

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة

التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبي بكر بلقايد -

تلمسان

Université ABOU BEKR BELKAID -TLEMCEM-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :

Synthèse et activités biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques

Option : Biochimie

Thème :

**Etude phytochimique et évaluation de l'effet hémolytique
des extraits préparés des feuilles de *Nerium oleander L.***

Présenté par :

M^{elle} ZAOUI Rahma

Soutenu le 21-06-2023 devant les membres de jury :

Président	M. Rahmoun Mohammed Nadjib	Pr	Univ. Tlemcen
Encadreur	M. AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Co-encadreur	Melle.Abbou Fayza	Dr	Univ. Tlemcen
Examineur	Mme. Mezouar Dounia	MCA	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers **Dieu** tout-puissant pour m'avoir guidé tout au long de mes années d'études et pour m'avoir accordé la patience et la force nécessaires pour achever ce parcours et accomplir ce modeste travail.*

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance envers mon encadrant, **M. AZZI Rachid**, Professeur, au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou BekrBelkaid, Tout d'abord, je le remercie d'avoir accepté de superviser ce travail et pour ses précieux conseils, sa patience et sa disponibilité tout au long de ces mois. Je suis également reconnaissant envers lui d'avoir enrichi ce travail par ses informations précieuses.*

*Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à **M.Rahmoun Mohammed Nadjib**, Professeur, au département de Biologie, Université Abou BekrBelkaïd Tlemcen, pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant ce jury.*

*Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers **Mme.Mezouer Dounia**, maître de conférences classe « A » au département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et reconnaissance à la doctorante **Melle Abbou Fayza** pour sa disponibilité et ses sacrifices, et surtout de m'avoir appris le maximum d'informations et de méthodes tout au cours des manips, que Dieu la protège et l'aide dans son chemin.*

Je tiens aussi à remercier mes anciens professeurs qui ont su me transmettre leur amour de la biologie, et toute personne qui m'a aidé.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi aux personnes qui m'ont accompagné tout au long de ces cinq années, je pense plus particulièrement à mes collègues et mes amis, pour les moments qu'on a passé ensemble, en particuliers à la promotion 2022/2023. Trouvez ici l'expression de toute ma sympathie.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A...

Mes chers parents adorés, je voudrais exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à vous deux pour votre soutien inébranlable, votre patience infinie, vos encouragements constants et vos prières sincères qui m'ont permis d'exhausser mon rêve de réussite de mes études. Mes très chers parents, **Abderrahim** et **Faiza**, aucune parole ne peut suffire à exprimer ma reconnaissance envers vous. Je vous suis redevable pour le reste de ma vie, car toutes mes réalisations et ma réussite sont le fruit de votre amour et de votre soutien. Sans vous, rien de tout cela ne m'aurait été possible. Que Dieu veuille sur vous, vous accorde une santé florissante et un bien-être constant.

A...

Mes chers frères **Ibrahim** et **Ahmed Yassine**, qui m'ont assisté dans ces moments difficiles.

A...

Ma grande mère **Anissa** et grand père **Abdelkerim** qui m'ont accordé toujours par leurs prières et encouragements, puisse Allah leur prêter une longue vie et beaucoup de santé.

A...

Ma plus chère tante **Amina** et mes chers oncles **Tadjeddine**, **Sidi Mohammed**, **Madjid**, qui ont m'encouragé et aidé dans tous les moments.

A....

Celles qui ont su m'apprendre l'amitié, le sourire et l'amour, mes uniques et mes chères sœurs **Houda**, **Amina**, **Chaima**, **Merwa**, **Fatima** que Dieu vous garde toujours à mes côtés et vous protège dans votre vie.

A....

Ma très chère amie **Youssra**, je souhaite te dire merci du fond du cœur. Merci pour ton amour inconditionnel, ta bienveillance et ton soutien constant. Tu es une étoile qui brille dans ma vie et je te suis infiniment redevable d'avoir été à mes côtés.

A....

Toute la famille **Zaoui** et **Benlazar**

Toute personne qui m'a encouragé et m'a aidé...

Toute la promo biochimie 2023, vous resterais toujours dans ma mémoire...



الملخص:

الدقلة، هو نوع نباتي ذي أزهار ينتمي للفصيلة الدفلية، ويتحدّد موطنها في البحر الأبيض المتوسط.

ينصب هذا العمل على اختبارات كميّة نباتية وتركيز المركبات الفينولية والبحث عن أثر انحلال كريات الدم الحمراء البشرية المعزولة للمستخلصات الخامّة الهيدرومثنولية المحضّرة بالتنتقيع أو الإغلاء وأجزاء أسيتات الإيثيل الخاصّة بأوراق الدقلة.

سمحت لنا الاختبارات كميّة نباتية بملاحظة أنّ المستخلصات الهيدرومثنولية المحضّرة بالإغلاء أو التنتقيع تحتوي على الالكلويدات والعفص والفلافونيد والصابونينات والتربينات والمركبات المرجعة في حين أنّ الكينونات الحرّة هي غائبة (أو غير موجودة).

كشفت لنا مجموع التركيزات الكميّة للبوليفينولات عن طريق استعمال كاشف فولان سيوكالتو والفلافونيد بواسطة طريقة كلوريد الألومنيوم بأنّ تفرّع أسيتات الإيثيل المسترجع من المستخلص الخام المحضّر بالإغلاء غنيّ جدًا وبمحتويات تصل إلى 270.5 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ميليغرام مستخلص بالنسبة لمجموع البوليفينولات و148.14 ميكروغرام مكافئ كاتشين لكل ميليغرام مستخلص بالنسبة للفلافونيد مقارنة مع المستخلصات التي تمّ تحضيرها.

قد قدّم جزء أسيتات الإيثيل نفسها، المسترجع من المستخلص الخام الذي تمّ تحضيره بالإغلاء مفعولا انحلاليا مع نسبة انحلال خلايا الدم تصل إلى 24.84% مقارنة بنسبة انحلال خلايا الدم الإجمالية، يليها تفرّع أسيتات الإيثيل المسترجع من المستخلص الخام المحضّر بالتنتقيع مع نسبة انحلال خلايا الدم تصل إلى 14.10% بعد 45 دقيقة من حضانة كريات الدم الحمراء المعزولة في درجة حرارة قدرها 37 وهذا بوجود مستخلص يصل تركيزه إلى 6 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: الدقلة، إختبارات فيتوكيميائية، مجموع البوليفينولات، الفلافونيد، أثر انحلال كريات الدم الحمراء.

Résumé :

Nerium oleander L (Defla) est une espèce de fleurs appartenant à la famille des Apocynacées originaire de la région méditerranéenne.

Ce travail porte sur les tests phytochimiques, le dosage des composés phénoliques et la recherche de l'effet hémolytique sur les érythrocytes humains isolés, des extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération ou décoction et leurs fractions acétate d'éthyle des feuilles de *Nerium Oleander L*.

Les résultats des tests phytochimiques, nous a permis de constater que les extraits hydrométhanoliques préparés par décoction ou macération contiennent des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des saponines, des terpénoïdes et des composés réducteurs. Tandis que les quinones libres et les anthraquinones sont absentes.

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$, ont révélé que la fraction d'acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction est le plus riche en composés phénoliques avec des teneurs d'ordre de 270,5 μ g EAG / mg MS pour les polyphénols totaux et 148,14 μ g EC / mg MS pour les flavonoïdes ; par rapport aux extraits préparés.

La même fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction a présenté un effet hémolytique avec un taux d'hémolyse d'ordre 24,84 %, par rapport à l'hémolyse totale, suivie de la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par macération avec un taux d'hémolyse de l'ordre de 14,10 %, après 45 min d'incubation des érythrocytes isolées à 37°C, en présence d'une concentration de 6 mg / ml d'extrait.

Mots clés : *Nerium oleander L*, tests phytochimique, polyphénols totaux, flavonoïdes, effet hémolytique.

Abstract:

Nerium oleander L (Defla) is a flowering species belonging to the Apocynaceae family native to the Mediterranean region.

This work focuses on the phytochemical tests, the determination of phenolic compounds and the investigation of the hemolytic effect on isolated human erythrocytes, of the hydromethanolic crude extracts prepared by maceration or decoction and their ethyl acetate fractions of the leaves of *Nerium Oleander L*.

The results of the phytochemical tests, allowed us to observe that the hydromethanolic extracts prepared by decoction or maceration contain alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, terpenoids and reducing compound. While free quinones and anthraquinones are absent.

Quantitative determinations of total polyphenols by Folin Ciocalteu method and flavonoids by $AlCl_3$ method, revealed that the ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by decoction is the richest with contents in the order of 270.5 μ g EAG / mg MS for total polyphenols and 148.14 μ g EC / mg MS for flavonoids; compared to the prepared extracts.

The same ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by decoction showed a hemolytic effect with a hemolysis rate of about 24.84%, compared to total hemolysis, followed by the ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by maceration with a hemolysis rate of about 14.10%, after 45 min of incubation of isolated erythrocytes at 37°C, in the presence of a concentration of 6 mg / ml of extract.

Key words: *Nerium oleander L*, phytochemical tests, total polyphenols, flavonoids, hemolytic effect.

Table des matières

Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Partie I : Synthèse bibliographique	01
Partie II : partie expérimentales.	
Chapitre I : matériels et méthodes	
1. Matériel végétal	10
2. Préparation des extraits.....	11
2.1.1. Décoction	11
2.1.2. Macération	11
2.2. Fractionnement de l'extrait brut hydro-méthanolique.....	12
2.2.1. Extraction liquide par l'hexane	12
2.2.2. Fractionnement par l'acétate d'éthyle	13
2.3 Calcul des rendements	13
3. Tests phytochimiques	15
3.1. Les composés azotés	15
3.2. Les composés phénoliques	15
3.3. Composés terpéniques	16
3.4. Les composés réducteurs	16
4. Dosage des composés phénoliques	16
4.1. Dosage des polyphénols totaux	16
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	18
5. Analyse biologique : recherche d'effet hémolytique d'extraits préparés	21

5.1. Préparation du phosphate buffer saline (PBS)	21
5.2. Préparation de la suspension érythrocytaire	21
5.3. Préparation des extraits.....	21
5.4. Test d'hémolyse	21
6. Analyse statistique	22
6.1. La moyenne.....	22
6.2. L'écart- type	22
6.3. Test de Student.....	23
Partie III : Résultats et interprétations	
1. Rendement d'extraction	25
2. Caractéristiques des extraits obtenus	25
3. Les tests phytochimiques	26
4. Dosages des composés phénoliques	27
4.1. Dosage des polyphénols totaux	27
4.2. Dosage des flavonoïdes	29
5. Recherche de l'effet hémolytique des extraits préparés des feuilles de <i>Nerium Oleander</i> . 30	
Partie IV : Discussion	37
Partie V : Conclusion et perspectives	41
Partie VI : Références bibliographiques	43

Liste des figures

Figure 01 : Arbuste de laurier rose <i>Nerium Oleander</i>	2
Figure 02 : Différents partie de plante de laurier rose A : Les fruits ; B : Les feuilles ; C : Les fleurs ; D : Les graines	4
Figure 03 : Mécanisme d'hémolyse intra et extra vasculaire	7
Figure 04 : lieu de récolte de <i>Nerium Oleander</i> : Région Zenata, Décembre 2022	10
Figure 05 : feuilles de <i>Nerium Oleander</i> pendant le séchage	11
Figure 06 : feuilles de <i>Nerium Oleander</i> séchées et découpées	11
Figure 07 : Montage décoction sous-reflux	12
Figure 08 : Schéma récapitulatif pour la préparation des extraits	14
Figure 09 : la courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	28
Figure 10 : La teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/ mg MS}$), des extraits préparés des feuilles de <i>Nerium Oleander</i>	28
Figure 11 : La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	29
Figure 12 : La teneur en flavonoïdes ($\mu\text{g EC/ mg ES}$), des extraits préparés des feuilles de <i>Nerium Oleander</i>	30
Figure 13 L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) en fonction des différentes concentrations d'extrait brut hydrométhanolique des feuilles de <i>Nerium oleander</i> préparé par décoction (EBD), incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire..	31
Figure 14 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) en fonction des différentes concentrations d'extrait brut hydrométhanolique des feuilles de <i>Nerium Oleander</i> préparé par macération (EBM), incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire	32
Figure 15 : : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par macération (FAEM) des feuilles de <i>Nerium Oleander</i> , incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire.....	33

Figure 16 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par décoction (FAED) des feuilles de *Nerium Oleander* , incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire 34

Figure 17 : Evolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations des extraits bruts hydrométhanoliques des feuilles de *Nerium Oleander L* préparés par décoction (EBM) ou par macération (EBD) et leurs fractions acétate d'éthyle (FAEM et FAED), après 45 min d'incubation avec une suspension érythrocytaire 35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Méthode de dosage des polyphénols totaux.....	18
Tableau 02 : Méthodes de dosage des flavonoïdes	20
Tableau 03 : rendement d'extraction des différentes préparations des feuilles de <i>Nerium Oleander</i>	25
Tableau 04 : Caractéristiques des différents extraits préparés des feuilles <i>Nerium Oleander</i>	26
Tableau 05 : Résultats des tests photochimiques réalisés sur les différents extraits étudiés des feuilles de <i>Nerium Oleander</i>	27

Liste d'abréviations

- **OMS** : Organisation mondiale de la santé/..
- **FAO** : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- **APG III** : groupe phylogénie angiospermes.
- **MSD**: Merck & Co.
- **v/v** : volume à volume.
- **EBD** : extrait brute décoction.
- **EBM** : extrait brute macération
- **FAEM** : fractionnement d'acétate d'extrait de macération.
- **FAED** : fractionnement d'acétate d'extrait de décoction.
- **R** : rendement.
- **UV** : ultra-violet.
- **PBS** : phosphate buffer saline.

Synthèse bibliographique

Depuis l'antiquité, l'humanité a utilisé diverses plantes rencontrées dans son environnement, pour ses besoins médicaux et alimentaires afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies (**Boumediou et Addoun, 2017**).

Malgré tous les progrès de la chimie synthétique et de la biotechnologie, les plantes restent une source indispensable de préparations médicinales, à la fois préventives et curatives. Des centaines d'espèces sont reconnues comme ayant une valeur médicinale, et beaucoup d'entre elles sont couramment utilisées pour traiter et prévenir des maladies spécifiques (**Jitendra Srivastava et al., 1996**).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (**OMS, 2019**), environ 80% de la population mondiale utilisent des plantes médicinales pour leur santé et leur bien-être. Ce sont des plantes utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**).

Les plantes médicinales continuent d'être une source importante de médicaments, d'ingrédients actifs et de produits thérapeutiques dans le monde entier. Elles offrent une grande diversité de molécules, notamment des alcaloïdes, des terpènes et des flavonoïdes, qui ont des propriétés thérapeutiques importantes. En outre, de nombreux médicaments modernes dérivent de plantes médicinales et de leurs constituants (**Chouhan et al., 2017**).

L'Algérie est un pays riche en plantes médicinales utilisées depuis des siècles pour traiter diverses infections. Les différentes régions du pays abritent une grande diversité d'espèces végétales dont certaines sont utilisées en médecine traditionnelle. Une étude menée en 2019 a recensé plus de 800 espèces de plantes médicinales en Algérie (**Bouasla et al., 2019**).

La région de Tlemcen est connue pour sa riche diversité de plantes médicinales, avec plus de 500 espèces de plantes présentes dans la région, dont plus de 200 sont utilisées à des fins médicinales (**Bouzabata et al., 2016**).

La famille des Apocynacées est une famille de plantes Dicotylédones de l'ordre des Gentianales. Ce sont, pour la plupart, des lianes ou des plantes herbacées, quelques arbres ou arbustes, à latex, à feuilles persistantes, des régions tempérées à tropicales (**Judd et al., 2002**).

Aujourd'hui cette famille donne de nombreuses plantes ornementales ainsi que des plantes médicinales parmi lesquelles le laurier rose.

Le laurier rose (*Nerium oleander*), appartient à la famille des Apocynacées. Il pousse spontanément dans les pays méditerranéens (**Flesch, 2005**), sur les berges rocailleuses des

rivières, parfois même dans les zones littorales (**Bruneton, 1996**). C'est un arbuste très commun dans toute l'Algérie (**Mahmoudi, 1987**). Il aime l'humidité et les sols profonds et bien drainés (**Lewonczuk, 2004**). Son adaptation à la sécheresse et son caractère très décoratif lui permet d'être planté dans les régions de climat méditerranéen ou subtropical (**Figure 1**) (**Frohne et Pandere, 2005**).

Le laurier rose se trouve dans les régions méditerranéennes de l'Europe, en Asie et en Afrique (**Julve, 2014**), Il préfère :

- Le climat marin chaud et humide.
- Un sol à PH plutôt basique.
- Pas trop riche et non tolérant à la salinité et pauvre en matière organique.

Nerium oleander est connu sous différentes dénominations communes selon les pays et les régions considérés (**Hammiche et al., 2013**) :

Nom anglais : Rose-bay.

Nom français : laurier rose.

Nom arabe : Defla.



Figure 01 : Arbuste de laurier rose *Nerium oleander* (Photo personnelle, 2022).

Selon APG III, 2009, laurier rose peut être classé comme suit (**APG III, 2009**).

Règne	Végétale
Sous-règne	Plante
Division	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Ordre	Gentianales
Famille	Apocynacées
Genre	<i>Nerium</i>
Espèce	<i>Oleander L.</i>

Nom scientifique : *Nerium oleander*.

D'un point de vue botanique le *Nerium oleander* est un arbuste à feuilles persistantes. Il peut atteindre une hauteur de 2 à 6 mètres (FNEC, 2015) :

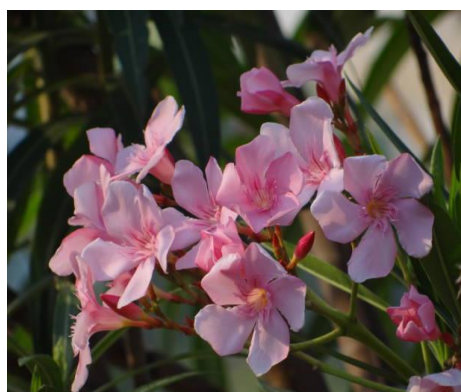
- ✓ Fruits : comportent deux follicules allongés (8-16 x 0,5-1,5cm), soudés jusqu'au début de la déhiscence (Figure 2-A) (Hussain, 2004).
- ✓ Les feuilles : vert foncé, étroites et allongées, mesurant de 10 à 22 cm de long (Figure2-B).
- ✓ Les fleurs : sont grandes, voyantes et de couleurs variées, allant du blanc au rose, au rouge et à l'orange. Elles sont regroupées en grappes terminales et apparaissent de juin à septembre (Figure2-C).
- ✓ Graines : sont duveteuses et surmontées d'une aigrette sessile qui en facilite la diffusion (Figure2-D) (Delille, 2007).



A : Fruits



B : Feuilles



C : Fleurs



D : Graines

A : Les fruits ; B : Les feuilles ; C : Les fleurs ; D : Les graines

Figure 02 : Différentes parties de plante de laurier rose (www.gettyimages.fr, 2022).

Le laurier rose (*Nerium oleander*) est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter une variété de maladies. Les parties de la plante, y compris les feuilles, les fleurs et les graines, ont été utilisées pour traiter des infections telles que les douleurs articulaires, les maladies cardiovasculaires, les maladies de la peau, les troubles gastro-intestinaux et les maladies infectieuses. Les propriétés médicinales de la plante sont dues à sa composition en composés bioactifs, tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les glycosides (Arab et al. 2011). Il est utilisé, aussi, pour le traitement des cancers et le diabète sucré (Sharma et al., 2023).

Plusieurs études ont été menées pour évaluer l'efficacité de l'utilisation du laurier rose en médecine traditionnelle par la recherche des activités biologiques de *Nerium oleander*. L'extrait des feuilles a montré une activité antioxydant élevée, qui a été attribuée à la présence des composés phénoliques dans la plante (Tanveer et al., 2017 ; Mouffouk, 2013).

De plus, les extraits de cette plante ont également montré des activités antimicrobiennes contre un large éventail de bactéries, de champignons et de virus, y compris des souches résistantes aux antibiotiques, selon des études in vitro (**Molanouri Shamsi et al., 2018**).

Cette plante peut avoir une activité anti-inflammatoire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Cela peut être bénéfique dans le traitement de certaines maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde (**Arab et al. 2011 ; Ojewole, 2006**).

Par ailleurs, la présence de divers glycosides cardiaques (en particulier l'Oléandrine) provoque l'apoptose des cellules cancéreuses (**Sharma et al., 2023**).

Le métabolisme secondaire est le processus biochimique dans lequel les organismes produisent des composés organiques qui ne sont pas directement impliqués dans leur métabolisme de base, comme la croissance et la reproduction. Ces composés, appelés métabolites secondaires, sont souvent utilisés par les organismes pour des fonctions telles que la défense contre les prédateurs, l'attraction de pollinisateurs, et la compétition pour les ressources. Ils sont largement répandus dans le règne végétal, ainsi que dans certains groupes d'organismes tels que les bactéries, les champignons et les invertébrés (**Harborne, 2000**).

Plusieurs études phytochimiques ont été menées sur le *Nerium oleander* pour identifier les composés chimiques présents dans la plante. Les résultats ont montré qu'elle contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, des iridoïdes, des terpénoïdes, des saponines et des tanins. Les alcaloïdes isolés du *Nerium oleander* comprennent la nérine, l'oléandrine, la digitoxigénine et l'adynerine. L'oléandrine est considérée comme la principale substance toxique de la plante. (**Elkady, 2021**). La plante renferme, également, des composés triterpéniques, tel que l'acide bétulinique, ursolique, oléanolique et oléandérolique (**Siddiqui et al., 1989**).

La plante contient des prégnanes, notamment les néridienones A et B, qui ont une activité cytotoxique sur plusieurs types de cellules. Des huiles essentielles ainsi que diverses flavones ont également été identifiées dans la plante (**Hammiche, 2013**).

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant des siècles pour traiter diverses maladies et infections. Cependant, leurs utilisations doivent être surveillées étroitement en raison de leurs potentielles toxicités (**Bhattacharya et al., 2021**).

Une toxine, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant, pouvant aller jusqu'à sa suppression complète et amener à la mort (**Viala et Botta, 2007**).

La toxicité des plantes se réfère aux effets nocifs que peuvent causer les plantes sur les organismes vivants, y compris les humains, les animaux et les plantes elles-mêmes. Les plantes produisent naturellement des substances chimiques qui peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine, mais qui peuvent également être toxiques à des doses élevées ou en cas d'utilisation inappropriée. Les mécanismes de toxicité des plantes incluent la présence de composés toxiques tels que les alcaloïdes, les glycosides, les tanins et les huiles essentielles, ainsi que leurs métabolismes et leurs éliminations dans le corps humain. La toxicité des plantes peut affecter différents organes et systèmes du corps humain, tels que le système gastro-intestinal, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, le système respiratoire et le système hépatique (**Kumar, 2020**).

Le *Nerium oleander* est une plante qui renferme des substances nocives pour l'homme et les animaux. Les différentes parties de la plante, notamment les feuilles, les fleurs et les tiges, contiennent des glycosides cardiaques qui peuvent entraîner une toxicité potentiellement mortelle. Les symptômes de l'intoxication par *Nerium oleander* peuvent inclure des vomissements, une diarrhée, des douleurs abdominales, une accélération du rythme cardiaque, une hypotension, des convulsions et même la mort. La gravité des symptômes dépend de la quantité de plante ingérée et de la rapidité de traitement (**Bogusz et al., 2020**).

Toutes les parties du Laurier-rose sont riches en glycosides cardiaques qui inhibent la Na⁺/K⁺-ATPase et induisent un effet inotrope sur les cardiomyocytes (**Dey, 2020**).

Pour évaluer la toxicité *in vitro*, divers modèles cellulaires peuvent être utilisés. Le test d'hémolyse peut être étudié comme indicateur de cytotoxicité en vue de la disponibilité des érythrocytes et la facilité de contrôler leurs lyses en mesurant la libération d'hémoglobine (**Sébahoun, 2006**).

Les globules rouges, également connus sous le nom d'érythrocytes, sont des cellules sanguines spécialisées responsables du transport de l'oxygène des poumons vers les tissus du corps. Les érythrocytes sont des cellules anucléées, ce qui signifie qu'elles ne possèdent pas de noyau, et sont donc incapables de se diviser ou de se répliquer. La forme des globules rouges est en disque biconcave qui leur permet de se déformer et de passer à travers les capillaires les plus étroits. Les globules rouges contiennent de l'hémoglobine, une protéine qui se lie à l'oxygène, permettant ainsi le transport de l'oxygène dans tout le corps (**Smith, 2019**).

Le phénomène d'hémolyse, signifie la destruction des érythrocytes avec la libération de leurs contenus intracellulaires dans le liquide extracellulaire (**Thomas, 2013**).

L'hémolyse est un processus complexe qui peut avoir de graves conséquences pour la santé, et il existe plusieurs types d'hémolyse avec des causes et des conséquences différentes (Wang et al., 2019).

L'hémolyse intravasculaire se produit lorsque les globules rouges sont brisés à l'intérieur des vaisseaux sanguins, tandis que l'hémolyse extravasculaire se produit lorsque les globules rouges sont brisés en dehors des vaisseaux sanguins, généralement dans les tissus (Figure 3) (Dampier et al., 2020).

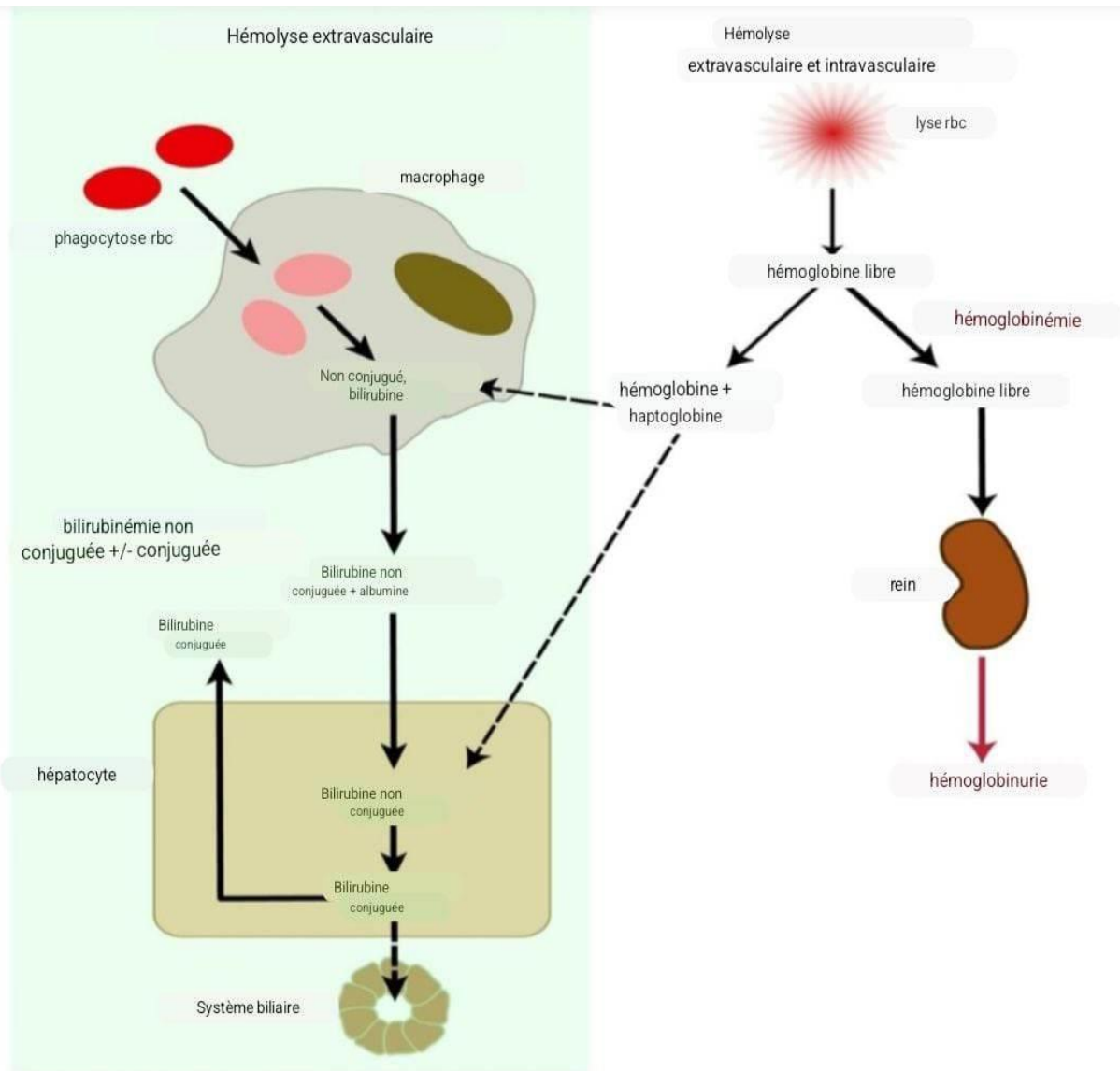


Figure 3 : Mécanisme d'hémolyse intra et extra vasculaire (Kacha, 2020).

L'hémolyse physiologique est un processus naturel qui se produit dans le corps lors du vieillissement des globules rouges du sang. Il s'agit d'un processus normal qui fait partie du cycle de vie des globules rouges. En effet, les globules rouges ont une durée de vie d'environ 120 jours, après quoi elles sont détruites et remplacées par de nouvelles. Au cours de l'hémolyse physiologique, les globules rouges vieilles sont dégradés dans la rate, où les macrophages les englobent et les décomposent. Les éléments qui composent les globules rouges, tels que l'hémoglobine et le fer, sont recyclés pour produire des nouveaux globules rouges. Ce processus de renouvellement constant des globules rouges permet de maintenir une quantité suffisante d'oxygène dans le sang pour le bon fonctionnement des tissus et des organes du corps. Cependant, certaines conditions peuvent entraîner une hémolyse pathologique, qui se produit lorsque la destruction des globules rouges est accélérée, conduisant à une anémie et à d'autres complications (MSD, 2023).

L'hémolyse pathologique est une destruction accélérée des érythrocytes qui peut être causée par différentes anomalies au niveau de la fabrication des cellules sanguines ou du globule rouge lui-même. Elle se caractérise par une libération anormalement élevée de l'hémoglobine dans le plasma sanguin et peut entraîner des complications cliniques graves telles que l'anémie, l'ictère et la formation de calculs biliaires. Les causes de l'hémolyse pathologique sont variées et peuvent inclure des anomalies génétiques, des maladies auto-immunes, des infections, des intoxications, des traumatismes ou des réactions à certains médicaments. Le diagnostic repose sur la mesure de différents paramètres sanguins tels que le taux d'hémoglobine, la numération des érythrocytes, le taux de bilirubine ou la présence d'anticorps dirigés contre les érythrocytes. Le traitement dépend de la cause sous-jacente et peut inclure des médicaments immunosuppresseurs, des transfusions sanguines, ou la chirurgie (Peyrard et al., 2016).

Notre travail est porté sur une étude phytochimique des feuilles de laurier rose (*Nerium oleander*), ainsi qu'une étude de la cytotoxicité , in vitro , basé sur la recherche de l'effet hémolytique de différentes concentrations d'extraits bruts hydrométhanoliques des feuilles de Laurier rose préparés par macération et décoction et leurs fractions acétate d'éthyle.

Matériel et méthodes

Notre partie expérimentale a été réalisée au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, antifongiques, physico - chimie, synthèse et activité biologique », département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

1. Matériel végétal

La récolte des feuilles de laurier rose (*Nerium oleander L.*) a été réalisée au mois de décembre 2022 dans la région de Zenata (Wilaya de Tlemcen) (**Figure 04**). Les feuilles récoltées ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant un mois (**Figure 04**). Une fois séchées, les feuilles ont été découpées en petits morceaux (**Figure 04**).



Figure 04 : lieu de récolte de *Nerium Oleander* : Région Zenata, Décembre 2022 (photo personnelle, 2022).



Figure 05 : feuilles de *Nerium Oleander* pendant le séchage (photo personnelle, 2023).



Figure 06 : feuilles de *Nerium Oleander* séchées et découpées (photo personnelle, 2023).

2. Préparation des extraits

A partir des feuilles de *Nerium Oleander* séchées et broyées, nous avons préparé, par macération ou décoction, deux extraits bruts hydro-méthanolique et deux extraits obtenus après fractionnement par l'acétate d'éthyle des deux extraits bruts.

2.1. Préparation des extraits bruts hydro-méthanolique

2.1.1. Décoction

- Dans un ballon rodé surmonté d'un réfrigérant, mélanger 10g de la matière végétale avec 150ml du mélange eau-méthanol (30/70 : v/v).
- Placer l'ensemble sous reflux dans une chauffe ballon agitatrice pendant 45 min (**Figure 07**).
- Filtrer le mélange.
- Evaporer le méthanol du filtrat à l'aide d'un Rotavapor à 60°C.

L'extrait brut hydro-méthanolique préparé par décoction (EBD) est ainsi récupéré.

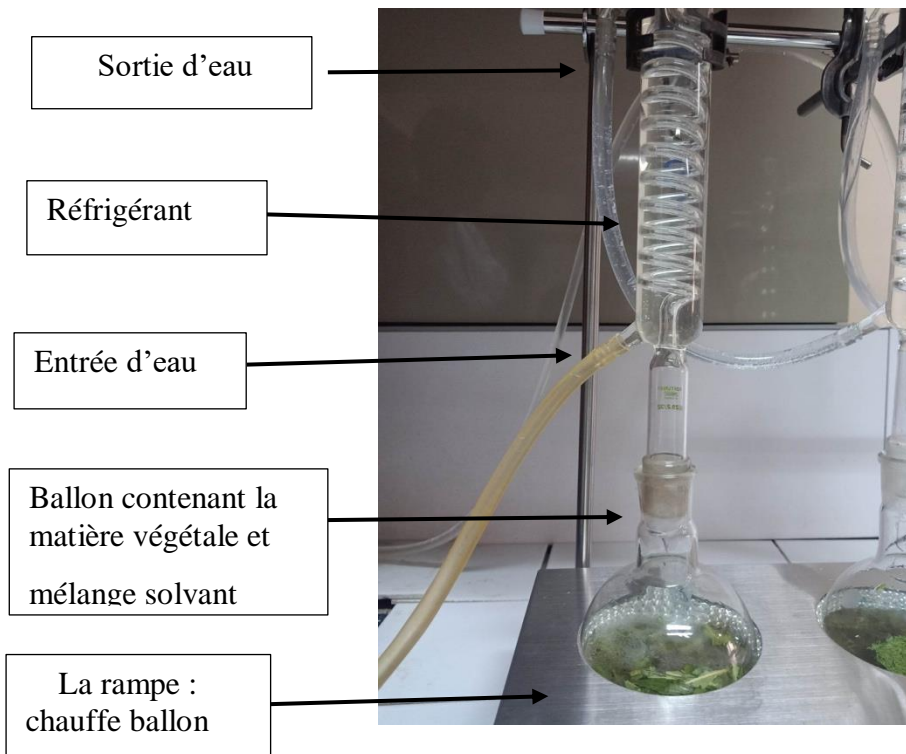


Figure 07 : Montage décoction sous-reflux (photo personnelle, 2023).

2.1.2. Macération

- Dans un Erlenmeyer, mélanger 10g de la matière végétale avec 150ml du mélange eau-méthanol (30/70 : v/v).
- Laisser macérer le mélange à température ambiante pendant 48 heures.
- Filtrer le mélange.
- Evaporer le méthanol du filtrat à l'aide d'un Rotavapeur à 60°C.

L'extrait brut hydro-méthanolique préparé par macération (EBM) est ainsi récupéré.

2.2. Fractionnement de l'extrait brut hydro-méthanolique

Après évaporation du méthanol des extraits hydro-méthanoliques obtenus par macération ou décoction, une extraction liquide-liquide, à l'aide d'une ampoule à décanter, a été réalisée par la suite, en présence des solvants : l'hexane, pour éliminer la chlorophylle et la dilapidation, et l'acétate d'éthyle.

2.2.1. Extraction liquide par l'hexane

- Dans une ampoule à décanter, mélanger l'extrait (EBD ou EBM) et l'hexane (v/v).
- Agiter bien le mélange, dégazer et laisser décanter.

- Après décantation, récupérer la phase aqueuse.
- Réaliser le lavage deux fois.

2.2.2. Fractionnement par l'acétate d'éthyle

- Mélanger la phase aqueuse récupérée avec l'acétate d'éthyle (v/v).
- Mélanger et bien agiter, dégazer et laissé décanter.
- Après décantation, récupérer la phase organique.
- Réaliser deux fois le fractionnement par acétate d'éthyle.
- Evaporer l'acétate d'éthyle à sec à l'aide d'un Rotavapor à 60°C.

La phase organique présente l'extrait acétate d'éthyle (FAEM) fractionné de l'extrait EBM ou l'extrait acétate d'éthyle (FAED) fractionné de l'extrait EBD.

Les deux extraits bruts hydrométhanolique obtenus (EBD et EBM) et leurs fractions respectives (FAED et FAEM) ont été séchés à sec à 35°C dans une étuve. Ils ont été conservés, par la suite, dans des tubes à 4°C et à l'obscurité.

2.3 Calcul des rendements

Les rendements obtenus à partir des extraits des feuilles de *Nerium Oleander*, préparés par macération ou décoction et leurs fractions acétate d'éthyle sont calculés à partir de l'équation suivante :

$$R (\%) = (M1 / M0) \times 100$$

R (%) : rendement exprimé en pourcentage.

M1 : masse en gramme « g » de l'extrait sec obtenu.

M0 : masse en gramme « g » du matériel végétal.

La figure 08 représente un schéma qui résume les différentes méthodes de préparation des extraits et des fractions préparés à partir des feuilles séchées et découpées de *Nerium Oleander*.

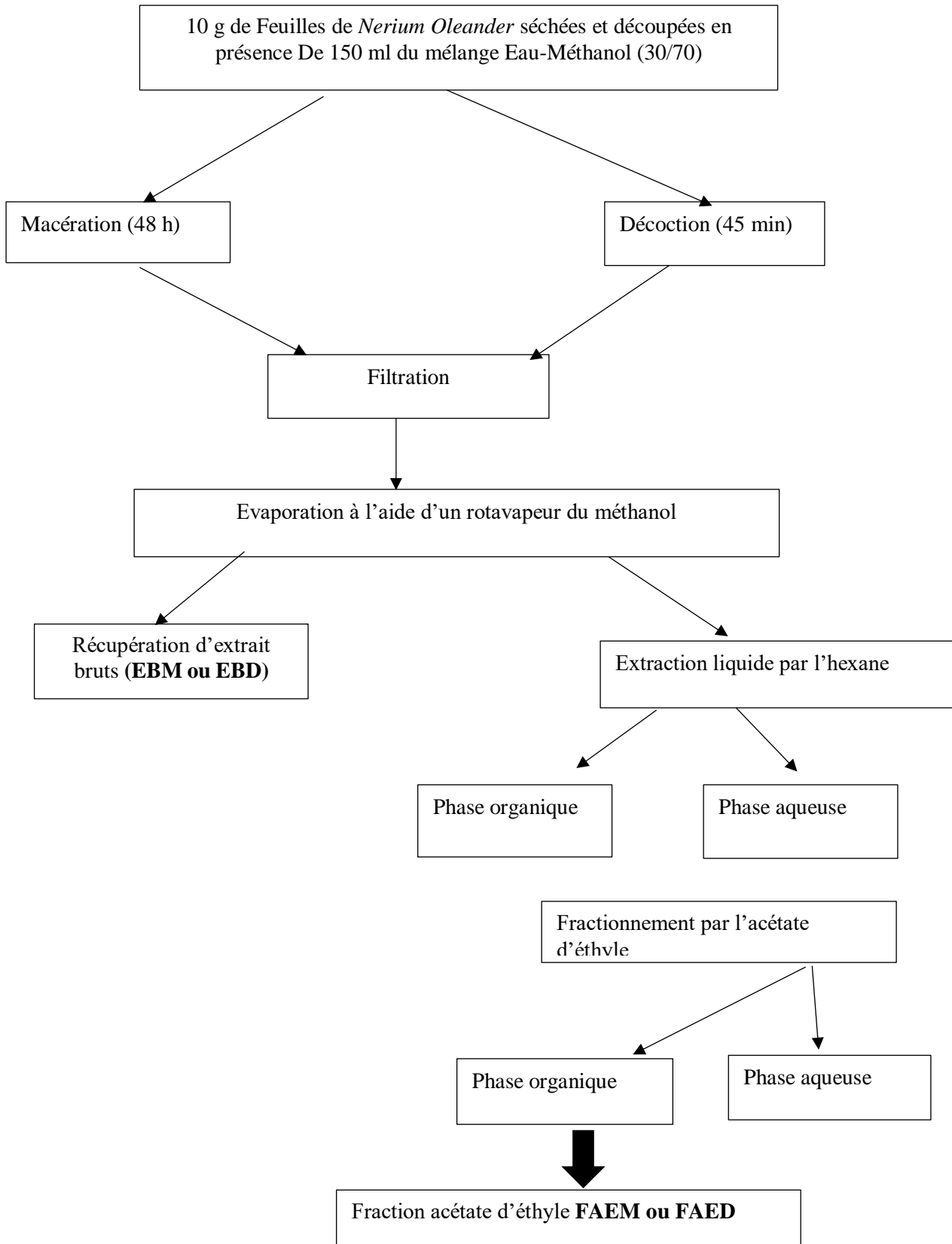


Figure 08 : Schéma récapitulatif pour la préparation des extraits.

3. Tests phytochimiques

Des tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits bruts obtenus, afin de connaître leurs compositions chimiques et de mettre en évidence les différents métabolites secondaires présents dans les feuilles de laurier rose (*Nerium Oleander*). La présence ou l'absence de ces molécules se traduit par des réactions de coloration ou de précipitation ou mousse.

Ces tests ont été menés selon les techniques de caractérisation qualitatives décrites par **Trease et Evans, (1989) Harborne (1998)**.

3.1. Les composés azotés

- **Les alcaloïdes**

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5ml de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

3.2. Les composés phénoliques

- **Les tanins**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

- **Les flavonoïdes**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

- **Les quinones libres**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

- **Anthraquinones**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml de NH₄OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

3.3. Composés terpéniques

- **Les saponines (test de mousse)**

Dans un tube à essai, introduire 10 ml de l'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse indique la présence de saponines.

- **Terpénoïdes**

Test de Slakowski : Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser, ajouter 0,4ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

3.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par méthode spectrophotométrique suivant le protocole décrit par **Vermerius et Nicholson (2006)**.

➤ **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène ayant une absorption maximale à 700 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon (**Vermerius et Nicholson, 2006**).

➤ **Mode opératoire**

0,1 ml d'extrait (1mg/ml) est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 2%). L'ensemble est agité et incubé pendant 5 minutes. Puis, 0,1ml du réactif Folin-Ciocalteu 1N est ajouté. Le mélange final est incubé à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc (**Tableau 1**).

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle en utilisant l'acide gallique comme étalon à un intervalle de concentrations de 100 à 500 $\mu\text{g/ml}$ (**Tableau 1**).

Les résultats sont exprimés en en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAG/ mg ES}$).

Chaque essai est répété 3 fois.

Tableau 01 : Méthode de dosage des polyphénols totaux.

	la gamme d'étalon (acide gallique) µg/ml							Extraits (1mg/ml)			
								EB D	EBM	FAED	FAE M
[Acide gallique] µg/ml	Blanc	30	100	200	300	400	500	-	-	-	-
Acide gallique (ml)	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
Eau distillée (ml)	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extraits (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Na ₂ CO ₃ (2%) ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agitation et incubation pendant 5 min											
Folin-Ciocalteu (1N) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min											
Mesure de l'absorbance à 700 nm											

4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

➤ Principe

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée par le test de trichlorure d'aluminium selon la méthode décrite par **Zhicheneet al., (1999)**.

Le principe de cette méthode se repose sur l'oxydation des flavonoïdes en milieu alcalin par le nitrite de sodium (NaNO_2) et le chlorure d'aluminium (AlCl_3) en composant un complexe de couleur rose absorbant à 510 nm.

➤ **Mode opératoire**

- ✓ Mélanger 250 μl de l'extrait (1mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée et 75 μl du NaNO_2 à 15 %.
- ✓ Laisser incuber pendant 6 min à température ambiante puis ajouter 75 μl du chlorure d'aluminium AlCl_3 à 10%.
- ✓ Après 6 min, ajouter 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (4%).
- ✓ Compléter le volume total à 2,5 ml d'eau distillée.
- ✓ Agiter le mélange et laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 510 nm (**Tableau 2**).

Une gamme d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions avec la catéchine à différentes concentrations de 1, 25 à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C /mg ES}$).

Tableau 02 : Méthodes de dosage des flavonoïdes.

	La gamme d'étalon (catéchine)								Extraits (1 mg/ml)			
									EBD	EBM	FAE D	FAEM
[Catéchine µg/ml	Blanc	1,25	2,5	25	50	100	200	300	-	-	-	-
Catéchine (µl)	-	250	250	250	250	250	250	250	-	-	-	-
Extrait (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	250	250	250	250
Eau distillée (µl)	1250	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NaNO ₂ (15%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
1 ^{ère} incubation pendant 6 min à température ambiante												
AlCl ₃ (10%) (µl)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
2 ^{ème} incubation pendant 6 min à température ambiante												
NaOH (4%) (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Eau distillée (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3 ^{ème} incubation à l'obscurité pendant 30 min												
Mesure de l'absorbance à 510 nm												

5. Analyse biologique : recherche d'effet hémolytique d'extraits préparés

Le but de cette partie est la recherche d'effet hémolytique, des extraits hydrométhanoliques des feuilles de *Nerium_oleander_séchées* et découpées et leurs fraction acétate d'éthyle sur une suspension érythrocytaire du sang humain dans le PBS.

5.1. Préparation du phosphate buffer saline (PBS)

Afin de préparer une solution tampon de PBS à $\text{pH}=7.4 \pm 0,2$, nous avons utilisé les composés suivant avec les concentrations qui correspondent : Na_2HPO_4 (10Mm); KH_2PO_4 (10Mm); KCl (2,7mM); NaCl (137mM) (Mohan, 2006).

5.2 Préparation de la suspension érythrocytaire

- ✓ Prélever le sang dans un tube héparine à partir d'un donneur sain.
- ✓ Centrifuger à 3000 tours/ min durant 10 min.
- ✓ Eliminer le plasma (surnageant) et laver le culot deux fois par du PBS (même volume du plasma éliminé).
- ✓ La suspension érythrocytaire, ainsi obtenu est diluée 20 fois par du PBS (10 mM, $\text{pH}=7,4\pm 0,2$).

5.3. Préparation des extraits

Les extraits obtenus à partir des feuilles de *Nerium Oleander*, à savoir EBM et EBD, ont été pesés puis dissous dans du PBS. Quant aux extraits FAFD et FAFM, ils ont été dissous dans un mélange de PBS et de DMSO afin de créer une gamme de quatre concentrations initiales (25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml et 200 mg/ml).

5.4. Test d'hémolyse

Le test d'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de **Guo- Xiang Li et Zai-Qun Lui (2007) et OMS (2011)**.

- Dans des tubes à hémolyse, mélanger 1940 μl de la suspension érythrocytaire préparée (diluée 20 fois), avec 60 μl de l'extrait à différentes concentrations initiales (25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml et 200mg/ml). Les concentrations finales après ajout du PBS seraient (0,75 mg/ml, 1.5 mg/ml, 3 mg/ml et 6 mg/ml).

- Incuber les tubes dans l'incubateur agitateur à 37°C durant 45 min.

- Prélever 500 μl au temps T0 (0min) et au temps final T1 (45 min).

- Ajouter 1,5 ml de PBS.
- Mélanger les tubes délicatement.
- Centrifuger les tubes à 3000 tour/minute durant 5 min.
- Lire l'absorbance (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible double faisceau (SPECTROD® 200 PLUS, Analytique Jena), contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé avec 1940µl de la suspension érythrocytaire ; diluée 20 fois, et 60µl de PBS, en absence d'extrait.

-Un tube d'hémolyse totale est préparé par 250 µl de la suspension érythrocytaire non diluée et 4750 µl d'eau distillé, en absence d'extrait.

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

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

Les expériences sont répétées 3 fois dans le but de réaliser une analyse statistique (moyenne, écart type).

6. Analyse statistique

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou des valeurs de références plus exactement.

6.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

6.2.L'écart- type

$$\sigma(x) = \sqrt{V(x)}$$

6.3. Test de Student

Pour comparer les deux moyennes on applique le test de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

La valeur de « t » nous donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

Significative : $P < 0.05$ (*).

Très significative : $P < 0.01$ (**).

Hautement significative : $P < 0.001$ (***)).

Résultats et Interprétations

1. Rendement d'extraction

Après évaporation, les rendements des différents extraits bruts méthanol-eau (70/30), préparés à partir des feuilles de *Nerium Oleander* par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle, ont été calculés par rapport à la masse végétale sèche. Les résultats sont indiqués dans le tableau 03.

Tableau 03 : Rendement d'extraction des différentes préparations des feuilles de *Nerium Oleander*.

Extraits	Masse végétale initiale (g)	Rendement (%)
EBD	10	7,26
EBM	10	8,47
FAED	10	1,19
FAEM	10	1,25

EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD :** Extrait brut -décoction- ; **FAEM :** Fraction acétate d'éthyle - Macération ; **FAED :** Fraction acétate d'éthyle –Décoction.

D'après les résultats présentés dans le **tableau 03**, nous avons remarqué que les extraits bruts présentent des rendements plus importants que les fractions acétate d'éthyle, dont nous avons enregistré des rendements d'ordre de 8,47 et 7,26 %, pour les extraits bruts obtenus par macération et décoction respectivement, et 1,19 % et 1,25 % pour les fractions acétate d'éthyle obtenus par macération et décoction, respectivement.

Les résultats ont montré que la méthode de préparation par macération a permis d'obtenir les rendements d'extraction les plus élevés pour les extraits préparés à partir des feuilles de *Nerium Oleander*.

2. Caractéristiques des extraits obtenus

Après évaporation, les extraits brutes hydrométhanolique préparés par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle sont récupérés. Le tableau 04 résume les caractéristiques de chacun de ces extraits.

Tableau 04 : Caractéristiques des différents extraits préparés des feuilles *Nerium Oleander*.

Extraits	Aspect	Couleur	Solubilité
EBM	Cristallisé	Vert jaunâtre	Eau-distillé
EBD	Cristallisé	Vert jaunâtre	Eau-distillé
FAEM	Cristallisé	Vert jaunâtre	Méthanol, DMSO
FAED	Cristallisé	Vert jaunâtre	Méthanol, DMSO

EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD** : Extrait brut -décoction- ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle - Macération- ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle -Décoction-.

Le **tableau 04** a montré que l'ensemble des extraits bruts hydrométhanoliques préparés à partir des feuilles de *Nerium Oleander* et leurs fractions ont un aspect cristallisé de la même couleur (vert jaunâtre).

Par ailleurs, nous avons noté que les extraits bruts EBM et EBRD sont solubles dans l'eau distillée, contrairement aux fractions acétate d'éthyle FAEM et FAED qui sont insoluble dans l'eau distillée et soluble dans le méthanol et le DMSO.

3. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont des analyses qualitatives qui nous permettent de détecter les différentes classes de métabolites secondaires existantes dans la plante. Ces réactions sont basées sur des réactions de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques de chaque famille de composés.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits et fractions de *Nerium Oleander* sont indiqués dans les **tableaux 05**.

Tableau 05 : Résultats des tests photochimiques réalisés sur les différents extraits étudiés des feuilles de *Nereium Oleander*.

Métabolites secondaires	Réactifs	EBM	EBD
Alcaloïdes	Mayer	-	-
	Wagner	+	+
Tanins	FeCl ₃	+	+
Flavonoïdes	HCl+Mg ⁺²	+++	+++
Quinones libres	NaOH (1%)	-	-
Anthraquinones	NH ₄ OH (10%)	-	-
Saponines	Indice de mousse	+ 3.1cm	+ 2.8cm
Terpénoïdes	Test de Slakowski	++	++
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	++	+

EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD :** Extrait brut -décoction- ; (+++) : Test fortement positif ; (++) : test moyennement positif ; (+) : test faiblement positif ; (-) : test négatif.

D'après les résultats présentés dans le **tableau 05**, nous avons noté la présence des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des saponines, des terpénoïdes et des composés réducteurs. Tandis que les quinones libres et les anthraquinones sont absentes, dans les extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération ou décoction (EBM et EBD) des feuilles de *Nereium Oleander*.

4. Dosages des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, des différents extraits bruts méthanol-eau (70/30), préparés à partir des feuilles de *Nerium Oleander* par décoction ou macération et leurs fractions acétate d'éthyle, a été effectué par la méthode spectrophotométrique avec le réactif de Folin Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par mg de l'extrait sec obtenu (μg EAG / mg ES), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 0,0016x$) avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,9973 (**Figure 09**).

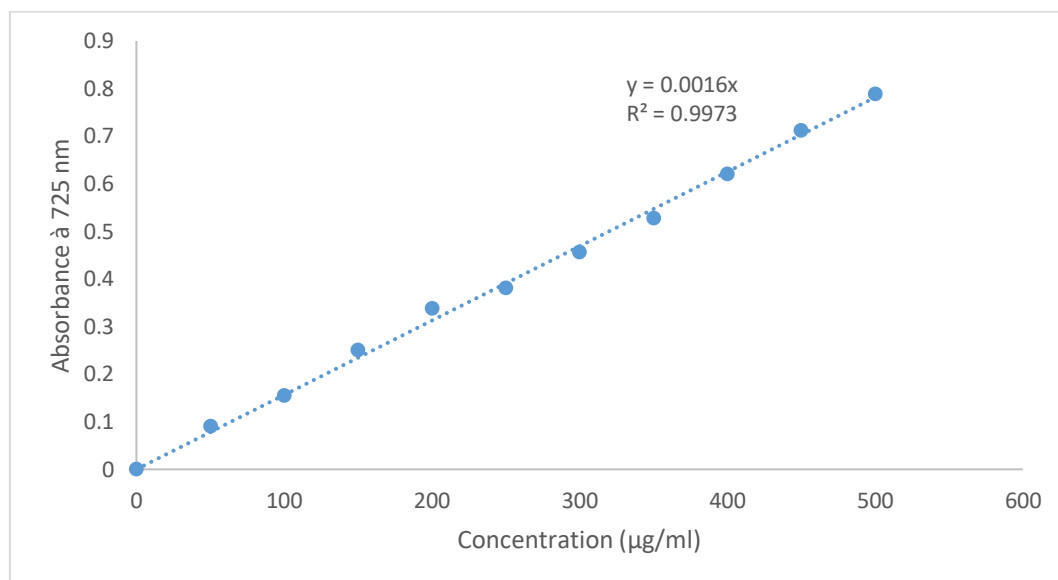
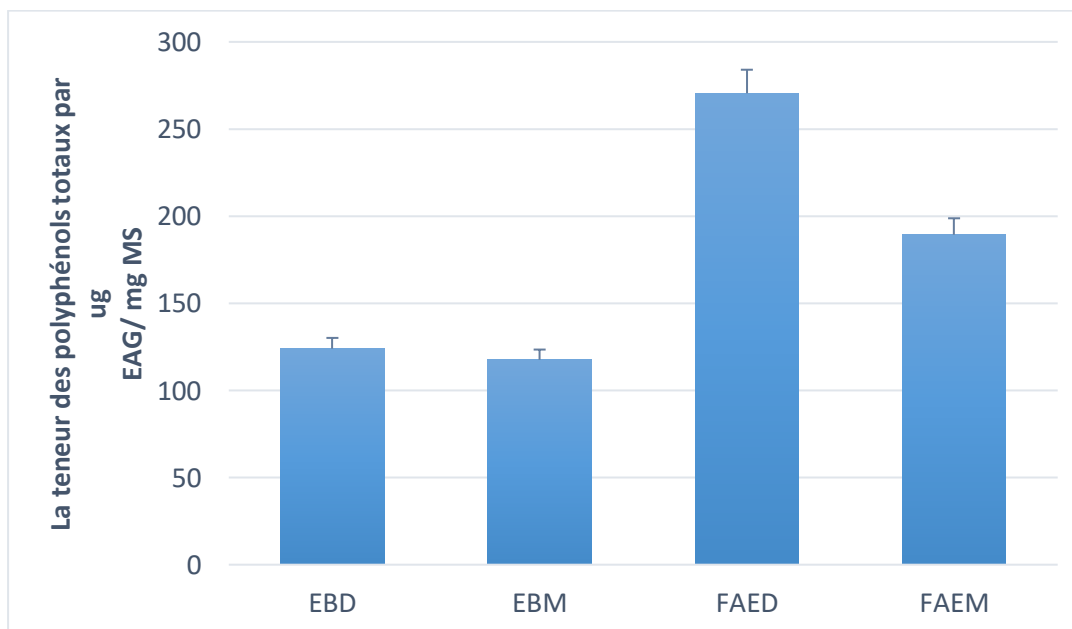


Figure 09 : la courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD** : Extrait brut -décoction- ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle -Macération- ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle -Décoction-.

Figure 10 : La teneur en polyphénols totaux (μg EAG/ mg MS), des extraits préparés des feuilles de *Nerium Oleander*.

Les résultats obtenus ont montré des teneurs variables dans les différents extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction et macération et leurs fractions acétate d'éthyle.

La fraction d'acétate d'éthyle récupérée de l'extrait préparé par décoction a renfermé la teneur la plus élevée en polyphénols totaux de l'ordre de $270 \pm 0,028 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$ (**Figure10**) suivie par la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait préparé par macération avec une teneur de l'ordre de $189 \pm 0,066 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$. Tandis que les taux les plus faibles sont enregistrés dans les extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction et macération, avec des teneurs de l'ordre de $123 \pm 0,014 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$; $117 \pm 0,023 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$, respectivement.

4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AICl_3 en utilisant comme standard la catéchine (**Figure11**). Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent de la catéchine par mg d'extrait sec, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la catéchine ($y = 0,0027x$) avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,9969 (**Figure 11**).

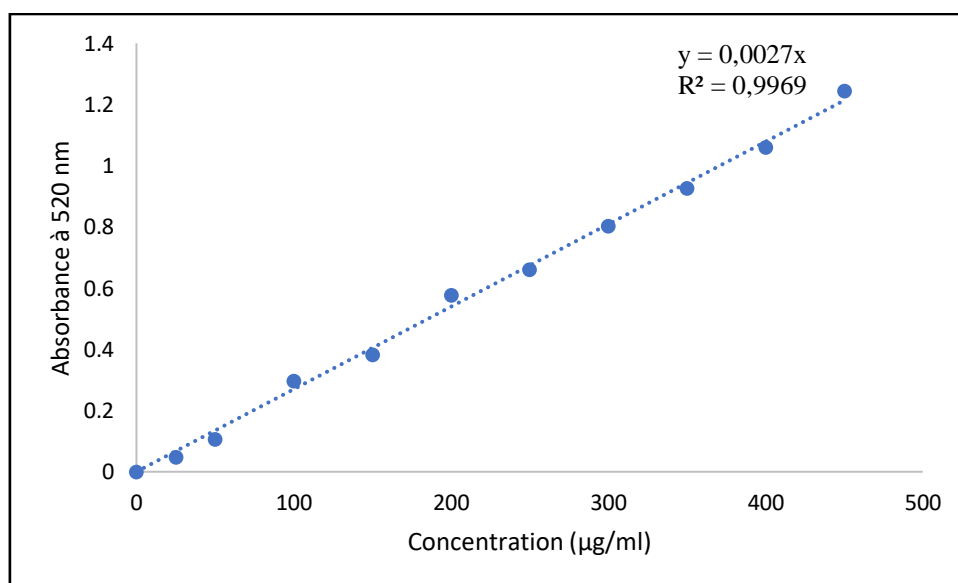
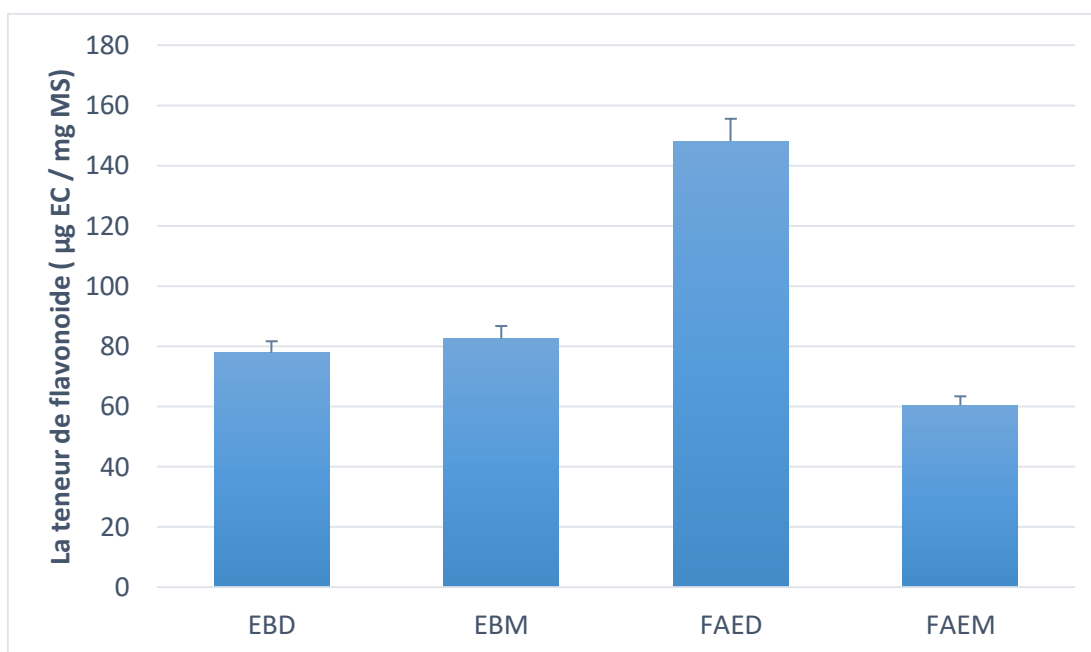


Figure 11 : La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.



EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD** : Extrait brut -décoction- ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle - Macération- ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle -Décoction-.

Figure 12 : La teneur en flavonoïdes (µg EC/ mg ES), des extraits préparés des feuilles de *Nerium Oleander*.

Nous avons enregistré des teneurs en flavonoïdes des différents extraits préparés des feuilles de *Nerium Oleander* d'ordre de $77,77 \pm 0,036 \mu\text{g EC} / \text{mg MS}$; $82,59 \pm 0,023 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$; $148,14 \pm 0,01 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$ et $60,37 \pm 0,040 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$ pour les extraits hydrométhanoliques préparés par décoction (EBD), macération (EBM), et leurs fractions fraction acétate d'éthyle (FAEM et FAED), respectivement (**Figure 12**).

La fraction d'acétate de l'extrait préparé par décoction a présenté la teneur la plus élevée en flavonoïdes de l'ordre de $148,14 \pm 0,01 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$.

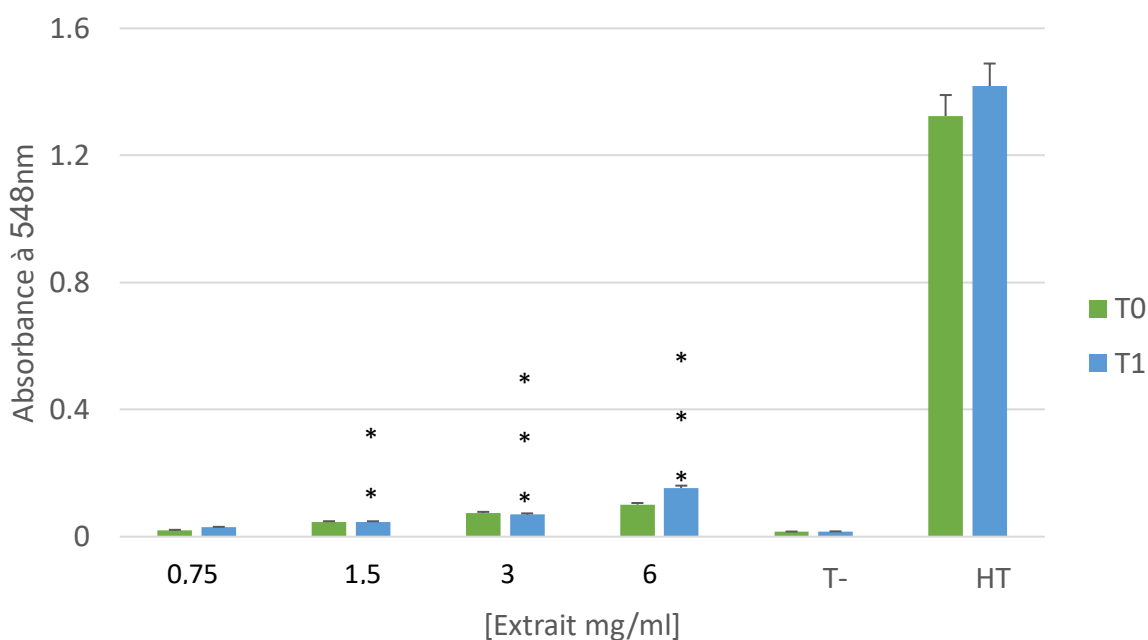
5. Recherche de l'effet hémolytique des extraits préparés des feuilles de *Nerium Oleander*

Les tests d'effet hémolytique ont été réalisés sur les extraits hydrométhanoliques préparés par décoction et macération des feuilles de *Nerium Oleander* et leurs fractions acétate d'éthyle.

Les figures 13, 14, 15 et 16 présentent l'évolution de l'effet hémolytique, par absorbance, durant 45 min, dans un milieu tampon PBS (pH=7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations des extraits hydrométhanoliques

de *Nerium oleander* et leurs fractions (0,75mg/ml ; 1,5 mg/ml ; 3mg/ml ; 6mg /ml) comparées à un témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire).

Les résultats représentés dans les figures ci-dessous, ont montré que plus la concentration des extraits est élevée, plus l'effet hémolytique est important. Cela est justifié par l'augmentation de l'absorbance à 548 nm au cours du temps pour chaque concentration testée. Cependant, il est important de noter que les valeurs d'absorbance sont plus élevées à T1 (45min) qu'à T0 (0min), indiquant une augmentation de l'effet hémolytique au cours du temps.

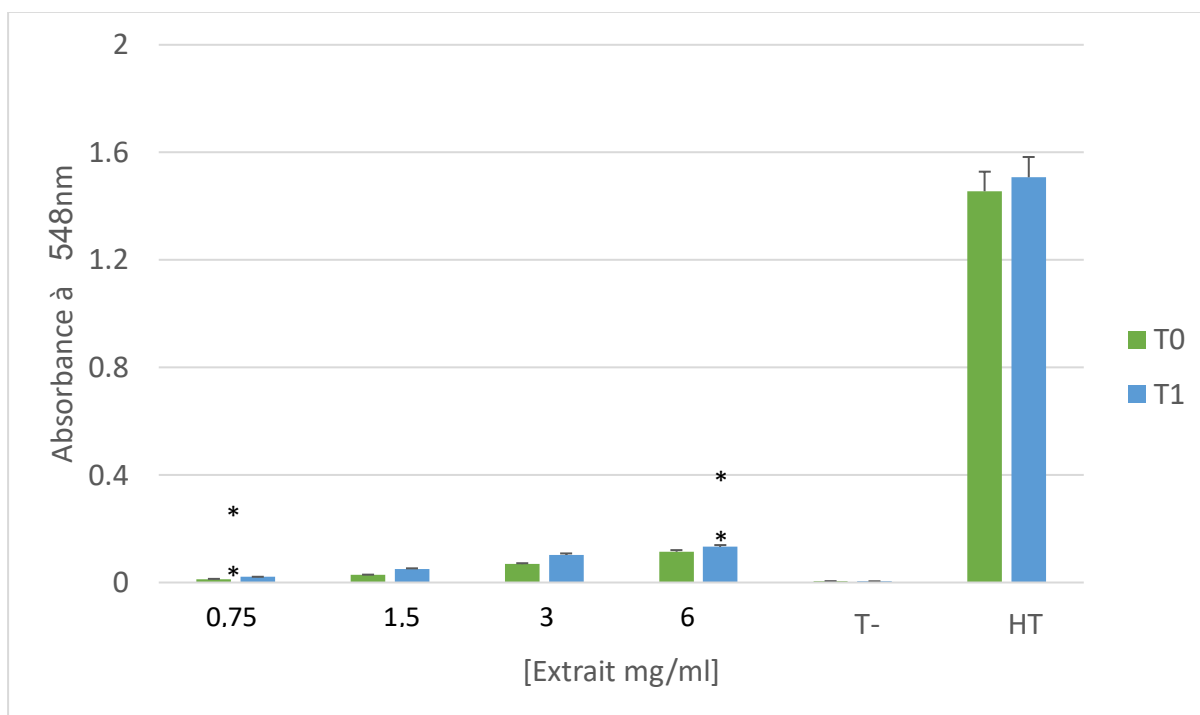


T0 : 0 min T1 : 45 min T- : témoin négatif HT : hémolyse totale

P<0,001 très significative / T- ; *P<0,0001 hautement significative / T-

Figure 13 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) en fonction des différentes concentrations d'extrait brut hydrométhanolique des feuilles de *Nerium oleander* préparé par décoction (EBD), incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire.

Au temps T0 et à toutes les concentrations testées, nous avons noté que l'extrait brut préparé par décoction (EBD) a enregistré des valeurs d'absorbance allant de $0,02 \pm 0,006$ à $0,10 \pm 0,01$. A la concentration de 6 mg/ml, l'EBD a enregistré une absorbance maximale de $0,15 \pm 0,02$ à T1, avec une augmentation est hautement significative ($P>0,0001$), par rapport au temps T0 (0min) (**Figure 13**).



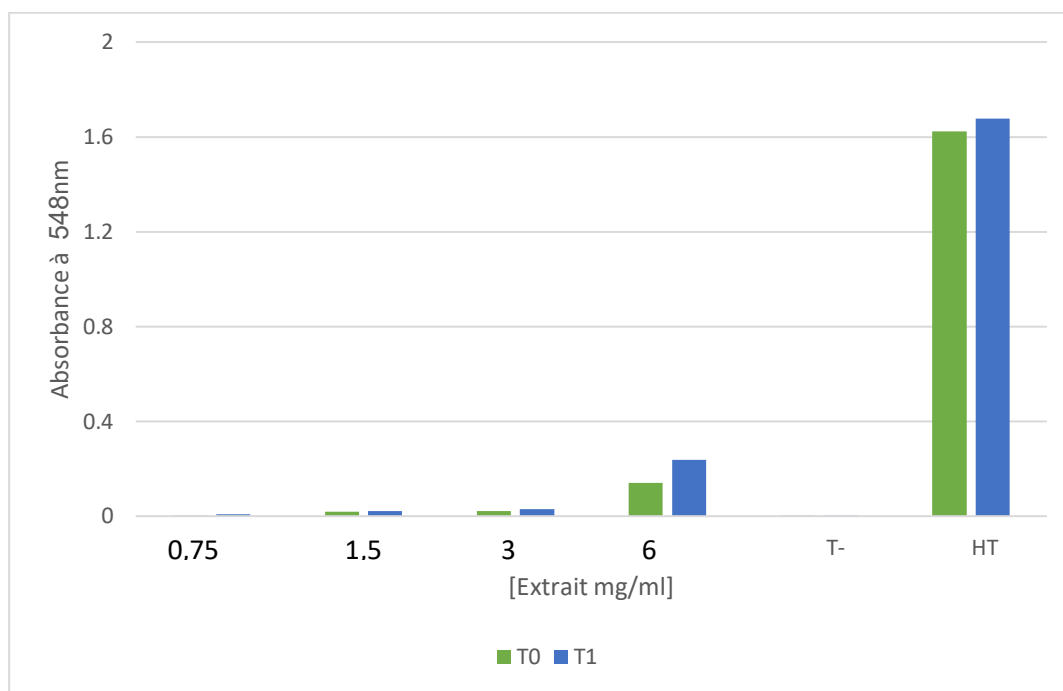
T0 : 0 min T1 : 45min T- : témoin négatif HT : hémolyse totale

*P<0,05très significative / T- ;**P<0,001 très significative / T-

Figure 14 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) en fonction des différentes concentrations d'extrait brut hydrométhanolique des feuilles de *Nerium Oleander* préparé par macération (EBM), incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire.

Pour l'extrait brut préparé par macération (EBM), nous avons noté une augmentation très significative ($P>0,001$), par rapport au temps T0 (0min), avec des valeurs d'absorbance allant de $0,02 \pm 0,002$ à $0,13 \pm 0,03$ pour toutes les concentrations testées, après 45 minutes

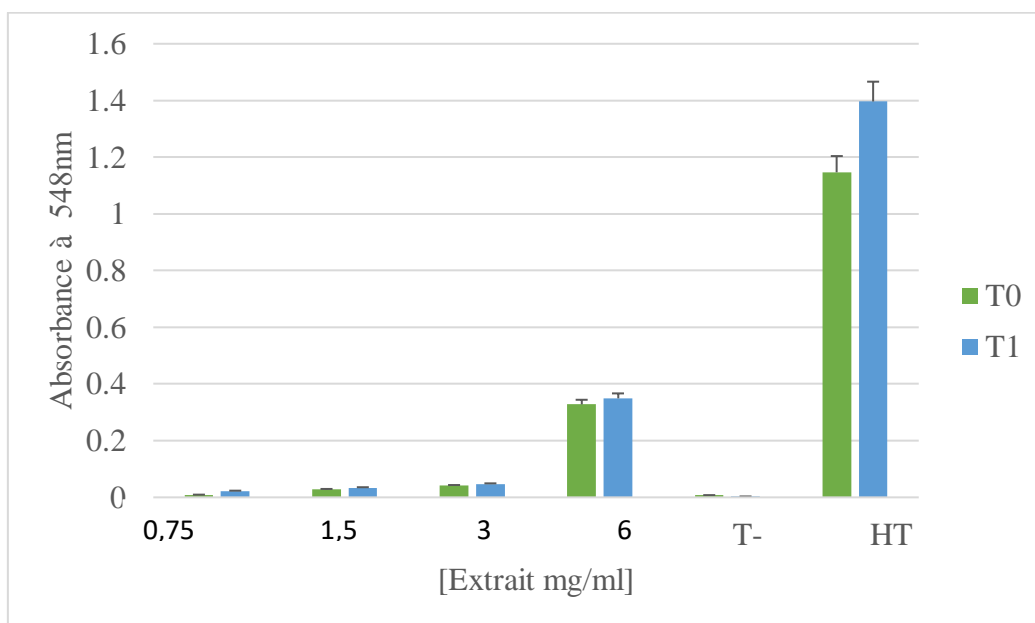
d'incubation (**Figure14**).



T0 : 0 min T1 : 45 min T- : témoin négatif HT : hémolyse totale

Figure 15 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par macération (FAEM) des feuilles de *Nerium Oleander*, incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire.

Nous avons observé que les valeurs des absorbances à T0 (0min) et T1 (45min) sont relativement faibles pour toutes les concentrations testées de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par macération (FAEM) des feuilles de *Nerium Oleander*, Nous avons noté une absorbance maximale de $0,24 \pm 0,011$ à T1 (45min) à une concentration de 6 mg/ml (**Figure 15**).



T0 : 0 min

T1 : 45 min

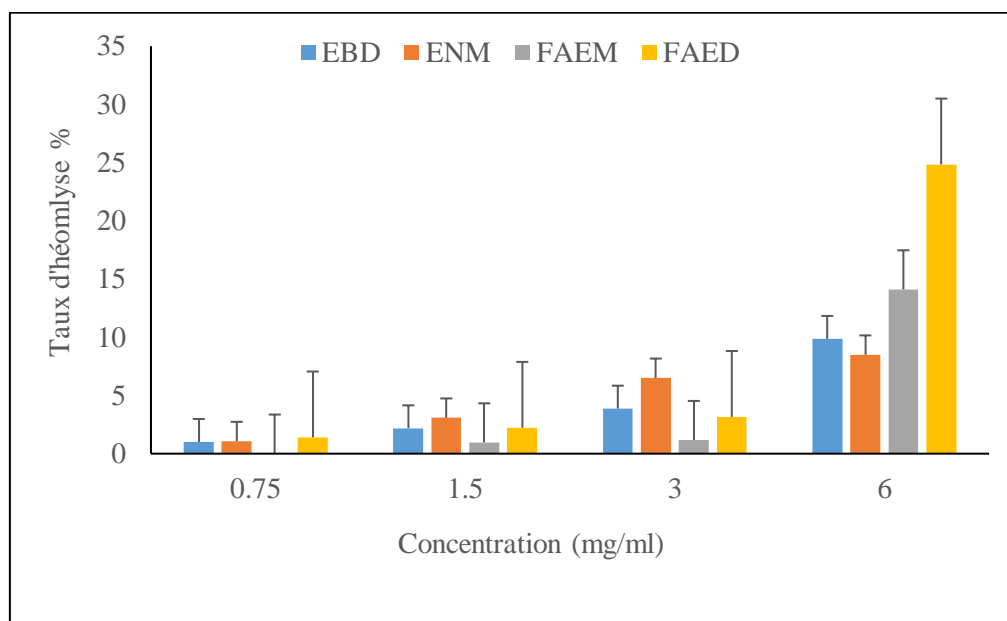
T- : témoin négatif

HT : hémolyse totale

Figure 16 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par décoction (FAED) des feuilles de *Nerium Oleander*, incubé à 37°C durant 45 min avec une suspension érythrocytaire.

Au temps initial (T0), nous avons observé des valeurs d'absorbance faibles qui n'ont pas dépassé le 0,32 en présence d'une concentration de 6 mg/ml de la fraction acétate d'éthyle récupérés de l'extrait brut préparé par décoction (FAED) des feuilles de *Nerium Oleander*. En revanche, après 45 minutes d'incubation, nous avons constaté une augmentation des absorbances pour toutes les concentrations testées. Cette augmentation reste toujours inférieure à celle de l'hémolyse totale (**Figure 16**).

La **figure 17**, présente l'évolution des taux d'hémolyse (%) après 45 minutes dans un milieu tampon (PBS à pH 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37 ° C, en présence des différentes concentrations des extraits bruts hydrométhanolique des feuilles de *Nerium oleander L* préparés par décoction et par macération et leurs fractions acétate d'éthyle, après 45 min d'incubation avec une suspension érythrocytaire.



EBM : Extrait brut -Macération- ; **EBD** : Extrait brut -décoction- ; **FAEM** : Fraction acétate d'éthyle - Macération- ; **FAED** : Fraction acétate d'éthyle -Décoction-.

Figure 17 : Evolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations des extraits bruts hydrométhanoliques des feuilles de *Nerium oleander L* préparés par décoction (EBM) ou par macération (EBD) et leurs fractions acétate d'éthyle (FAEM et FAED), après 45 min d'incubation avec une suspension érythrocytaire.

D'après l'histogramme présenté dans la figure 17, nous avons constaté que les taux d'hémolyse ont augmenté avec l'augmentation des concentrations des extraits bruts (EBD et EBM) et leurs fractions (FAED et FAEM).

A une concentration de 0,75 mg/ml, nous avons enregistré un taux d'hémolyse très faible qui ne dépasse pas $1,39\% \pm 0.6$. A une concentration de 6mg/ml, nous avons noté une augmentation des taux d'hémolyses pour tous les extraits étudiés : EBM, EBD, FAEM et FAED avec des taux d'hémolyse de l'ordre de 8,48% ; 9,86% ; 14,10% ; 24,84%, respectivement, après 45 min d'incubation avec une suspension érythrocytaire.

La fraction d'acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction (FAED) a enregistré le taux d'hémolyse le plus élevé, à une concentration de 6 mg/ml, de l'ordre de 24,84%.

Discussion

Les plantes médicinales ont été utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques depuis des siècles. Elles présentent plusieurs avantages tels que leurs accessibilités, leurs faibles coûts (**Smith, 2021**). De plus, Elles sont riches en composés bioactifs, ce qui leur confère un potentiel pour le développement de nouveaux médicaments en raison de leurs diversités chimiques et de leurs capacités à cibler plusieurs voies biologiques différentes (**Li et al., 2022**).

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle connue sous le nom de *Nerium oleander L* (Defla).

Nerium oleander est une plante de la famille des Apocynacées, originaire de la région méditerranéenne. Malgré sa toxicité, *Nerium oleander* est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, notamment les maladies cardiaques, les infections et les inflammations (**Siddiqui et Mahmood, 2015**).

Nous avons entrepris une étude visant à effectuer une analyse phytochimique sur plusieurs préparations d'extraits bruts hydrométhanoliques préparés par décoction et macération et leurs fractions acétate d'éthyle issues des feuilles de *Nerium oleander*. Dans le cadre de cette étude, nous avons également mesuré la quantité de composés phénoliques et flavonoïdes présents et recherché d'un éventuel effet hémolytique des différentes concentrations des extraits préparés.

L'étude phytochimique des différents extraits bruts hydrométhanoliques préparés par décoction et macération a révélé la présence : des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des saponines, des terpénoïdes et des composés réducteurs dans les deux préparations. Tandis que les quinones libres et les anthraquinones sont absentes dans cette analyse pour les deux préparations.

Les résultats de notre étude sont cohérents avec ceux précédemment rapportés dans la littérature, tels que présentés dans les travaux de **Navya et al., (2021)** et **Bametaet al., (2017)** qui ont confirmé la présence des tanins, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes et terpénoïde, des feuilles de *Nerium oleander* préparées par décoction et macération. De même, **Bachiri-Abbes (2016)** a marqué la présence de composés réducteurs dans les extraits hydrométhanoliques préparés par décoction et macération des feuilles de *Nerium oleander*. Ils ont souligné l'absence des quinones libres et les anthraquinones.

Les résultats obtenus à travers la méthode de Folin-Ciocalteu pour la quantification des polyphénols totaux et la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl₃) pour la quantification des flavonoïdes ont démontré que la fraction d'acétate récupérée de l'extrait préparé par décoction

renferme les teneurs les plus élevées d'ordre de $270 \pm 0.028 \mu\text{g EAG} / \text{mg ES}$ en polyphénols totaux ; et $148,14 \pm 0.01 \mu\text{g EC} / \text{mg ES}$ en flavonoïdes.

Ces résultats obtenus sont supérieurs par rapport à ceux obtenus par **Ayouaz et al., (2023)** qui ont marqué une teneur en polyphénols de d'ordre de $136.54 \pm 3.32 \mu\text{g EAG} / \text{mg MS}$ pour l'extrait préparé par macération ; et ceux obtenus par **Bekkar et Zerrad (2019)** qui ont marqué une teneur en flavonoïdes de l'ordre de $100 \mu\text{g EC/mg MS}$ pour l'extrait préparé par décoction

La toxicité d'une substance pour l'organisme est influencée par plusieurs facteurs tels que sa nature, la dose administrée et la durée d'exposition.

L'évaluation des effets toxiques des plantes médicinales à des doses élevées a motivé notre étude de l'effet hémolytique, *in vitro*, des feuilles de *Nerium oleander L.*, sur des suspensions érythrocytaires isolées.

Nous avons opté pour les globules rouges en tant que modèle en biologie cellulaire pour l'étude de la cytotoxicité, *in vitro*, en raison de leurs facilités d'isolement et de leurs simplicités moléculaires.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des taux d'hémolyse faible d'ordre de 24,848% ; 14,10% ; 9,86% et 8,48 % par rapport à l'hémolyse total, après 45 min d'incubation des érythrocytes dans un tampon PBS (pH=7,4 \pm 0,2) en présence d'une concentration de 6mg/ml de fraction acétate d'éthyle préparé par décoction (FAED) , fraction acétate d'éthyle préparé par macération (FAEM) , Extrait brut-décoction (EBD) , Extrait brut-macération (EBM), respectivement, des feuilles de *Nerium oleander*.

Ces résultats sont comparables par rapport aux ceux de **Cotacachi (2020)** et qui a enregistré des taux d'hémolyses d'ordre de 13,72 % pour l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction des feuilles de *Nerium oleander* à une concentration de 50mg/ml.

Par contre, ces taux sont élevés par rapport à ceux obtenus par **Bekkar et Zerrad (2019)** qui ont enregistré un taux d'hémolyse très faible d'ordre de 2,51 % pour l'extrait hydrométhanolique préparé par macération des feuilles de *Nerium oleander*.

Takagi et al (2014) ont montré que les saponines extraites des feuilles de *Nerium oleander* avaient des activités hémolytiques et cytotoxiques importantes. Cela signifie que les saponines étaient capables de détruire les globules rouges et d'exercer une toxicité sur les cellules.

Les effets toxiques du *Nerium Oleander* sont principalement liés à ses effets inhibiteurs sur la pompe Na⁺-K⁺ ATPase dans la membrane cellulaire. Cependant, le mécanisme moléculaire exact impliqué dans la toxicité du laurier-rose n'est pas clair (**Farkhondeh et al., 2020**).

Bien que le *Nerium oleander* présente des activités biologiques potentielles intéressantes anti-inflammatoire, antiparasitaire, anticancéreuse, il est important de noter sa toxicité et de faire preuve de prudence lors de son utilisation.

Conclusion

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis des millénaires pour leurs propriétés curatives et thérapeutiques. Ces plantes, souvent cultivées dans des jardins botaniques ou récoltées à l'état sauvage comme notre plante *Nerium Oleander L* qui appartient à la famille des Apocynacées ; et est un arbuste très commun dans toute l'Algérie.

Dans notre étude, nous avons entrepris une recherche visant à explorer les propriétés de cette plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle en vue de sa valorisation.

Sur la base des résultats obtenus, nous avons pu conclure que les feuilles du *Nerium oleander L* (laurier rose), récoltées dans la région de Zenata (Wilaya de Tlemcen), sont riches en alcaloïdes, en tanins, flavonoïdes, saponines, terpénoïdes et de composés réducteurs. Ces composés confèrent à la plante une valeur thérapeutique et médicinale importante.

Le dosage des composés phénoliques de cette plante a révélé que la fraction d'acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction est la plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des teneurs d'ordre de 270,5 µg EAG / mg ES et 148,14 µg EC / mg ES, respectivement.

Le test d'hémolyse *in vitro* a été effectué sur une suspension d'érythrocytes isolés du sang humain et incubés pendant 45 min dans un milieu tampon PBS (pH 7,4), en présence des différentes concentrations des extraits bruts hydrométhanoliques des feuilles de *Nerium Oleander L*, préparées par macération et décoction et leurs fractions d'acétate d'éthyle. Les résultats obtenus ont indiqué que cette plante avait une incidence sur l'hémolyse, À de faibles concentrations, la fraction acétate d'éthyle obtenue par décoction a démontré une toxicité négligeable envers les globules rouges. Cependant, à une concentration de 6 mg/ml, cet extrait a révélé une toxicité importante, avec un taux d'hémolyse d'environ 24,84% après une incubation de 45 minutes. En revanche, les autres extraits testés ont tous montré une faible toxicité envers les globules rouges qui ne dépasse pas 10%.

Ce travail demeure à un stade préliminaire et représente simplement la première étape dans la recherche des composés responsables de la toxicité. Il serait judicieux de poursuivre cette étude en approfondissant les investigations par :

- Etude de la cytotoxicité, par une étude approfondie de mécanisme de la pompe Na⁺/K⁺.
- Etude phytochimique approfondie sur les composants actifs de la plante.
- Recherche des activités biologiques des extraits et des molécules identifiées.

Références bibliographiques

A

1. **Almahy, H.A., & Khalid, H.E. (2006).** Chemical examination of the leaves of *Nerium oleander*. Asian Journal of Plant Sciences, 3(2), 177-180.
2. **Angiosperm Phylogeny Group.(2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161(2), 105-121.
3. **Arab, H. A., El-Sayed, M. M., & El-Rahman, S. S. (2011).** Analgesic and anti-inflammatory activities of *Nerium oleander* leaves extract. Journal of Basic and Applied Scientific Research, 1(7), 1060-1065.
4. **Assia, B., Abdelkader, A., Fatiha, C., Taibi, A., Guenaia, A., Kerzabi, R., & Belmamoun, A. R. (2022).** Phytochemical Screening and Antioxidant Properties of *Nerium oleander* growing in Algeria. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, C. Physiology & Molecular Biology, 14(2), 523-528.
5. **Ayouaz, S., Arab, R., Mouhoubi, K., & Madani, K. (2023).** *Nerium oleander L* in: A review of chemical, pharmacological, and traditional uses. Journal of Basic Research in Engineering and Science, 7(1), 16-27. doi: 10.37871/jbres1720.

B

6. **Bachiri-Abbes A. (2016).** Contribution à l'étude de l'effet des plantes médicinales sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat de Wistar. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie. Faculté SNV-STU. Université de Tlemcen(Algérie).
7. **Bandara, V., Weinstein, S. A., White, J., & Eddleston, M. (2010).** Review of the natural history, toxicology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. Toxicon, 56, 273-281.
8. **Bekkar, R., & Zerrad, F. (2019).** Étude phytochimique et recherche de l'effet hémolytique des extraits isolés des feuilles de *Nerium oleander L*. Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen.
9. **Bhattacharya, S., Mondal, S., & Chakraborty, D. (2021).** Toxicity of Medicinal Plants: Current Status of Knowledge and Future Perspectives. Pharmacognosy Reviews, 15(30), 49-56.

10. **Bogusz, S., et al.** (2020). *Nerium oleander* - a toxic plant with potential medicinal properties. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 74(0), 1704-1709.
11. **Bonet Julve, P.** (2014). La pensée latérale dans l'art contemporain. Josefa Tolrà, médium et artiste (1880-1959). *Archives*, 2(3).
12. **Bouasla, A., El-Amrani, M., & Khemici, O.** (2019). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of common diseases in Algeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 244, 112103. doi: 10.1016/j.jep.2019.112103.
13. **Boumediou, A., & Addoun, S.** (2017). Etude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques, en médecine traditionnelle, dans la ville de Tlemcen (Algérie). Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen.
14. **Bruneton, J.** (1996). *Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. Édition Lavoisier, Paris : 529.

C

15. **Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S.** (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
16. **Cotacachi Latacumba, P. E.** (2020). Identification de l'oléandrine et d'autres cardénolides avec une activité anticancéreuse dans les extraits méthanoliques de plantes de la famille des Apocynaceae (Diplôme d'ingénieur en biotechnologie, Faculté des sciences de la vie). Tena, Napo, Équateur.

D

17. **Dampier, C., Palermo, T. M., Darbari, D. S., Hassell, K., Smith, W., Zempsky, W., & Lanzkron, S.** (2020). A phase 1/2 study of voxelotor in pediatric and adolescent patients with sickle cell disease. *Blood*, 136 (Supplement 1), 27-29.
18. **Delille, L.** (2007)- *Les plantes médicinales d'Algérie*, Berti éditions, pp. 141-142.
19. **Dey, P.** (2020). The pharmaco-toxicological conundrum of *oleander*: Potential role of gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110422.
20. **Doe, J.** (2023). Les plantes médicinales : une source précieuse de composés bioactifs. *Revue scientifique internationale*, 45(2), 112-130.

E

21. **Ekor, M.** (2013). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177. doi: 10.3389/fphar.2013.00177.
22. **Elkady, A. I.** (2021). Chemical Composition and Biological Activities of *Nerium oleander* L.: A Review. *Molecules*, 26(1), 132.

F

23. **Farkhondeh, T., Kianmehr, M., Kazemi, T., Samarghandian, S., & Khazdair, M. R.** (2020). Toxicity effects of *Nerium oleander*, basic and clinical evidence: A comprehensive review. *Review Hum Exp Toxicol*, 39(6), 773-784. doi: 10.1177/0960327120901571.
24. **Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z.** (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 64(2), 159-164.
25. **Flesch, F.** (2005). Intoxication d'origine végétale. Plant poisoning. Centre antipoison, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg cedex, France.
26. **FNAEC (Flora of North America Editorial Committee).** (2015). *Nerium oleander*. In *Flora of North America North of Mexico* (Vol. 6, pp. 540-541). Oxford University Press.
27. **Frohne D., Pandere H.J.** (2005). Poisonous plant. 2-nd edition. A handbook for doctors, pharmacists, toxicologists, biologists and veterinarians. Manson publishing, Londres: 469.

G

28. **Guo- Xiang Li et Zai-Qun Lui** (2007). The "Double-Faced" Effect of VC-12 on FreeRadical-InducedHaemolysis of Human Erythrocytes :Antioxidant and Prooxidant

H

29. **Hammiche V., Merad,R .,Azzouz M.**(2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. © Springer-Verlag France, Paris.P :57-60.
30. **Harborne, J. B.** (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (3rd Ed.). Chapman and Hall.

31. **Harborne, J. B., & Williams, C. A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
32. **Hussain M A et Gorsl MS** (2004)- Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn. *Asian Journal of Plant Sciences*3. Vol 2, P 177-180.

J

33. **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J.** (2002). *Botanique systématique* (p. 366)..

K

34. **Kacha,F**(2020), Hémolyse, support du cours .
35. **Kumar, T. S. S.** (2020). Toxicité des plantes : mécanismes et impact sur la santé humaine. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(6), 2239-2249.

L

36. **Lewonczuk W.** (2004). Intoxication des animaux par le laurier rose (*Nerium oleander L.*). Etude de cas cliniques. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse.
37. **Li, Y., Liu, J., Wang, Y., Yang, M., & Xie, Y.** (2022). Current status and future prospects of natural products-based drug discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 225-241. <https://doi.org/10.1016/j.apsb>
38. **Loukkas, A.** (2006). Atlas des parcs nationaux algériens. Edition Diwane, 87-88.

M

39. **Mahmoudi Y.** (1987). La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie. Blida, Edition ANES. Palais du livre ; 01 :105.
40. **Mohan, V.** (2006). Preparation of phosphate buffer. *Journal of Biosciences*, 31(3), 405-410.
41. **Molanouri Shamsi, M., Rahimi-Esboei, B., Ebrahimi, S., Shamsi, M., Shokoohinia, Y., & Karami, F.** (2018). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of *Nerium oleander L.* extract on common microorganisms. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(1), e62114.

42. **Mouffouk, F., Aboufatima, R., & Oussama, A.** (2013). Phytochemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Nerium oleander* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(10), 795-801.
43. **MSD (Merck & Co., une compagnie pharmaceutique américaine)** (2023) **Manuel MSD pour les professionnels de la santé** -<https://www.msmanuals.com/fr/Hémolyse>".consulté le 28 mars 2023.

N

44. **Navya, Y. L., Nimisha, & Ramanjaneyulu, K.** (2021). Pharmacognostic, phytochemical screening study and anthelmintic activity of *Nerium oleander* leaves. *American Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 8(8).

O

45. **Ojewole, J. A.** (2006). Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extracts of leaves, stem bark and root bark of *Nerium oleander L.* (Apocynaceae) in mice and rats. *Phytotherapy Research*, 20(5), 391-399.
46. **OMS (Organisation mondiale de la santé)** (2019). Traditional, complementary and integrative medicine. https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1
47. **Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.** (2020). The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture. <https://www.fao.org/state-of-biodiversity-for-food-agriculture/en/>

P

48. **Peyrard, T., Bardiaux, L., Krause, C., & Van Dorsselaer, A.** (2016). Hémolyse pathologique : diagnostic biologique et moléculaire. *Revue Francophone des Laboratoires*, (479), 69-76.

S

49. **Sébahoun, G.** (2006). Toxicologie in vitro. Paris, France : Tec & Doc Lavoisier.
50. **Sharma, R., Singh, S., Tewari, N., & Dey, P.** (2023). A toxic shrub turned therapeutic: The dichotomy of *Nerium oleander* bioactivities. *Toxicon*, 224, 107047.

51. **Siddiqui, S., & Mahmood, A.** (2015). *Nerium oleander* : A toxicological review. Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews, 33(1), 77-96. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1002991>
52. **Siddiqui, S., Begum, S., Hafeez, F., & Siddiqui, B. S.** (1989). Two triterpenes from the leaves of *Nerium oleander*. Phytochemistry, 28, 1187-1191.
53. **Smith, J.** (2019). Biology of red blood cells: structure, function, and disturbances. Revue de la physiologie cellulaire, 35(2), 87-101.
54. **Smith, J. R., Jones, K. L., & Singh, R. K.** (2021). The potential of medicinal plants as a source of new drugs. Journal of Ethnopharmacology, 274, 114016.
55. **Srivastava, J., & Smith, N. J. H.** (1996). Biodiversity and Agriculture: Implications for Conservation and Development (Vol. 23-321). World Bank Publications.

T

56. **Takagi, H., Nagaoka, Y., Kito, M., Takeuchi, M., & Kondo, M.** (2014). Hemolytic and cytotoxic activities of saponin isolated from the leaves of *Nerium oleander*. Journal of Natural Medicines, 68(2), 388-393.
57. **Tanveer, A., Qadeer, A., Riaz, A., Shahbaz, M., Ahmad, R., & Ahmad, S.** (2017). In vitro antioxidant activity of *Nerium oleander L.* leaf extracts. BMC Research Notes, 10(1), 288.
58. **Thomas, L.** (2013). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft.
59. **Trease, G. E., & Evans, W. C.** (1989). Pharmacognosy (13th Ed.). Bailliere Tindall.

V

60. **Vermerius, W., & Nicholson, R.** (2006). Phenolic compounds biochemistry. Gainesville, USA: Springer.
61. **Viala, A., & Botta, A.** (2007). Toxicologie. Lavoisier. 2ème édition.

W

62. - www.gettyimages.fr (2022) consulté le : 29-12-2022
63. **Wang, Y., Liu, X., & Zhang, H.** (2019). Mechanisms and therapeutic targets of microvascular injury-induced hematological disorder. Cell Death & Disease, 10(3), 1-12.

Z

64. **Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W.** (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

الملخص:

الدفلة، هو نوع نباتي ذي أزهار ينتمي للفصيلة الدفلية، ويتحدّد موطنها في البحر الأبيض المتوسط. ينصب هذا العمل على اختبارات كميّة نباتية وتركيز المركبات الفينولية والبحث عن أثر انحلال كريات الدم الحمراء البشرية المعزولة للمستخلصات الخامة الهيدرومثنولية المحضّرة بالتقنيع أو الإغلاء و أجزاء أسيتات الإيثيل الخاصة بأوراق الدفلة .

سمحت لنا الاختبارات كميّة نباتية بملاحظة أنّ المستخلصات الهيدرومثنولية المحضّرة بالإغلاء أو التقنيع تحتوي على الكويدلت و العفص والفلافونيد والصابونينات والتربينات والمركبات المرجعة في حين أنّ الكينونات الحرّة هي غائبة (أو غير موجودة) .

كشفت لنا مجموع التركيزات الكميّة للبوليفينولات عن طريق استعمال كاشف فولان سيوكالتو والفلافونيد بواسطة طريقة كلوريد الألومنيوم بأنّ تفرّع أسيتات الإيثيل المسترجع من المستخلص الخام المحضّر بالإغلاء غنيّ جدًا وبمحتويات تصل إلى 270.5 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ميلليغرام مستخلص بالنسبة لمجموع البوليفينولات و 148.14 ميكروغرام مكافئ كاتشين لكل ميلليغرام مستخلص بالنسبة للفلافونيد مقارنة مع المستخلصات التي تمّ تحضيرها.

قد قدّم جزء أسيتات الإيثيل نفسها، المسترجع من المستخلص الخام الذي تمّ تحضيره بالإغلاء مفعولا هيموليتيكا مع نسبة انحلال خلايا الدم تصل إلى 24.84% مقارنة بنسبة انحلال خلايا الدم الإجمالية، ويليها تفرّع أسيتات الإيثيل المسترجع من المستخلص الخام المحضّر بالتقنيع مع نسبة انحلال خلايا الدم تصل إلى 14.10 % بعد 45 دقيقة من حضّانة كريات الدم الحمراء المعزولة في درجة حرارة قدرها 37 وهذا بوجود مستخلص يصل تركيزه إلى 2 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية : الدفلة، إختبارات فيتوكيميائية، مجموع البوليفينولات، الفلافونيد، أثر انحلال كريات الدم الحمراء.

Résumé :

Nerium oleander L (Defla) est une espèce à fleurs appartenant à la famille des Apocynacées originaire de la région méditerranéenne.

Ce travail porte sur les tests phytochimiques, le dosage des composés phénoliques et la recherche de l'effet hémolytique sur les érythrocytes humains isolées, des extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération ou décoction et leurs fractions acétate d'éthyle des feuilles de *Nerium Oleander L*.

Les résultats des tests phytochimiques, nous a permis de constater que les extraits hydrométhanoliques préparés par décoction ou macération contiennent des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des saponines, des terpénoïdes et des composés réducteurs. Tandis que les quinones libres et les anthraquinones sont absentes.

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃, ont révélé que la fraction d'acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction est le plus riche en composés phénoliques avec des teneurs d'ordre de 270,5µg EAG / mg MS pour les polyphénols totaux et 148,14µg EC / mg MS pour les flavonoïdes ; par rapport aux extraits préparés.

La même fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction a présenté un effet hémolytique avec un taux d'hémolyse d'ordre 24,84 %, par rapport à l'hémolyse totale, suivie de la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par macération avec un taux d'hémolyse de l'ordre de 14,10 %, après 45 min d'incubation des érythrocytes isolées à 37°C, en présence d'une concentration de 2 mg / ml d'extrait.

Mots clés : *Nerium oleander L*, tests phytochimique, polyphénols totaux, flavonoïdes, effet hémolytique.

Abstract:

Nerium oleander L (Defla) is a flowering species belonging to the Apocynaceae family native to the Mediterranean region.

This work focuses on the phytochemical tests, the determination of phenolic compounds and the investigation of the hemolytic effect on isolated human erythrocytes, of the hydromethanolic crude extracts prepared by maceration or decoction and their ethyl acetate fractions of the leaves of *Nerium Oleander L*.

The results of the phytochemical tests, allowed us to observe that the hydromethanolic extracts prepared by decoction or maceration contain alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, terpenoids and reducing compound. While free quinones and anthraquinones are absent.

Quantitative determinations of total polyphenols by Folin Ciocalteu method and flavonoids by AlCl₃ method, revealed that the ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by decoction is the richest with contents in the order of 270.5µg EAG / mg MS for total polyphenols and 148.14µg EC / mg MS for flavonoids; compared to the prepared extracts.

The same ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by decoction showed a hemolytic effect with a hemolysis rate of about 24.84%, compared to total hemolysis, followed by the ethyl acetate fraction recovered from the crude extract prepared by maceration with a hemolysis rate of about 14.10%, after 45 min of incubation of isolated erythrocytes at 37°C, in the presence of a concentration of 2 mg / ml of extract.

Key words: *Nerium oleander L*, phytochemical tests, total polyphenols, flavonoids, hemolytic effect.