	40mg/ml	80mg/ml	160mg/ml	HT
0 min	0.002	0.022	0.024	0.032	0.038	0.073	0.68
15 min	0.008	0.037	0.04	0.042	0.057	0.083	0.8
30 min	0.019	0.057	0.057	0.065	0.09	0.176	0.89
60 min	0.04	0.131	0.16	0.196	0.213	0.26	0.919

**Tableau 03 :** Evolution des absorbances des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence d'extrait aqueux des feuilles d'*Abies numidica*, incubé à 37 C° durant 60 minutes à 548 nm.

Temps	T <sup>-</sup>	10mg/ml	20mg/ml	40mg/ml	80mg/ml	160mg/ml	HT
0 min	0.002	0.01	0.012	0.015	0.041	0.043	0.68
15 min	0.008	0.015	0.019	0.034	0.08	0.084	0.8
30 min	0.019	0.022	0.034	0.052	0.094	0.107	0.89
60 min	0.04	0.054	0.08	0.099	0.107	0.216	0.919

**Tableau 04 :** Evolution de taux d'hémolyse (%) des différents extraits, après 60 min d'incubation par rapport à l'hémolyse totale.

	10 mg/ml	20 mg/ml	40 mg/ml	80 mg/ml	160 mg/ml
Acétate	2 %	5.30 %	13.80 %	21.70 %	38.10 %
N-butanol	10 %	13 %	17 %	18.80 %	23.90 %
Aqueux	2%	4.30 %	6.40 %	7.30 %	19.20 %

**Annexe N° 22 : Préparation des réactifs pour tests phytochimiques**

**Réactif de Mayer**

- **Solution A :** 1,35 g de chlorure de mercure  $HgCl_2$  sont dissous dans 60 ml d'eau distillé.
- **Solution B :** 5 g d'iode de potassium KI sont dissous dans 10 ml d'eau distillé

Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

**Réactif de Wagner**

2 g de KI et 1,27 g de I sont dissous dans 75 ml d'eau distillée, puis ajusté à 100 ml avec l'eau distillé.

**Liqueur de Fehling**

- **Solution A :** solution de sulfate de cuivre à 40 g/l.
- **Solution B :** 200 g de tartrate de potassium- sodium et 150 g de NaOH pour 1 litre d'eau distillé.

Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

**Année universitaire : 2018/2019**

**Présenté par : DENDANI Oumeïma  
SENGOUGA Chehinez**

**Thème :** Evaluation de l'activité antifongique et hémolytique  
des extraits acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux des feuilles  
d'*Abies numidica*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2 en Biochimie  
**Option :** Biochimie Appliquée

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique et biologique de 3 extraits des feuilles d'une plante médicinale, endémique, algérienne *Abies numidica*. L'étude phytochimique réalisée sur les 3 extraits (acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux) préparés par macération a permis de mettre en évidence la richesse de cette plante en métabolites secondaires notamment les tannins, les flavonoïdes, les saponosides, les composés réducteurs. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a montré que l'extrait acétate d'éthyle a une teneur plus élevée en polyphénols totaux (490,76 µg EAG/ml), et en flavonoïdes (143,19 µg EQ/ml) en comparaison avec les autres extraits.

Partant de ces données nous sommes intéressés à l'étude biologique et l'évaluation de deux activités biologiques de cette plante. Dans premier temps nous avons étudiés l'activité antifongique d'*Abies numidica* sur la souche *Fusarium oxysporum*, ce test est réalisé par la méthode de contacte directe dans un milieu gélosé avec différentes concentrations d'extrait. Les résultats de l'activité antifongique montrent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus actif sur la souche testée avec un indice d'inhibition de 28 ;57 % dans la concentration de 160 mg/ml. D'autre part nous avons étudié la cytotoxicité de cette plante on a évalué l'activité hémolytique des extraits in vitro vis-à-vis les globules rouges humains. Les résultats montrent que cette plante possède un faible effet toxique sur les érythrocytes humains. L'effet hémolytique maximal est obtenu avec l'extrait acétate (38.1%).

**Mots clés :** *Abies numidica*, métabolites secondaire, activité antifongique, activité hémolytique, *Fusarium oxysporum*, Globules rouges

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Frères Mentouri Constantine 1 et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT)

**Devant le jury :**

**Président du jury :** KHELIFI Douadi (Professeur- ENSB).

**Encadrante :** BELLIL Inés (Maitre de Conférences- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** MOSBAH Asma (Maitre de Conférences- UFM Constantine 1).

**Date de soutenance : 17/07/2019**

