

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département d' Ecologie et environnement



MÉMOIRE

Présenté par

Laouedj Assia & Mammad Ikram

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Toxicologie industrielle et environnementale

Thème

Evaluation de la cytotoxicité in vitro des extraits de plantes médicinales (*Moringa oleifera*, *Ephedra alata*).

Soutenu le 11/ 06 /2023, devant le jury composé de :

| | | | |
|--------------|---------------|-----|-----------------------|
| Présidente | Mme Haddam.N | MCA | Université de Tlemcen |
| Encadrant | Mr Rahoui.W | MCB | Université de Tlemcen |
| Examinatrice | Mme Mejdoub.A | MCB | Université de Tlemcen |

Année universitaire 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Avant tout, nous remercions ALLAH, le maitre des cieux et de la terre qui nous a donné de la volonté, la puissance, et de la santé afin de réaliser et d'accomplir ce modeste travail.

*« Merci nos chère parents pour tout »
notre gratitude s'adresse à Monsieur Rahoui Walid pour son encadrement , son orientation, ses conseils et la disponibilité qu'il nous a témoigné pour nous permettre de mener à bien ce travail .*

Nous exprimons nos profonds remerciements à Mme Haddam nahida Qui a accepté de présider et de juger ce travail de master.

Aussi nous remercions Mme Mejdoub Amel de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou loin dans l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Merci mon dieu

Je dédie mon travail accompagné d'un profond amour a :

A mes chers parents

Laouedj Mohamed et belghazi ouazania

Qui sont toujours été là pour moi, merci pour tous vos sacrifices pour me voir réussir. Vous êtes les plus précieux au monde et je vous jure qu'aucun mot, ni expression ne saurait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude.

Que dieu vous gardes pour moi, toujours en bonne santé.

Mon chère papa, Mohamed laouedj le roi ; la source de ma vie. La lumière de mon chemin merci papa merci pour tout j'ai les larmes à mes yeux hamdolilah ce jour-là je lève la tête de mon père devant tout le monde.

Ma mère, la reine ; mon bonheur, ma vie, merci pour tout tes prières pour ton amour hamdolilah ce jour-là je porte la joie dans votre cœur.

A mes sœurs Asma, rabia je n'ai jamais oublié tes conseils et le grand amour qui tu ma donnée, hadjer, rahma, a l'encouragement, le soutien, l'amour merci BQ. Et à mes chères nawel et hanan pour la vraie amitié.

A sellam Djamel merci d'être dans ma vie ...

Assia

Dédicaces

Je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail et la patience pour aller jusqu'au bout de parcours de mes études.

À mon cher père qui m'a toujours soutenu et conseils dans ma vie.

À ma chère mère qui a toujours été là pour moi, je la remercie pour ces encouragements et son soutien. Que dieu leurs accorde une longue vie.

A mes sœurs et mon frère,

Douaa, Hadjer, Mohammed salah

À mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui m'ont accompagné durant mon chemin d'étude.

Ikram

Résumé

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'évaluation de la cytotoxicité in vitro des extraits hydro-méthanoliques de plantes médicinales *Moringa oleifera* et de l'*Ephedra alata*, qui ont une grande importance thérapeutique dans le monde et à usage multiples. Dans la première partie de notre protocole, les extraits sont préparés par macération, le rendement d'extraction est calculé et la teneur en polyphénols totaux est déterminé. Dans la deuxième partie, on a évalué la cytotoxicité des extraits à différentes doses (250 à 5000 µg/ml) par le test d'hémolyse. Les résultats montrent que l'E. alata est plus riche en polyphénols totaux. Pour le test d'hémolyse, les extraits de plantes ne montre aucune cytotoxicité a faibles concentrations avec une dose seuil sans effet toxique de 500 µg/ml pour E. alata et de 1000 µg/ml pour de *M. oleifera*, au-delà de ces doses, l'effet hémolytique est dose-dépendant mais qui reste faible par rapport à celle de l'acide gallique.

En conclusion, l'effet cytotoxique des extraits de plantes étudiées est attribué aux composants phytochimiques qu'elles contiennent, ainsi, il est lié à la forte concentration des extraits, avec une cytotoxicité plus élevé pour E. alata.

Mots clés : *Moringa oleifera*, *Ephedra alata*, cytotoxicité, hémolyse, in vitro.

Abstract

This study is part of the evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of the hydro-methanol extracts of *Moringa oleifera* and *Ephedra alata* medicinal plants, which are of great therapeutic importance worldwide and for multiple uses. In the first part of our protocol, the extracts are prepared by maceration, the extraction yield is calculated and the total polyphenols content is determined. The second part evaluated the cytotoxicity of extracts at different doses (250 to 5000 $\mu\text{g/ml}$) using the hemolysis test. The results show that *E. alata* is richer in total polyphenols. For the hemolysis test, plant extracts show no cytotoxicity at low concentrations with a threshold no toxic effect dose of 500 $\mu\text{g/ml}$ for *E. alata* and 1000 $\mu\text{g/ml}$ for *M. oleifera*, beyond these doses, the hemolytic effect is dose-dependent but still weak compared to that of gallic acid.

In conclusion, the cytotoxic effect of the studied plant extracts is attributed to the phytochemical components they contain, so it is related to the high concentration of the extracts, with a higher cytotoxicity to *E. alata*.

Keywords: *Moringa oleifera*, *Ephedra alata*, cytotoxicity, hemolysis, *in vitro*.

ملخص

هذه الدراسة هي جزء من تقييم السمية الخلوية في المختبر لمستخلصات الميثانول المائي لنباتات *Moringa oleifera* و *Ephedra alata* الطبية، والتي لها أهمية علاجية كبيرة في جميع أنحاء العالم ولأغراض متعددة. في الجزء الأول من بروتوكولنا، يتم تحضير المستخلصات عن طريق النقع، ويتم حساب عائد الاستخراج ويتم تحديد إجمالي محتوى البوليفينول. قام الجزء الثاني بتقييم السمية الخلوية للمستخلصات بجرعات مختلفة (250 إلى 5000 غ/مل) باستخدام اختبار انحلال الدم. تظهر النتائج أن *E. alata* أغنى في إجمالي البوليفينول. بالنسبة لاختبار انحلال الدم، لا تظهر مستخلصات النبات أي سمية خلوية بتركيزات منخفضة مع عتبة عدم وجود جرعة تأثير سام تبلغ $500 \mu\text{غ/مل}$ بالنسبة لـ *E. alata* و $1000 \mu\text{غ/مل}$ بالنسبة لـ *M. oleifera*، بعد هذه الجرعات، فإن تأثير انحلال الدم يعتمد على الجرعة ولكنه لا يزال ضعيفاً مقارنةً بحمض الغاليك. في الختام، يُعزى التأثير السام للخلايا لمستخلصات النبات المدروسة إلى المكونات الكيميائية النباتية التي تحتوي عليها، لذلك فهو مرتبط بالتركيز العالي للمستخلصات، مع سمية خلوية أعلى لـ *E. alata*.

الكلمات الرئيسية: *Moringa oleifera*، *Ephedra alata*، السمية الخلوية، انحلال الدم، في المختبر.

Liste de figures :

| | |
|--|----|
| Figure 1 : <i>Moringa oleifera</i> arbre de vie | 04 |
| Figure 2 : Gousses et les graines de <i>M. oleifera</i> | 04 |
| Figure 3 : Zones au monde où pousse la plante <i>Moringa oleifera</i> | 04 |
| Figure 4 : Partie aérienne d' <i>Ephedra alata</i> | 10 |
| Figure 5 : Répartition géographique de l' <i>Ephédra alata</i> dans le monde | 11 |
| Figure 6 : Exposition à un poison | 16 |
| Figure 7 : <i>Ephedra alata</i> en poudre | 22 |
| Figure 8 : <i>Moringa oleifera</i> en poudre | 22 |
| Figure 9 : Etapes d'extraction de polyphénols | 23 |
| Figure 10 : Protocole de dosage des polyphénols | 24 |
| Figure 11 : La centrifugation | 25 |
| Figure 12 : Suspension érythrocytaire..... | 25 |
| Figure 13 : Protocole d'évaluation de la cytotoxicité des extraits de plantes par le test d'hémolyse..... | 27 |
| Figure 14 : Etapes du test d'hémolyse | 28 |
| Figure 15 : Rendement d'extraction en %..... | 29 |
| Figure 16 : Teneurs en polyphénols dans les extraits en $\mu\text{g EAG/mg ES}$ | 30 |
| Figure 17 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouge par l'acide gallique..... | 31 |
| Figure 18 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouge par moringa oleifera | 31 |
| Figure 19 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouge par Ephédra alata | 32 |
| Figure 20 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par moringa oleifera et éphédra alata. | 32 |
| Figure 21 : Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre acide gallique et <i>moringa oleifera</i> et <i>éphédra alata</i> | 33 |

Liste des tableaux :

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : La systématique de <i>M. oleifera</i> | 05 |
| Tableau 2 : Composition chimique de la graine de <i>M. oleifera</i> | 07 |
| Tableau 3 : Phytochimie de la graine de <i>M. Oleifera</i> | 07 |
| Tableau 4 : La systématique de l'Ephédra <i>alata</i> | 11 |
| Tableau 5 : La Phytochimie d'éphédra <i>alata</i> | 13 |
| Tableau 6 : Différentes formes de toxicité..... | 17 |
| Tableau 7 : Comparaison entre l'exposition aiguë ou chronique et l'effet aigu ou Chronique... | 18 |

Liste des abréviations :

Hsv : Virus herpès simplex

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion.

DL50 : Dose létale

GR : Globule rouge

Hb : Hémoglobine

Pbs : Phosphate buffered saline

GRh : Globule rouge humaine

AG : Acide gallique

M. oleifera : *Moringa oleifera*

E. alata : *Ephedra alata*

PT: Polyphénols Totaux

C- : Contrôle négatif

C+ : Contrôle positif

R : Rendement

ES : Extrait sec

EAG : Equivalent d'acide gallique

V/V : Volume par volume

µg : Microgramme

Mg : Milligramme

ml : Millilitre

Sommaire

| | |
|--------------------------|-----------|
| INTRODUCTION..... | 01 |
|--------------------------|-----------|

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|-----------|
| Chapitre I.1. Plante étudiée : <i>Moringa oleifera</i> | 03 |
| I.1.1. Description botanique : | 03 |
| I.1.2. Origine et répartition géographique : | 03 |
| I.1.3. Dénomination vernaculaire : | 05 |
| I.1.4. Usages traditionnels : | 05 |
| I.1.4.1. Usage alimentaire : | 06 |
| I.1.5. Phytochimie de la plante : | 06 |
| I.1.6. Toxicité : | 08 |
| I.1.7. Effets biologiques : | 09 |
| I.1.7.1. Effets antioxydant : | 09 |
| I.1.7.2. Effets antibactériens : | 09 |
| I.1.7.3. Effets anti-inflammatoires : | 09 |
| I.1.7.4. Effets anticancéreux : | 09 |
| I.2. Plante étudiée : <i>Ephédra Alata</i> | 10 |
| I.2.1. Description botanique : | 10 |
| I.2.2. Origine et répartition géographique : | 10 |
| I.2.3. Dénomination vernaculaire : | 10 |
| I.2.4. Usages traditionnels : | 12 |
| I.2.5. Phytochimie de la plante : | 12 |
| I.2.6. Toxicité : | 14 |
| I.2.7. Effets biologiques : | 14 |
| I.2.7.1. Effet antioxydant : | 14 |
| I.2.7.2. Effet antimicrobien : | 14 |
| I.2.7.3. Effet sur la masse corporelle : | 14 |

| | |
|---|-----------|
| I.2.7.4. Effet anti-inflammatoire : | 14 |
| I.2.7.5. Effet anticancéreux : | 14 |
| Chapitre 2 : II. Evaluation de la toxicité | 15 |
| II.1. Généralité sur la toxicologie | 15 |
| II.2. Différentes formes de toxicité : | 16 |
| II.2.1. La toxicité aiguë : | 17 |
| II.2.2. Toxicité subaiguë : | 17 |
| II.2.3. Toxicité chronique : | 17 |
| II.3. Différents types de test de toxicité : | 19 |
| II.3.1. Tests in vivo: | 19 |
| II.3.2. Tests in vitro: | 19 |
| II.3.3. Hémolysé: | 19 |
| II.3.3.1 Définition : | 19 |
| II.3.3.2 Cause d'hémolyse : | 20 |

LA PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes :

| | |
|---|----|
| 1.Préparation du matériel végétal : | 22 |
| 2.Préparation d'extraits : | 22 |
| 3.Rendement de l'extraction : | 23 |
| 4.Dosage des polyphénols totaux : | 23 |
| 5.Préparation de la suspension érythrocytaire : | 25 |
| 6.Test d'hémolyse : | 26 |
| 7.Expression des résultats : | 28 |

Résultat :

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1.Le rendement d'extraction : | 29 |
| 2.Taux des polyphénols : | 30 |
| 3.Test de cytotoxicité : | 30 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| Discussion : | 34 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Conclusion : | 37 |
| Références bibliographique : | 38 |
| Annexes : | 45 |

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner les maladies, les plantes médicinales sont considérées comme une source essentielle de matière première pour la découverte de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Les plantes médicinales sont le premier réservoir de nouveaux composés bioactifs, ils font partie intégrante de la phytothérapie qui consiste à traiter les différentes maladies par des extraits de plantes (**Jdaidi et al, 2023**).

Ces dernières décennies, la phytothérapie gagne en importance comme une alternative thérapeutique aux médicaments basées sur les molécules de synthèse, justifiant l'accroissement de la production de certaines plantes médicinales, en particulier, les plantes des milieux arides (**El khasmi, 2022**).

L'utilisation inconsidérée des plantes médicinales peut provoquer des intoxications graves parfois mortelle. En effet, les herbes vendues par les herboristes et les plantes de cueillette peuvent représenter un réel danger pour la santé. Plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels à base de plantes ont fait état de problèmes de toxicité ou d'interaction pouvant causer des échecs thérapeutiques ou des accidents (**Boumediou et Addoun, 2017**). De ce fait, l'usage doit être de manière rationnelle afin d'éviter tout type de toxicité (**Natalia vinogradova , 2023**).

Parmi ces plantes médicinales, le *Moringa oleifera*, appelé communément le moringa, un arbre originaire des régions subhimalayennes de l'Inde et dans les climats subtropicaux et tropicaux. Les différentes parties du moringa telles que les feuilles, les fleurs, les fruits et l'huile extraite des graines offrent une diversité d'usages à des fins alimentaires, thérapeutiques et cosmétiques. Ces différentes parties possèdent chacune des vertus médicinales particulières (**kutullo et al, 2023**), mais une consommation excessive peut s'avérer toxique, en effet, la toxicité des graines a été observée chez les rats à des niveaux aigus et subaigus avec un extrait méthanolique. (**Ashutosh et al, 2023**).

Ephedra alata subsp. *alenda*, est une plante très utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies. Elle contient de nombreux métabolites secondaires, dont des alcaloïdes, et parmi les principaux alcaloïdes qui composent la plante, « l'éphédrine » qui est responsable d'une part de la toxicité et d'autre part elle possède de nombreuses propriétés thérapeutiques (**KEBELI, 2016**). Des études précédentes ont montré son effet toxique a forte dose provoquant une hépato toxicité avec une nécrose massive (**song et al ,2023**).

Dans cette optique, l'objectif de cette étude est d'évaluer la cytotoxicité d'extrait hydro-méthanolique de la partie aérienne d'*Ephédra alata* et des graines de *Moringa oleifera* par le test d'hémolyse in vitro afin de déterminer les doses sans risque de toxicité.

A cet effet une synthèse bibliographique est faite, elle est divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre de notre travail va porter sur des généralités concernant les plantes médicinales étudiées.
- Le second porte sur des généralités sur la toxicologie et les tests d'évaluation de la toxicité notamment l'hémolyse.

La deuxième partie expérimentale comporte la méthodologie de travail et les différents résultats obtenus sont discutés.

Enfin, notre mémoire se termine par une conclusion générale présentant les principaux résultats de cette étude avec les perspectives.

La partie

Bibliographie

Chapitre I

Plante étudiée

I.1. Plante étudiée : *Moringa oleifera*

I.1.1. Description botanique

L'**arbre** est à croissance rapide, elle peut atteindre 7 à 12 mètres de hauteur (**Figure 1**). Le tronc est généralement droit, parfois très peu développé, il atteint 1,5 à 2 mètres de haut avant de se ramifier. Les branches poussent de manière désorganisée et la canopée est en forme de parasol (**Paula et al, 2021**).

Les feuilles, alterne et bi ou triperennees, elle se développent dans la partie terminale des branches. Elles mesurent 20 à 70 cm de long, elles sont recouvertes d'un duvet gris lorsqu'elles sont jeunes. **Les fleurs** dégagent une odeur agréable, elles sont blanches ou de couleur crème (**Attilio et al 2021**).

Les fruits forment des gousses à trois lobes qui pendent des branches, elles sont sèches, chaque gousse contient entre 12 et 35 graines (**Figure 2**). **Les graines** sont globulaires, sphériques, 1 cm de diamètre ; trois côtés, et peser environ 0,3 g en moyenne. Les graines ont un noyau brun moyen avec trois ailes pâles (**Chirania et al, 2022**).

I.1.2. Origine et répartition géographique

Originnaire des régions subhimalayennes de l'Inde et du Pakistan, *M. oleifera* est l'espèce la plus cultivée de la famille des Moringaceae (une famille monogénérique), elle était utilisée par les anciens Romains, les Grecs et les Égyptien (**Nurmaziah et al, 2022**). Aujourd'hui, il se retrouve sur trois continents et dans plus de cinquante pays tropicaux et subtropicaux (**Figure 3**) (**Leone et al.2016**).

Très résistant à la sécheresse, *M. oleifera* se retrouve dans les zones très arides comme le Sahara ; mais il préfère les climats semi-tropicaux humides. Son introduction en Afrique de l'Est a eu lieu au début du 20ème siècle par le biais du commerce et des échanges maritimes (**Foidl et al, 2001**).



Figure 1 : *M. Oleifera* (arbre de vie). (Luis ,2021).



Figure 2 : Les gousses et les graines de *M. oleifera*. (Optima, 2000)



Figure 3 : Zones au monde où pousse la plante *M. oleifera* (Trees For Life, 2013).

I.1.3. Dénomination vernaculaire

L'arbre Moringa est également appelé « arbre miracle », son nom scientifique est *Moringa oleifera* Lam. Les noms vernaculaires et autres appellations sont très nombreux et varient selon les pays, les plus courants sont les suivants : Moringa, ananambo (Madagascar), nébéday (Sénégal), saijhan (Guyane Française) (Bibi et al, 2020). Le tableau1 présente la systématique de M. oleifera (Ashutosh et al, 2023).

Tableau 1 : Systématique de M. oleifera (Ashutosh et al, 2023).

| | |
|----------------------|-----------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | Tracheobiophyta |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsysda |
| Sous – classe | Dilleniidae |
| Ordre | Capparales |
| Famille | Moringaceae |
| Genre | Moringa |
| L'espèce | Oleifera |

I.1.4. Usages traditionnels

Toutes les parties de la plante sont consommées comme nourriture ou utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de maladies inflammatoires, infectieuses, métaboliques, tumorales, respiratoires, l'arthrite, athérosclérose, soulagement de douleur...etc. (Jaja-Chimedza et al. 2017).

Les feuilles traitent l'asthme, l'hyperglycémie, la dyslipidémie, la fièvre, la toux, le choléra, l'hypertrophie du foie et de la rate, les infections, les ulcères, l'inflammation, la diarrhée, les maux de tête, les spasmes (Zahidul et al, 2021).

L'action des racines est principalement antiseptique, anti inflammatoire sédatrice, cardiotonique, potentialisateur de certains médicaments analgésiques et antidépresseurs (Louni S, 2019).

Le jus des fleurs est utilisé pour stimuler la production de lait chez les mères allaitantes et améliorer sa qualité. La tisane de fleurs est utilisée contre la grippe et la toux.

Les gousses consommées crues sont réputées vermifuges et utilisées pour traiter les douleurs articulaires.

Les graines sont utilisées pour traiter les rhumatismes, l'arthrite, les crampes, la goutte et les maladies sexuellement transmissibles (**Olson M.E., 2001**).

I.1.4.1. Usage alimentaire

M. oleifera est couramment utilisée en alimentation dans les sociétés africaines, et asiatiques. 89,29% d'utilisation dans l'alimentation humaine, les feuilles auraient une valeur nutritive pour les personnes de tout âge, elles sont utilisées pour la préparation de la sauce, très riche en vitamine, protéine et sel minéraux (**Atakpama et al, 2023**).

I.1.5. Phytochimie de la plante

Les études photochimiques menées sur *M. oleifera* ont montré la présence des polyphénols comme les tanins et les flavonoïdes. Elle contient également les protéines et des composés minéraux tels que l'azote, phosphore, calcium, magnésium, potassium, fer et sodium (**Tableau 2**). (**Pamo et al., 2014 ; Belhi et al. 2018**).

Presque toutes les parties de *M. oleifera* et de ses isolats ont été étudiées pour la recherche. Sur la base de la littérature collectée entre 2010 et 2022, plus de 90 composés ont été identifiés, dont beaucoup ont un potentiel thérapeutique. Il contenait une grande quantité de composés phénoliques, principalement des flavonoïdes, des acides phénoliques et leurs glycosides (**Tableau 3**). Des alcaloïdes, des tanins, des saponines, de l'isothiocyanate et du glucosinolates ont également été trouvés dans les feuilles de *M. oleifera* (**Mohamed et al ,2021**).

Tableau 2 : Composition chimique de la graine de *M. oleifera*. (Boukandoul, 2019).

| Composition chimique | Teneurs (g/100g de grain) |
|----------------------|---------------------------|
| Humidité | 9,7- 9,9 |
| Protéines | 33,3-36,0 |
| Lipides totaux | 38,7-41,2 |
| Cendres | 3,9-4,1 |
| Fibres | 2,9 |
| Carbohydrates | 8,7-22,1 |

Tableau 3 : Phytochimie de *M. Oleifera*. (Liu et al ,2022). (Alexandre et al, 2015)

| Familles | Composées |
|--------------------------|---|
| Flavonoïdes | Quercétine, Kaempférol, |
| Acides phénolique | Acide gallique , Acide férulique , Vanilline, Acide caféïque, L'acide ellagique, Moringine, Catéchine |
| Saponines | Elles sont constituées d'un aglycone dérivé de l'isoprénoïde, appelé génine ou sapogénine |
| Tanins | des composés phénoliques solubles dans l'eau qui se lient et précipitent les alcaloïdes. |
| Glucosinolates | Hydroxybenzyl glucosinolates , benzyl glucosinolates |
| Isothiocyanates | Benzyl isothiocyanates |
| Alcaloïdes | marumoside A, marumoside b, l'acetate , moringine , moringinine |
| Stéroïdes | β -sitostérol, β -Sitosterone |
| Autres | Glycérol-1-, Mthionine, Cystéine , Moringine |

I.1.6. Toxicité

La consommation excessive du *M. oleifera* peut entraîner des effets secondaires indésirables. Des symptômes tels que des nausées, des vomissements, des diarrhées et des maux d'estomac ont été signalés chez les personnes consommant des doses élevées de *M. oleifera*, il faut pouvoir discerner les parties de moringa propres à la consommation. Les feuilles fraîches peuvent également causer des distensions gazeuses abdominales si elles sont ingérées en grande quantité. Les femmes enceintes ou en allaitement doivent consulter un médecin avant de consommer du *M. oleifera*, surtout si elles n'en connaissent ni l'origine, ni la dose préconisée dans leur cas particulier.

A partir de ces constatations, des études ont été menées pour évaluer le potentiel toxique de la plante. Une étude a été menée chez des rats pour évaluer le potentiel de toxicité aiguë de la poudre de feuilles de *M. oleifera*, elle a révélé que l'administration orale de feuilles séchées jusqu'à 2000 mg/kg n'avait aucun effet nocif ou mortel sur le corps humain, de plus, les expériences menées pour les études aiguës et subaiguës ont indiqué que l'extrait d'écorce de tige n'a causé aucun effet toxique jusqu'à 2000 mg/kg (**Ashutosh et al, 2023**). La plupart des publications rapportent que *M. oleifera* n'a pratiquement aucune toxicité. Cela pourrait également être dû au fait que très peu d'études de toxicité ont été menées à ce jour (**Rong liu et al, 2022**).

D'autre part, une toxicité des graines de *M. oleifera* a été observée chez les rats à des niveaux aigus et subaigus avec un extrait méthanolique, l'étude a révélé une toxicité aiguë à une dose de 4 000 mg/kg, tandis qu'une mortalité a été observée à une dose de 5 000 mg/kg. (**Ashutosh et al, 2023**). En effet, Les graines de *M. oleifera* contiennent des composés toxiques tels que l'isothiocyanate de benzyle et la lectine. Ces composés peuvent causer des effets indésirables tels que des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales chez les consommateurs (**Fahey, 2005**). Les racines de *M. oleifera* contiennent des alcaloïdes toxiques tels que la spirochine et la moringine. Ces alcaloïdes peuvent causer des effets indésirables tels que des convulsions, des tremblements et même la mort chez les consommateurs, **kasolo et al, 2011** ont montré que l'extrait méthanolique des racines a provoqué des lésions au niveau des reins et du foie des porcs d'Inde.

I.1.7. Effets biologiques

I.1.7.1. Effets antioxydant

M. oleifera contient des anti-oxydants comme les flavonoïdes et de l'acide ascorbique dans les feuilles, les fleurs et les graines. Des études ont montré que la plante est riche en polyphénols, ce qui lui donne une grande capacité anti-oxydante (**Paula et al., 2021**)

I.1.7.2. Effets antibactériens

M. oleifera a été décrite pour avoir des propriétés antibactériennes importantes, (**Bijal et Bhumika, 2015**). Les extraits au solvant de ses composants (feuilles, fleur, pulpe et graines) été proposés pour une utilisation dans le traitement de divers troubles infectieux, seuls ou en association avec d'autres antibiotiques (**Dzotametal., 2015**).

I.1.7.3. Effets anti-inflammatoires

Selon les études précédentes, l'extrait de feuille et d'écorce montrent une activité anti-inflammatoire comparable au diclofénac. Des propriétés anti-inflammatoires de la racine ont également été rapportées (**Gurvinder et al., 2012 ; McKnight et al., 2014**).

I.1.7.4. Effets anticancéreux

M. oleifera est employée dans le traitement du cancer et présente également un potentiel chimio préventif contre les cancérigènes chimiques via la voie hépatique. L'effet anti cancérigène de plusieurs composés, à savoir l'isothiocyanate glycosylé, le carbamate de benzyle, la niazimycine et le β -sitostérol, qui ont des propriétés anti tumorales contre les cancers du poumon, du sein, de la peau, de l'œsophage et du pancréas. Ces composés se retrouvent en fortes concentrations dans les graines et les feuilles (**Paula et al 2021**).

I.2. Plante étudiée : *Ephédra Alata*

I.2.1. Description botanique

Ephédra alata subsp. *Alenda* est une espèce réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes. C'est un arbuste de 1 à 3 m de rameaux d'un vert jaunâtre, de petites feuilles opposées, réduites, soudées en gaine à leur base (Meyer et al, 2008), les fleurs en petits cônes, leurs tiges photosynthétiques toujours vertes en forme de balai (Figure 4).

I.2.2. Origine et répartition géographique

E. Alata appartenant à la famille des Ephedraceae, elle pousse principalement dans les zones désertiques d'Asie, d'Amérique, d'Europe et d'Afrique du nord (Zhang et al, 2018). En Algérie, elle se trouve dans le Sahara occidental et septentrional au niveau des terrains sableux, elle est très utilisée par la population de la région d'Ouargla (Al snafi et al, 2017).

I.2.3. Dénomination vernaculaire

Selon les herboristes et les personnes pratiquant la médecine traditionnelle, *E. alata* est appelée en Algérie Alenda ; les noms vernaculaires de la plante sont :

- Arabe: Alenda, Alanda Majana, Theel Maiz, Ephedra, Anab Bahar, Ather Jashia.
- Europe: Ephédra
- Chine : Ma Huang (Al Snafi et al, 2017).

Le **Tableau 4** représente la systématique de la plante



Figure 4 : Partie aérienne d'*Ephedra alata* (chaieb et al, 2008)

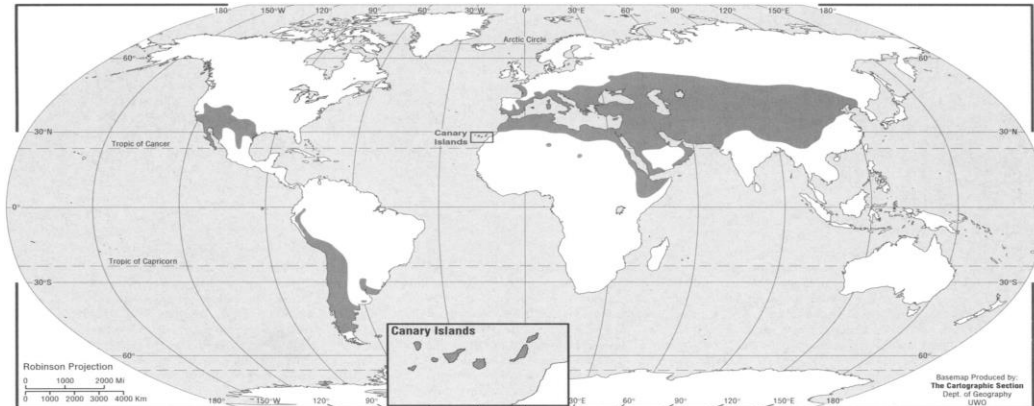


Figure 5 : Répartition géographique de l'*E. alata* dans le monde (Caveney et al, 2015)

Tableau 4 : La systématique de l'Ephédra alata (Ozenda ; 1991)

| | |
|---------------------------|---------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Gymnospermes |
| Classe | Gnetopsida |
| Ordre | Ephedrales |
| Famille | Ephedraceae |
| Genre | Ephedra |
| Espèce | Ephedraalata |
| Sous espèce | Ephedraalata alenda |

I.2.4. Usages traditionnels

E. alata est très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies, les tiges vertes sont les organes les plus utilisés à raison de 93 % et les « fruits » avec un pourcentage de 7 % Les tiges vertes séchées sont administrées sous forme de the chaud (**Hadjadj et al., 2020**). Cependant, *E. alata* a été utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter les allergies, l'asthme, la congestion pulmonaire, les frissons, les rhumes, la rhume des foins, la toux, l'œdème, la fièvre, la grippe, les maux de tête et la congestion nasal. *E. alata* joue un rôle important dans le traitement de l'infection au COVID-19 et inspire l'orientation future du traitement de la maladie par la médecine traditionnelle chinoise (**Tang et al, 2023**)

E. alata a été couramment utilisé dans les pays occidentaux pour la perte de poids corporel et l'amélioration des performances sportives. L'administration orale qui regroupe la majorité des modes de préparation : infusion, macération, décoction, tisane, poudre interne est la plus préconisée (**Ould hadj et al ,2003**).

En Algérie, elle est utilisée contre la grippe, la coqueluche, la faiblesse et les rhumes par la population de la région d'Ouargla et de l'Oued, la plante est utilisée contre les avortements, le cancer, le diabète, la toux, l'ulcère intestinaux, l'obésité et l'insuffisance rénale et cardiaque (**Hadjadj et al, 2020**).

I.2.5. Phytochimie de la plante

L'analyse phytochimique d'éphédra indique la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des polysaccharides, des saponines, et des acides phénoliques (**Tableau 5**). Ses constituants actifs comprennent principalement des alcaloïdes d'éphédra, et les composants non alcaloïdes présentent des propriétés antioxydants, immunosuppressives et hypoglycémiantes (**Tanget al, 2023**)

Tableau 5 : la Phytochimie d'*E. alata*

| Familles | Principaux composés |
|-------------|---|
| Alcaloïdes | L'éphédrine et D-pseudoéphédrine, L-noréphédrine et D-norpseudoéphédrine, L-méthyléphédrine et D-methylpseudoephedrine. Ils sont collectivement appelés éphédrine. (Tanget al,2023) E. Alata contient environ 0.5 à 2 % d'alcaloïdes du total, éphédrine forme de 30 à 90% selon les espèces (Limbert et al, 2013) . |
| Flavonoïdes | Quercétine, lutéoline et la rutine (Tanget al, 2023) . |
| Tannins | On trouve les tanins hydrolysables et les tanins condensés, ces tanins localisent dans tous les organes comme les feuilles et les fleurs (Jean-autoine, 2017) . |
| Glucides | Largement distribués dans les tiges. La composition en monosaccharides montre que le glucose est le sucre le plus abondant (43.1%), le galactose (36.4%), le mannose (14.9%) (Soua et al, 2020) |

I.2.6. Toxicité

L'utilisation des produits contenant d'éphédra a également été associée à des effets néfastes sur la santé chez certaines personnes, les effets secondaires sont aggravés par son mauvais usage. La partie aérienne constitue la partie toxique de l'éphédra. Elle contient l'éphédrine qui est l'alcaloïde majoritaire de cette plante (40 à 90% des alcaloïdes totaux) (Phinney et al, 2005)

I.2.7. Effets biologiques

I.2.7.1. Effet antioxydant

L'extrait méthanolique d'*E. alata* a montré une activité antioxydante élevée et de puissantes capacités de piégeage des radicaux libre d'oxygène. (Al Snafi et al, 2017).

I.2.7.2. Effet antimicrobien

De nombreuses études ont rapporté que l'*E. alata* est une herbe antimicrobienne, différents types de bactéries et de champignons ont été étudiés. De plus, *E. alata* possède une activité antivirale élevée contre le HSV (virus herpès simplex) (Danciu et al, 2018)

I.2.7.3. Effet sur la masse corporelle

Une étude a montré que la supplémentation en *E. alata* inhibait fortement l'activité de lipases intestinal et pancréatique chez les rats obèses, cette diminution d'activité des enzymes digestives lipidiques a entraîné une réduction de la prise de poids. D'autre part, plusieurs études ont montré que les combinaisons éphédrine /caféine étaient modérément efficaces pour la perte de poids à court et à long terme (Al Saidi et al, 2022).

I.2.7.4. Effet anti-inflammatoire

Des études antérieures ont montré l'effet anti-inflammatoire d'*E. alata*, cet effet est dû aux polysaccharides et à l'éphédroxane présents dans la partie aérienne de la plante (Dephne et al, 2020).

I.2.7.5. Effet anticancéreux

Des études ont montré que l'extrait méthanolique d'*E. alata* après fractionnement avec de l'acétate d'éthyle et du butanol avait une activité anti tumorale significative chez les atteintes d'un cancer de la peau, et il a montré un effet inhibiteur sur la croissance tumorale dans le corps (Zhang et al, 2018).

Chapitre II

Evaluation de la toxicité

II. Evaluation de la toxicité

II.1. Généralité sur la toxicologie

Le terme toxicologie qui vient du grec poison a été créé au XVII^e siècle, C'est une discipline scientifique qui étudie la nature et les effets de sources toxiques dans l'organisme ou dans des systèmes biologiques.

La toxicologie se préoccupe des effets nocifs ou indésirables de substances ou de facteurs environnementaux sur les organismes vivants, en particulier sur l'homme pour la plupart, les composés qui en sont responsables soit n'existent pas physiologiquement dans l'organisme (xénobiotiques), soit agissent à des concentrations élevées non physiologique.

L'effet d'un toxique dépend toujours de l'espèce et de la dose, le mode de pénétration, l'état du sujet, de perturber certaines fonctions vitales, de léser gravement des structures organiques ou d'entraîner la mort selon leur origine, on distingue les toxiques synthétiques et les toxiques naturels (toxines) provenant des microorganismes, des plantes ou des animaux **(Reichl, 2004)**.

Le père de la toxicologie Paracelse (1493-1541) médecin et philosophe a largement contribué au développement de la toxicologie scientifique on lui reconnaît sa célèbre phrase « Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison ».

L'organisme est exposé à de nombreux toxiques présents dans l'environnement. Ces toxiques peuvent pénétrer dans l'organisme par trois portes d'entrée principales :

- ❖ La voie digestive, pour toute substance ingérée.
- ❖ La voie respiratoire pour les substances gazeuses, mais aussi pour les particules en suspension ou les aérosols, qui contaminent l'environnement.
- ❖ La voie percutanée pour les substances capables de traverser la peau **(Loomis, Wallacem, 1996)**.

La pharmacocinétique évalue comment le toxique est géré dans l'organisme, généralement en mesurant la concentration, sont utilisés pour caractériser l'absorption, distribution, le métabolisme, et l'excrétion (ADME) d'un composé. au contraire la pharmacodynamique est pour principal objectif de recueillir des informations sur les effets de toxique dans l'organisme **(Figure 6)**.

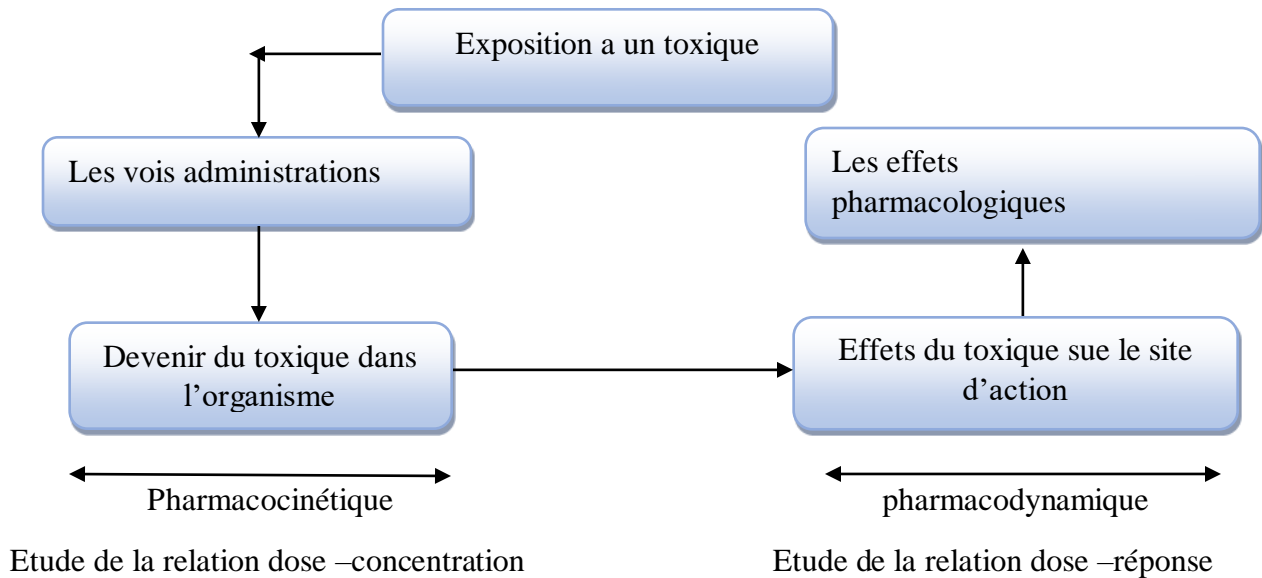


Figure 6 : Exposition à un poison (Reichl, 2004)

II.2. Les différentes formes de toxicité

On distingue en général trois formes d'intoxication suivant la rapidité d'apparition, la sévérité et la durée des symptômes, et la rapidité d'absorption de la substance toxique, une terminologie assez arbitraire, bien qu'utile en pratique, repose sur la durée de l'exposition au toxique.

La toxicité d'une substance est sa capacité à produire des effets nocifs à un organisme vivant selon la dose, la fréquence et la durée d'exposition, temps d'apparition des signes cliniques. On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité illustrées dans le tableau... :

- ❖ La toxicité aiguë.
- ❖ La toxicité à court terme (subaiguë ou subchronique).
- ❖ La toxicité à long terme (ou chronique) (Hamoudi, 2021).

-Tableau 6 : Les différentes formes de toxicité (Gilles Lapointe, 2004).

| Forme | Fréquence | Durée |
|--------------|-----------|------------|
| Aigue | Unique | <24 heures |
| Subaiguë | Répétée | 1 Mois |
| Subchronique | Répétée | 1-3 Mois |
| Chronique | Répétée | >3 Mois |

II.2.1. La toxicité aiguë

La toxicité aiguë est une exposition de courte durée par voie buccale, cutanée, ou pulmonaire d'une dose unique ou multiples ne dépassant pas 24 heures, en général les symptômes d'intoxication se développent rapidement, la mort ou la guérison surviennent sans retard (Claverie et Hedde, 2008). L'étude de la toxicité aiguë aboutit classiquement à la détermination de la dose létale 50 (DL50) qui désigne la dose d'une substance causant la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises. De ce fait, la mesure de la DL50 peut établir un classement décès substances plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxique, et l'inverse est juste.

La toxicité aiguë, même au sein d'une espèce particulière, peut varier avec des problèmes de santé ; âge ; sexe ; constitution génétique ; différences d'absorption, de distribution, de métabolisme, et l'excrétion du composé ; et l'influence (Hayes. Kruger, 2014).

II.2.2. Toxicité subaiguë

Elle correspond à l'administration répétée d'un produit, sur une période n'excédant pas 3 mois. Elle permet d'identifier l'organe ou le système sur lequel le toxique agit préférentiellement. (Hamoudi, 2021)

II.2.3. Toxicité chronique

La toxicité chronique est définie comme la preuve d'effets toxiques après administration répétée d'une substance d'essai sur une période de 90 jours ou plus. (Boukeloua, 2009).

Selon l'association du Vermont, la toxicité chronique est la capacité d'une substance à causer des effets néfastes sur la santé des humains, des animaux, des poissons et d'autres organismes vivants

sur une période prolongée ou par des expositions multiples qui se produisent sur une période de temps. (Hamoudi, 2021)

Une étude de la toxicité chronique doit permettre de déterminer :

- Le type et la nature des effets toxiques.
- La dose seuil, qui est une dose sans effet toxique.
- Le temps d'apparition des effets toxiques.

Cependant, il est souvent difficile de faire la distinction entre les expositions et les effets chronique, et il est également difficile de classer les effets spécifiques (Tableau 7). Une exposition aigue peut entraîner des effets chronique, et l'exposition et les effets ne sont pas toujours prévisibles (Reichl F.X, 2004, Max. et al, 2006).

Tableau 7 : Comparaison entre l'exposition aiguë ou chronique et l'effet aigu ou Chronique (BOUKELOUA ,2009).

| Toxicité | Exposition | Effets | Exemples |
|------------------|-------------|-------------|---|
| Aigue | Court terme | Court terme | (Ex : irritation cutanée causée par le Contact avec une solution très diluée D'acide sulfurique) |
| | | long terme | (Ex. : trouble Respiratoire persistant à la suite d'une courte Inhalation d'une forte concentration de Chlore) |
| Chronique | Long terme | Court terme | (Ex. : sensibilisation cutanée à L'éthylène diamine à la suite d'un contact pendant plusieurs années) |
| | | long terme | (Ex. : cancer du Foie, du poumon, du cerveau et du système Hématopoïétique causé par l'exposition à des Doses élevées de chlorure de vinyle pendant Plusieurs années) |

II.3. Les différents types de test de toxicité

II.3.1. Tests in vivo

Les tests in vivo nécessitent l'utilisation d'organismes vivants, notamment sur les animaux de laboratoire. Les choix se portent de préférence sur les souris, les rats, les cobayes et les lapins issus de reproduction consanguine, et dans quelques cas aussi sur d'autres mammifères. La substance à tester est administré quotidiennement par gavage. Les animaux sont suivis, des paramètres sont surveillés quotidiennement comme la réponse au toucher de la queue, salivation, horripilation, la consommation d'eau et d'aliments et le poids corporel. Parmi les tests in vivo on a le test de dose létal (DL 50), il exprime la toxicité aigüe (**Reichl, 2004**).

II.3.2. Tests in vitro

Les tests in vitro consiste à utiliser des cellules ou des tissus cultivés ou maintenus dans un environnement de laboratoire contrôlé pour examiner les propriétés toxiques de divers composés et mélanges. Cela permet en outre d'examiner la toxicité des xénobiotiques au niveau de base de la cellule sans impliquer l'interaction d'effets systémiques physiologiques complexes, qui sont souvent observés dans des organismes entiers (**Eisenbrand et al ;2002**)

II.3.3. Hémolysse

II.3.3.1 Définition

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges (GR) après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal. L'hémolyse physiologique est estimée entre 1 % et 2 % de la masse globulaire totale. Elle est essentiellement intra tissulaire (extravasculaire) et une faible partie est intravasculaire (**Thomas., 2013**). L'hémolyse pathologique ou hyper-hémolyse 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). Elle est responsable d'une anémie hémolytique, elle touche toujours un des constituants vitaux du GR (la membrane, les enzyme ou l'Hb).

La crise hémolytique (hémolyse aiguë, sévère) est rare ; elle peut s'accompagner de frissons, de fièvre, de douleurs lombaires et abdominales, d'un état de prostration et de choc. L'hémoglobinurie provoque une urine rouge ou brun rougeâtre (**Thomas, 2013**).

II.3.3.2 Cause d'hémolyse

L'hémolyse peut être causée par des facteurs intrinsèques, dans le cas où la cause est liée au GR lui-même, notamment, des défauts de production de la membrane des GR, dans la production d'Hg comme dans la thalassémie, ou bien dans le métabolisme des GR, ce sont les facteurs de l'anémie hémolytique héréditaire.

Les facteurs extrinsèques, c'est le cas de l'anémie hémolytique acquise causée par des facteurs à médiation immunitaire, tels certaines infections bactériennes et virales, ou des facteurs permanents dans le cas de l'anémie hémolytique auto-immune, les effets secondaires de certains médicaments (céphalosporines, anti inflammatoires non stéroïdes, la pénicilline et ses dérivés,...) et les agents chimiques des plantes toxiques capables de modifier l'intégrité cellulaire en induisant une réorganisation et des changement morphologiques qui résultent d'une cascade d'effets à partir de l'altération de la membrane lipidique conduisant finalement à la formation de sphéricités et par conséquent la lyse des hématies (**Mintzer et Billet., 2009 ; Hill et., 2018**).

La partie expérimentale

Matériels

et

Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche, physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (Ppabionut) à l'université Abou bekr belkaid, Tlemcen.

1. Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aeriene de la plante *E. alata*, récolté dans la région de Ourgla et les graines de *moringa oleifera* qui ont été achetées chez un herboriste à Tlemcen sous forme de graines, le séchage est fait à l'étuve à 37°C, puis le matériel végétal a été broyées pour obtenir une poudre fine (**Figure 7 et 8**), ensuite conserver jusqu'à leur utilisation dans des sachets en papier dans un endroit sec.



Figure 7 : *E. alata* en poudre



Figure 8 : *M. oleifera* en poudre

2. Préparation d'extraits

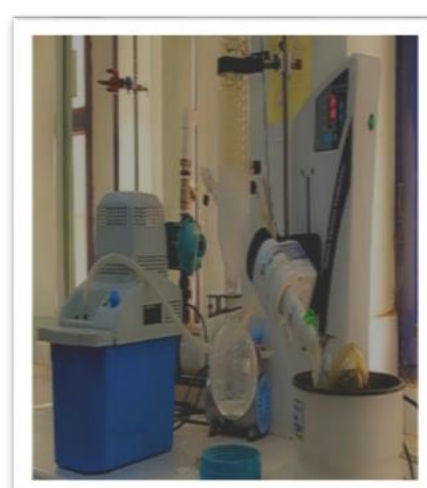
Cette étape consiste à extraire les principes actifs (polyphénols) contenus dans la plante. La méthode utilisée est celle de l'extraction par macération, 10g de la matière végétale a été soumise à une macération dans 200ml de solvant contenant méthanol /eau (70 /30 : v / v) à température ambiante et sous agitation pendant 48h. Après la macération, l'extrait est récupéré par filtration sur papier Wattman, ensuite le solvant est évaporé à 40 °C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Figure 9**).



Macération



Filtration



évaporation

Figure 9 : Les étapes d'extraction de polyphénols (**photo originale**).

3. Rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids d'extrait déterminé après évaporation du solvant, et le poids de la plante sèche soumise à l'extraction. Il est exprimé en pourcentage, il est calculé suivant la formule suivante :

$$R \% = \frac{M \text{ Ballon après évaporation} - M \text{ Ballon vide}}{M \text{ échantillon}} \times 100$$

Avec :

Masse ballon après évaporation – Masse de ballon vide : Masse de l'extrait brut (g).

Masse échantillon : Masse de matière végétale (g). (**Boubekri ; 2014**)

4. Dosage des polyphénols totaux

Principe : La détermination de la teneur en polyphénols totaux des extraits phénoliques des plantes étudiées est faite par l'utilisation de réactif de Folin Ciocalteu selon la méthode de **Wong et al, 2006** et l'utilisation des différentes concentrations d'acide gallique comme standard.

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupement hydroxyles présents dans l'extrait. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin –

Ciocalteu en un complexe ayant la couleur bleu, l'intensité de la couleur est proportionnelle liée aux taux des composés phénoliques oxydés.

✓ **Mode opératoire :**

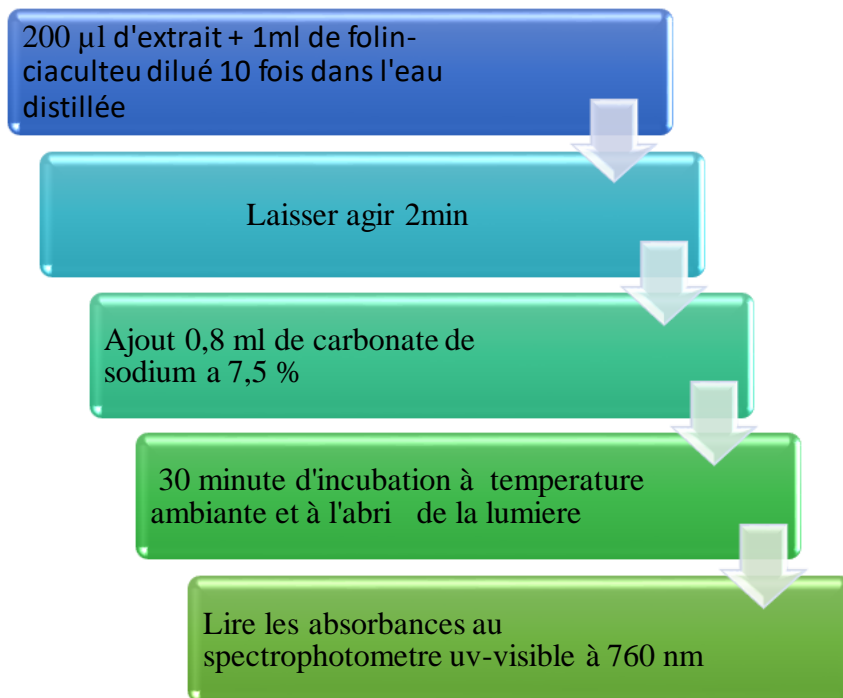


Figure 10 : Protocole de dosage des polyphénols.

La lecture de l'absorbance de chaque extrait a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc qui contient du méthanol à la place de l'acide gallique. La concentration des polyphénols totaux a été déduit à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Annexe A 1**). Le résultat a été exprimé en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$).

5. Préparation de la suspension érythrocytaire

La suspension érythrocytaire a été préparée suivant les étapes décrite par **Rani et al., 2014**, des globules rouges humaine obtenue à partir de sang frais du coude d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoires dans les « 48h » qui précèdent le prélèvement.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes à héparines. La centrifugation du sang à « 3000 rpm/10min », après élimination du surnageant, le culot est lavé 3 fois par une solution physiologique chaque lavage suspendu à nouveau dans ce même volume que le surnageant éliminer et une centrifugation à « 3000 rpm/5 min » (**Figure 11**). Après la dernière centrifugation, le culot est suspendu à nouveau dans une solution du PBS iso-salin à raison de (1 volume) du culot et (9 volumes) du PBS, permettant ainsi d'obtenir un hématoците à « 10% » (**Figure 12**).



Figure 11 : La centrifugation (photos originale)



Figure 12 : Suspension érythrocytaire (photos originale)

6. Test d'hémolyse

Le principe : Mettre en contact des hématies avec l'extrait hydro-méthanolique à différentes concentrations (250 ; 500 ; 1000, 2000, 5000 μ g/ml), dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de l'extrait, vis-à-vis des GRh.

✓ Mode opératoire

- Le test d'effet hémolytique des extraits végétaux étudiés est réalisé selon la méthode de Bulmus et ses collaborateurs (2003). Dans des tubes à hémolyse, 1,6 ml de chaque extrait et l'acide gallique est mélangé avec un volume de 0,4 ml de la suspension de GRh (10%).
- Deux contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse).
- Nous avons utilisé de l'acide gallique comme molécule de référence avec les mêmes démarches expérimentales que les extraits des plantes.
- Ces tubes sont ensuite incubés à 37 °c pendant 30 minute, après l'incubation centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min.
- La lecture de des absorbances est effectuée à 560 nm à l'aide de spectrophotomètre contre un blanc contenant du PBS.

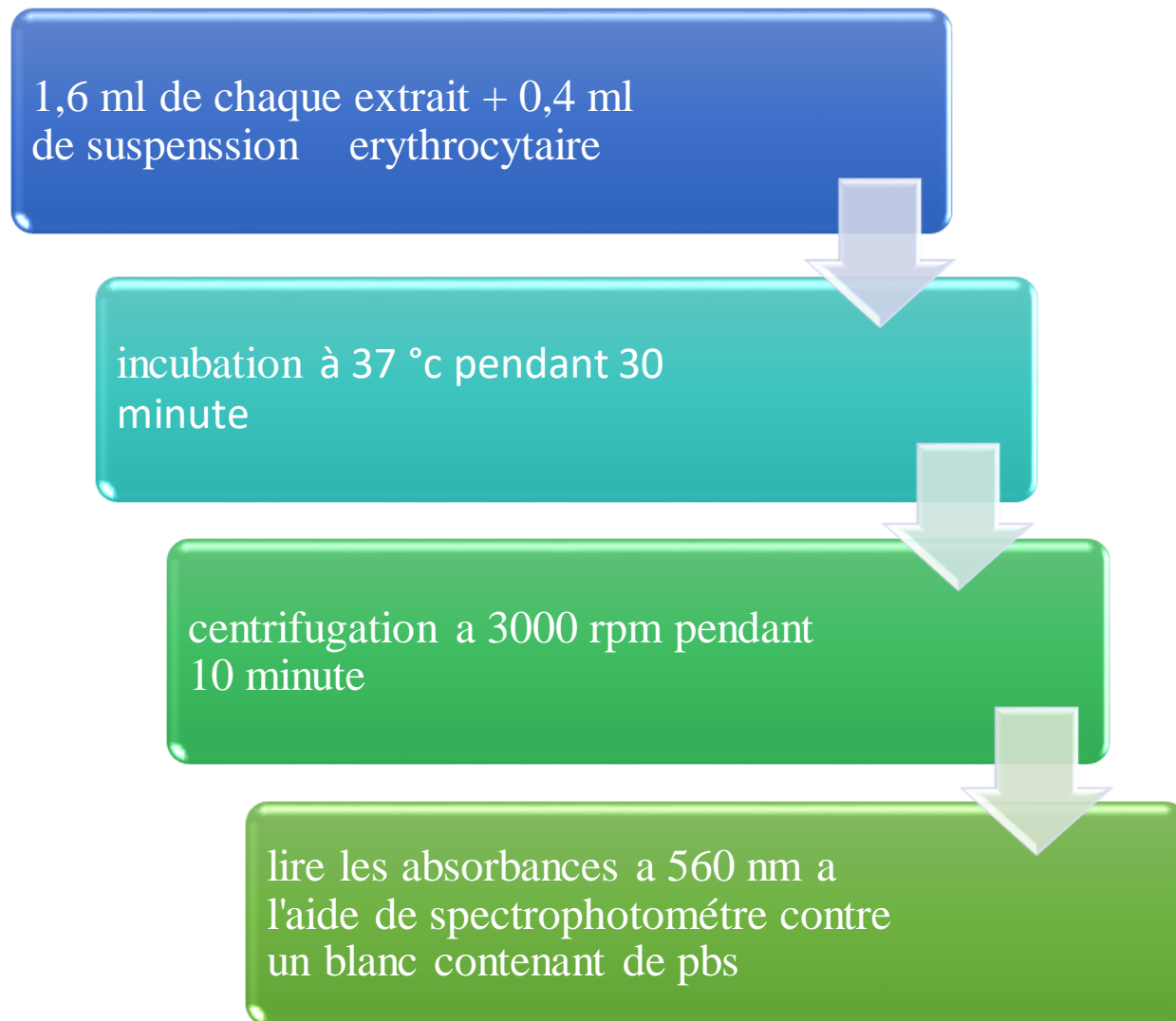


Figure 13 : Protocole d'évaluation de la cytotoxicité des extraits de plantes par le test d'hémolyse.



Figure 14 : Test d'hémolyse (photo originale).

7. Expression des résultats

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\%d'hémolyse=(AT/AC) *100$$

AC : absorbance de contrôle ; AT : absorbance de test

Résultats

ET

Interprétations

1. Le rendement d'extraction

Après l'extraction et la récupération des extraits, son rendement a été déterminé par rapport à la matière végétale sèche, exprimé en pourcentage et représenté dans la **figure 15**.

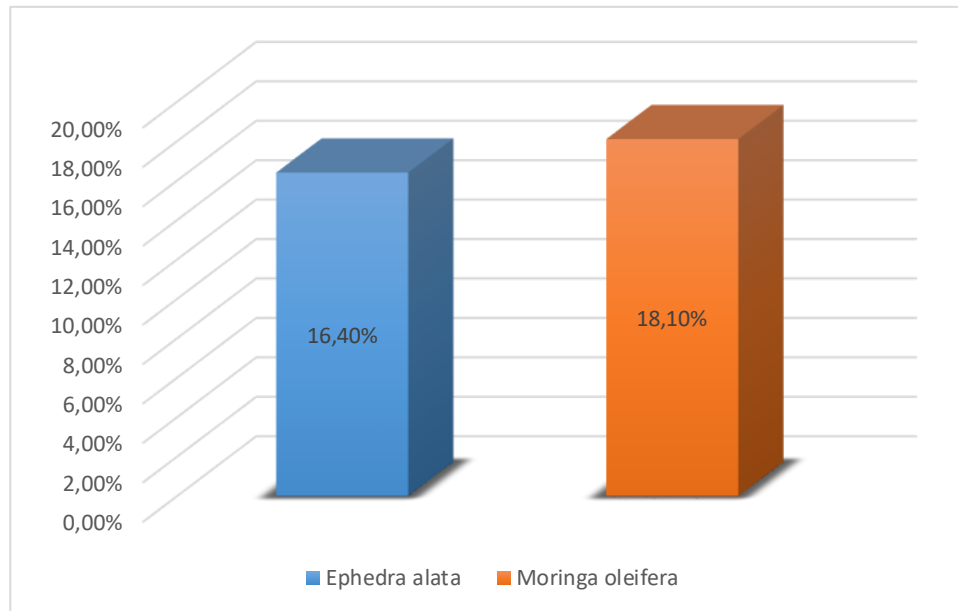


Figure 15 : Rendement d'extraction en %.

Les résultats montrent que les plantes *M. oleifera* et *E. alata* renferment un rendement important en polyphénols totaux, l'extrait de graines de *M. oleifera* a donné un rendement de 18,10%, plus élevé par rapport à l'extrait de la partie aérienne d'*E. alata* qui a donné un rendement de 16,40%.

2. Taux des polyphénols

La quantité des polyphénols totaux dans les extraits est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAG/mg ES}$). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 16**.

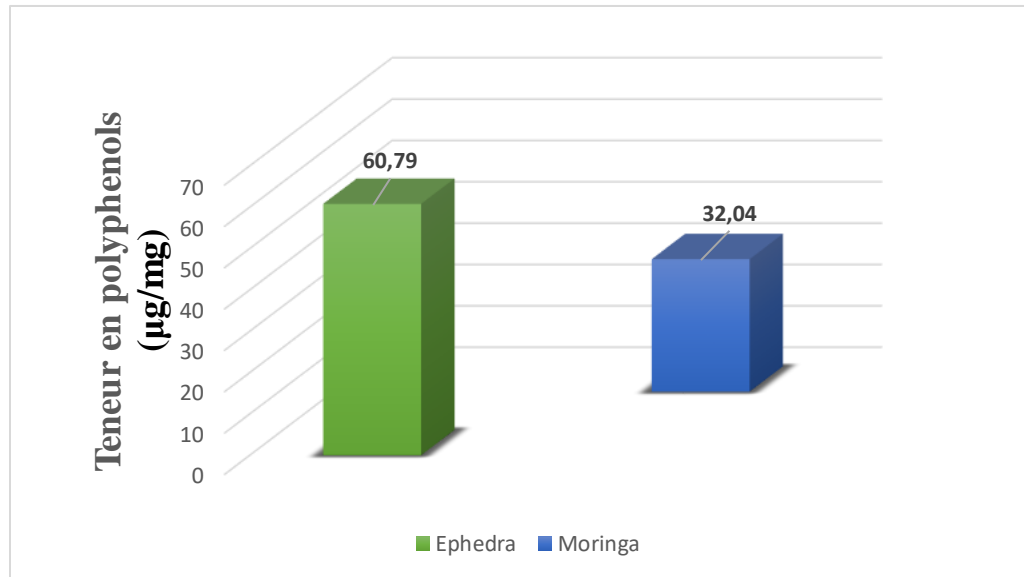


Figure 16 : Teneurs en polyphénols dans les extraits en $\mu\text{g EAG/mg ES}$.

Les résultats montrent que les plantes étudiées sont riches en polyphénols, l'extrait d'E.alata contient une forte teneur en polyphénols ($60,79 \mu\text{g EAG/mg ES}$) par rapport à celle de l'extrait de M. oleifera ($32,04 \mu\text{g EAG/mg ES}$).

3. Test de cytotoxicité

Le test in vitro de cytotoxicité représentée par le pourcentage d'hémolyse des GRh est effectué en utilisant des GRh d'un volontaire sain en bonne santé.

Différentes concentrations de l'extrait brute de M. oleifera et E. alata, ainsi qu'une molécule de référence, l'acide gallique, ont été testé. Pour chaque extrait on a évalué le pourcentage d'hémolyse et mesuré l'absorbance de l'Hb libérée des GRh par hémolyse, en comparaison au contrôle négatif (C-, solution de GRh dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 13,94%) et au contrôle positif (C+, solution de GRh dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes :

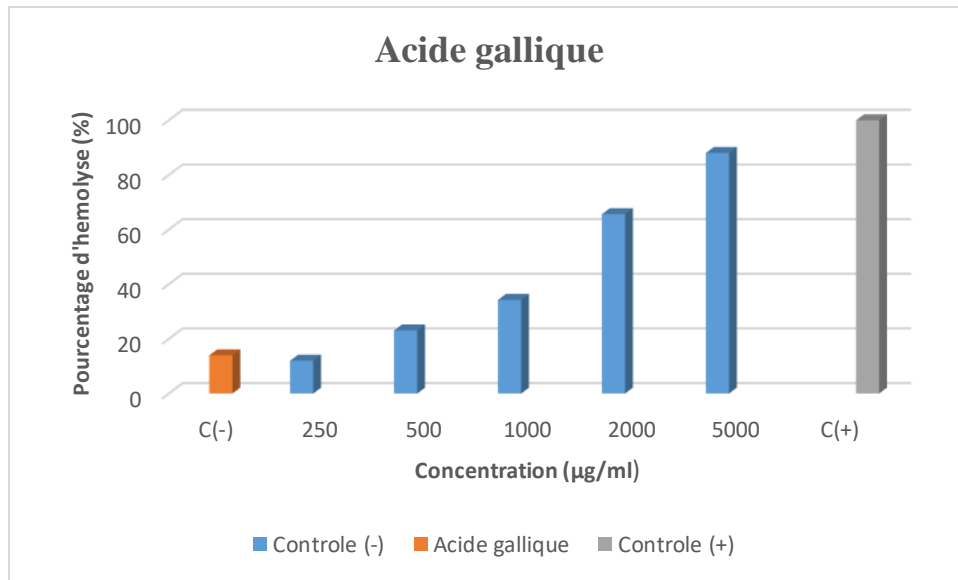


Figure 17 : Pourcentage d’hémolyse des globules rouge par l’acide gallique.

C- :13,94% ; C+ :100%

Nos résultats montrent que l’acide gallique représente un effet hémolytique faible (12,01%) à la concentration de 250 µg/ml en comparaison avec le contrôle négatif (C- :13,94%), Cet effet hémolytique augmente à un taux 23,09%, à la concentration 500 µg/ml et un taux de 34,25% à la concentration 1000 µg/ml après un taux élevé 65,61% à la concentration 2000 µg/ml et atteint un maximum de 88,02 % à la concentration 5000 µg/ml.

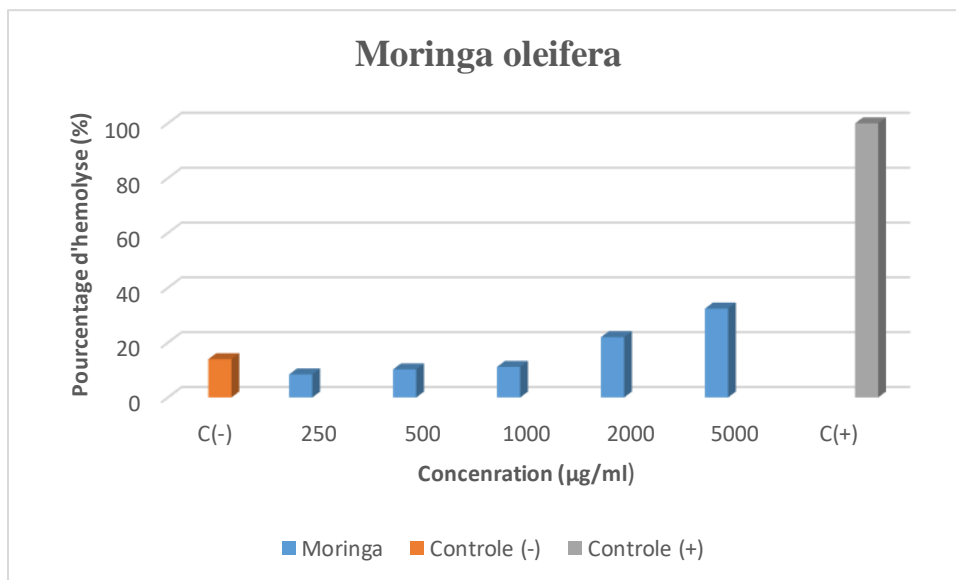


Figure 18 : pourcentage d’hémolyse des globules rouge par *M. oleifera*

C- :13,94% ; C+ :100%

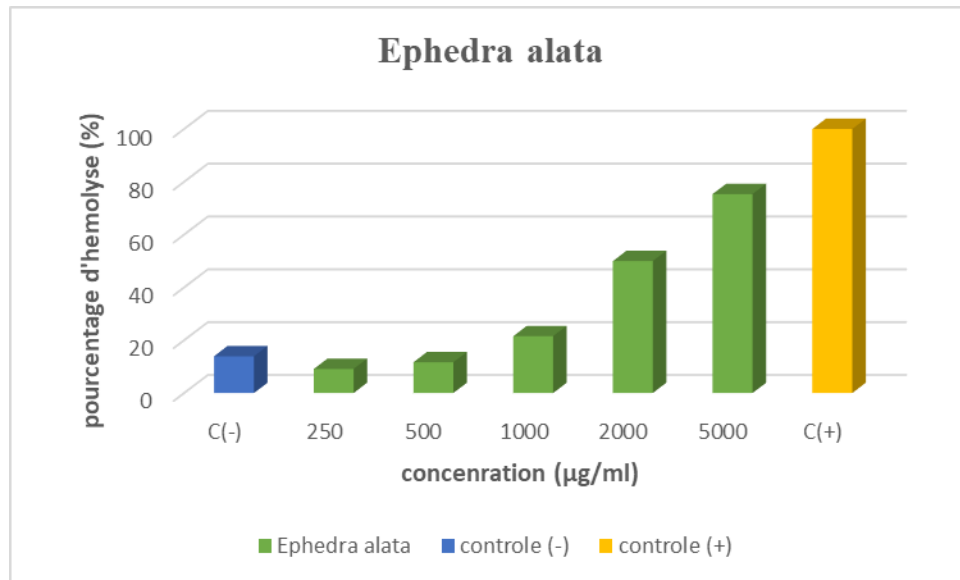


Figure 19 : Pourcentage d’hémolyse des globules rouge par *E. alata*

C- :13,94% ; C+ :100%

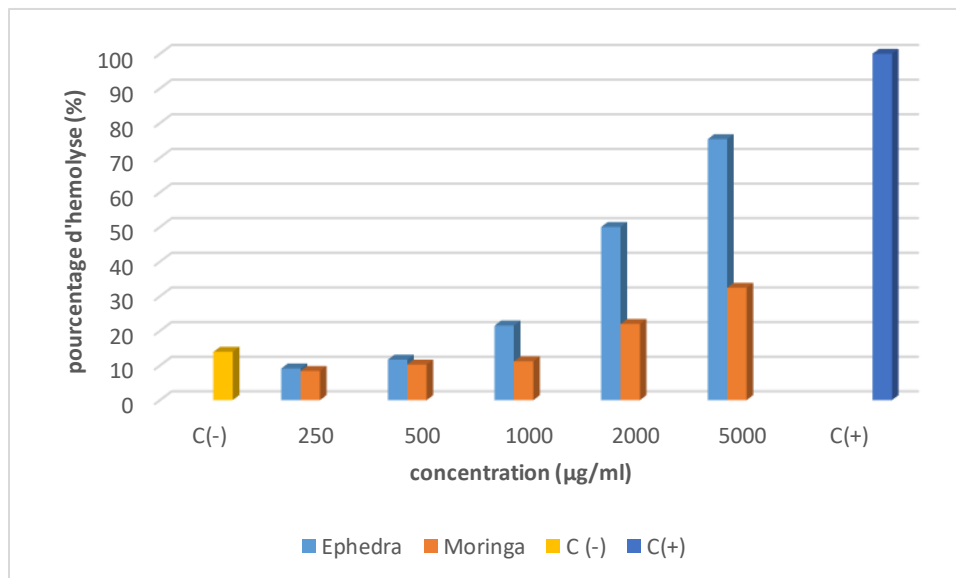


Figure 20 : Pourcentage d’hémolyse des globules rouges par *M. oleifera* et *E. alata*.

C- :13,94% ; C+ :100%

Résultats et interprétations

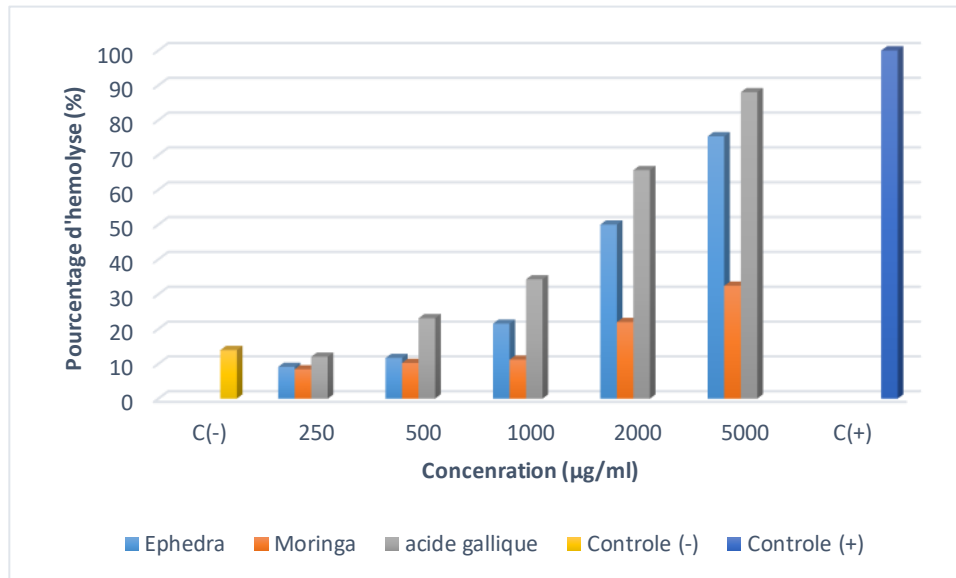


Figure 21 : Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre acide gallique et *M. oleifera* et *E. alata*.

L'extrait de *M. oleifera* montre un taux d'hémolyse des GRh faible a la concentration 250 et 500 et 1000 µg/ml (8,41% ; 10,25% ; 11,18%) compare au contrôle négatif (13,94%), ce taux augmente avec la concentration 2000 µg/ml pour atteindre (21,98%) d'hémolyse, a la concentration 5000 µg/ml un taux d'hémolyse plus important (32,40%).

L'extrait d'*E. alata* exerce un effet hémolytique léger aux concentrations 250,500,1000 µg/ml avec un pourcentage d'hémolyse qui est en moyenne de (9% à 21,53 %) et atteint 49 % à la concentration 2000 µg/ml et 75% à la concentration 5000 µg/ml.

On remarque que l'extrait de *M. oleifera* est moins cytotoxique par rapport à l'extrait d'*E. alata*.

De plus, les résultats montrent que les deux extraits exercent un effet cytotoxique faible par rapport à l'acide gallique (molécule de référence).

Discussion

Les plantes médicinales sont utilisées dans de nombreuses régions du monde pour traiter diverses maladies, elles continuent d'être largement utilisées dans leur forme originale, les données publiées indiquent qu'environ 80% de la population mondiale comptent sur la médecine des plantes (**Karunamoorthi et al, 2013**).

En Algérie, les plantes médicinales sont utilisées comme aliments et traitement pour plusieurs maladies depuis des décennies avec peu de preuves scientifiques de leur innocuité, en effet, la pratique s'est fortement appuyée sur l'expérience clinique.

La phytothérapie utilise les principes actifs de plantes ayant des propriétés pharmacodynamiques bien précises et pouvant induire des incidents toxiques très importants. Les phénols représentent la principale famille de composants végétaux biologiquement actifs mais qui peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine (**Cyboran et al., 2012**).

Dans cette optique, la présente étude a pour objectif d'évaluer la toxicité in vitro des extraits hydro-méthanolique de la partie aérienne d'*E. alata* et de la graine de *M. oleifera* par un test d'hémolyse afin de déterminer la dose seuil au-delà de laquelle certains effets néfastes sur la santé sont susceptibles.

La détermination du rendement d'extraits phénoliques a permis d'obtenir un bon rendement en polyphénols, en effet, la macération au méthanol est la meilleure technique d'extraction des polyphénols. Dans nos résultats, on a obtenu un rendement de 16,40% avec l'*E. alata*, ce qui est très proche des résultats rapportés précédemment (**Kebli 2016**). Quant à la plante de *M. oleifera*, le rendement est de 18,10 %, soit un pourcentage un peu faible par rapport à celui obtenu par **Laksmiani et al. (2020)**, qui est estimé à 24,08 %.

Les résultats montrent que les plantes étudiées renferment des teneurs importantes en polyphénols totaux, l'extrait d'éphédra contient une teneur en polyphénols plus élevée avec 60,79 µg EAG/mg ES par rapport à l'extrait de *M. Oleifera* avec une teneur de 32,04µg EAG/mg ES. Nos résultats sont supérieurs à ceux déterminés par **Mahmoudi et al (2013)** qui ont obtenus des concentrations de 19,88 pour l'*E. alata*, alors que pour le *M. oleifera*, **sarkar et al (2017)** montrent une teneur plus élevée de 53.52 mg EAG/g MS.

Pour le test de cytotoxicité, le pourcentage d'hémolyse est évalué pour chaque extrait de plante étudiée à différentes concentrations à savoir 250, 500, 1000, 2000, 5000 µg/ml en mesurant l'absorbance d'hémoglobine libérée par les GR hémolysés.

Concernant le test des GR par l'acide gallique, nos résultats montrent que l'effet hémolytique de cette molécule de référence est dose dépendante, le pourcentage d'hémolyse atteint un taux élevé de 65,61% à la concentration 2000 µg/ml et un maximum de 88,02 % à la concentration 5000 µg/ml.

Les résultats obtenus avec l'extrait d'*E. alata* montrent que le taux d'hémolyse aux concentrations de 250 et 500 µg/ml, qui est de 9% et 10% respectivement reste faible comparé au contrôle négatif et par rapport à celle de l'AG aux mêmes concentrations, de ce fait, on peut suggérer que la concentration de 500 µg/ml est la dose seuil sans effet toxique, nos résultats sont concomitantes avec celle de **Kmail et al,(2017)** qui ont montré qu'il n'y a pas d'effet toxique significatif de la plante d'*E. alata* jusqu'à la concentration de 500µg/ml. Au-delà l'effet hémolytique de l'extrait d'*E. alata* est dose-dépendant et atteint un maximum de 75 % avec la concentration 5000 µg/ml mais qui reste inférieur à celle de l'AG. Nos résultats obtenus sont cohérents avec ceux trouvés par **Muhammad et al, (2019)** qui ont montré que l'hémolyse augmentait avec l'augmentation de la concentration d'extrait phénolique d'*E. alata*.

Pour l'extrait de graines de *M. Oleifera*, nos résultats montrent que le taux d'hémolyse aux concentrations de 250 à 1000 µg/ml, qui est de 9 % à 75 % respectivement reste faible comparé au contrôle négatif et par rapport à celle de l'AG aux mêmes concentrations, de ce fait, on peut suggérer que la concentration de 1000 µg/ml est la dose seuil sans effet toxique. A partir d'une concentration de 2000µg/ml, le taux d'hémolyse augmente jusqu'à atteindre 32,40% à 5000µg/ml mais qui reste inférieur à celle de l'AG. D'après les résultats obtenus, on peut constater que l'extrait de *M. oleifera* est moins cytotoxique par rapport à l'extrait d'*E alata*.

L'effet hémolytique des extraits de plantes étudiées est attribué aux composants phytochimiques qu'elles contiennent, ainsi, il est lié à la forte concentration des extraits (**Mpongo et al., 2022**).

L'hémolyse résulte de la lyse de la bicouche lipidique de la membrane, selon les études précédentes les polyphénols se localisent dans la monocouche lipidique externe de la membrane érythrocytaire, en effet, elles s'incorporent dans la zone hydrophile de la membrane, modifiant ses propriétés (**Cyboran et al., 2012**).

Des analyses phytochimiques antérieures ont révélé la présence des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des acides phénoliques, des saponosides dans des extraits alcooliques d'Ephédra (**Nile & Park, 2014**), d'autre ont révèle la présence des tanins, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes dans l'extrait de la graine de *M. Oleifera* (**Singh et al., 2020**).

Certains composés présents dans les plantes ont un effet toxique. La partie aérienne *E. Alata* constitue la partie toxique de *l'Ephedra*. Elle contient 0.5 à 2 % d'alcaloïdes du total, notamment l'éphédrine. (**Limbert et al, 2013**). Plusieurs études ont révélé que les alcaloïdes,

à fortes doses, sont hautement toxiques pour l'organisme bien qu'ils soient bénéfiques pour le traitement de multiples maladies (**Mohammedi, 2013**).

Des saponosides dans *Ephedra* sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. (**Bruneton, 2009**).

La plante *Moringa*, dans ses composés phytochimiques, contient des saponines, et cette substance est connue pour avoir un effet toxique sur les cellules car elle interagit avec les membranes lipidiques, formant des complexes insolubles avec le cholestérol pour former des pores, appauvrissant ainsi les cellules et perdant l'hémoglobine dans le milieu extra-cellulaire. De plus, le nombre de chaînes de sucre dans les saponines joue un rôle important dans l'hémolyse, ce qui signifie que plus le nombre de sucres est élevé, plus l'hémolyse est importante (**Liu et al, 2013**).

Les tanins peuvent provoquer des intoxications graves, souvent mortelles. Cette nocivité proviendrait du fait que les tanins hydro sables (de faible poids moléculaire) peuvent être scindés puis les composés dérivés être absorbés au niveau de la muqueuse intestinale et circuler dans le sang, causant des dommages au foie et aux reins lorsqu'ils sont ingérés en grande quantité et provoquant une intoxication grave. (**SABATER, 2012**)

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales jouent un rôle important pour l'humanité, ont été largement utilisées pour le traitement de diverses maladies. Aujourd'hui, de nombreuses personnes se tournent vers les plantes médicinales comme alternative naturelle aux médicaments traditionnels et peuvent être consommées sous différentes formes, l'espèce végétale *M. oleifera* et *E. alata* sont des plantes très répandues en médecine traditionnelle.

Notre travail consiste à évaluer la cytotoxicité d'extraits hydro-méthanolique de la partie aérienne d'*E. Alata* et des graines *M. oleifera* par le test d'hémolyse afin de déterminer les doses sans risque de toxicité.

Dans notre travail, les plantes étudiées sont riches en polyphénols, d'après les résultats obtenus, l'extrait d'éphédra est plus riche en polyphénols totaux (60,79 µg EAG/mg ES) par rapport à celle de moringa (32,04 µg EAG/mg ES).

Selon nos résultats du test d'hémolyse que nous avons utilisé pour évaluer la toxicité, les extraits de plantes ne montrent aucune cytotoxicité à faibles concentrations avec une dose seuil sans effet toxique de 500 µg/ml pour l'extrait *E. alata* et de 1000 µg/ml pour l'extrait de *M. oleifera*. Au-delà l'effet hémolytique des extraits est dose-dépendant mais qui reste faible par rapport à l'acide gallique (molécule de référence), principalement pour l'extrait *M. oleifera* qui est selon nos résultats moins cytotoxique par rapport à l'extrait d'*E. alata*.

L'effet cytotoxique des extraits de plantes étudiées est attribué aux composants phytochimiques qu'elles contiennent, ainsi, il est lié à la forte concentration des extraits.

Notre travail reste une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies, en perspective on propose de :

- Tester la toxicité des extraits de plantes *in vivo* pour déterminer les DL50.
- Réaliser une étude phytochimique pour identifier les composés toxiques.
- Évaluation de l'activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses.

Les Références

Les références :

-A-

Agroconsult. (2016).Analyse des Potentialités de l'Exploitation du Moringa en Haïti, ministère de l'agriculture, des ressources naturelles et du développement rural (marndr). p 211.

Adedapo, A.A.; Mogbojuri, O.M.; Emikpe, B.O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *J. Med. Plant Res.* 2009, 3, 586–591.

Al-Sanafi AE, 2017. Therapeutic importance of *Ephedra alata* and *Ephedra folita*-A review. *Indo Am. J. P. Sci*; 4(02), 399-406p

Al-Saeed WA, Dhamen MA, Ahmed R ,Ahmed N, Naqvi AA .Clinical uses and toxicity of ephedra sinica:An evidence –Based Comprehensive Retropective Review (2004-2017).*pharmacognosy journal.*2019; 11(2):439-444

Amakura Y, Yoshimura M, Yamakami, S. Yoshida T, Wakana D, Hyuga M, Hyuga S, Hanawa T, Goda Y. (2013). Characterization of phenolic constituents from *Ephedra* herb extract. *Molecules*, 18(5), 5326-5334.

Amit C, Lokesh K, Sanjay R, Vijay S. (2022). Therapeutic activity of moringa oleifera, *Int.J.vulume3, issue 1.*

Ashutosh P, Pantalon M, Madan M, Pushpa K, Yashumati R, Vivek J, Aaushi P, Anil A .(2023)Une revue complète mise à jour de ses activités pharmacologiques, ethnomédicinales, formulation phytopharmaceutique, aspects cliniques, phytochimiques et toxicologiques,*Int. J.Mol. Sci.* 2023, 24 (3),2098.

Atakpama W, Dogbovi K, Kombate B, Akame L, Batawila K, Akpagana K.(2023),Une plante alimentaire à usage thérapeutique à promouvoir : *Moringa oleifera* lamarck , revue espèce géographique et société marocaine ,N 67.

Attilio A, Mohamed A, Marina P, Laura G, Mohammed S, Rosanna C, VirginieL.(2021).*Moringa oleifera* Lam.: Un aperçu phytochimique et pharmacologique .*Horticulturæ* , 7 (10), 409.

-B-

Bibi Z, Zainab A, Mona S, Sadjid K, Humaira R, Dina W, Asma A, Arshad M.(2020).Elucidation in silico de moringa oleifera phytochimiques contre le diabete sucre ,*Saudi J,Biological science* ,V 27,N9,P2299-2307.

Bijal A., Bhumika D. (2015).Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of Different Parts of *Moringaoleifera* Against Selected Gram Positive and Gram Negative Bacteria. 3 : 421–425 .

Boukandoul, S., Casal, S. & Zaidi, F, F, F. (2019). Moringa oleifera seed oil: Production, uses and health benefits. In: Hong, N. Kh. D. (Ed.), Seed oil: Production, uses and benefits. Nova Science Publishers, New York, 2018. 1–27.

BOUMEDIQU A .ADDOUN .,2017-Etude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques , en médecine traditionnelle ,dans la ville de Tlemcen.

Bonnaille C., Salacs M., Vassilova E et Saykova I. (2012). Etude de l'extraction des composés phénoliques à partir des pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L). *Revue de génie industriel.* 7(2) : 35-45

Boukeloua A. (2009). Caractérisation botanique et clinique et évaluation pharmactoxicologique d'une Préparation topique à base d'huile de *Pistacia lentis* L. (Anacardiaceae). Thèse de magister Biologie. Université Mentouri Constantine. P73

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4ème Edition *Lavoisier*

-C-

Caveny S, Charlet D A, Freitg H, Maier-Stoete M. et Starratt A N, 2001- New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). *American Journal of Botany.* Vol. 88, N°7. PP. 1199–1208.

Claverie I et Hedde H. (2008). Pharmacologie générale, mécanisme fondamentaux. 2ème Edition. *Porphy.* P 48-61.

Croze T. (2017). La grande éphédra (*Ephedra major* Host subsp. major): une relique d'affinité steppique en position vestigiale dans les encorbellements calcaires du défilé du Chaudan (Utelle, Alpes-Maritimes). *Bull. Soc. linn. Provence,* 68, 111.

Cyboran, Sylwia, Oszmiański, Jan and Kleszczyńska, Halina. "Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane" *Cellular and Molecular Biology Letters,* vol. 17, no. 1, 2012, pp. 77-88. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0038-4>

. -D-

Danciu C, Muntean D , Alexa E, Farcas C, Oprean C, Zupko I , Bor A , Minda D , Proks M , Buda V, Hancianu M , Cioanca O , Soica C , Popescu S , Dehelean C- A. (2019) Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of *Ephedra alata* Decne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules,* 24(13): 4-15p

Daphne E , Moratilla A E , Joel Flores , Sergio Hidalgo-Figueroa 1, Martínez N-T, Jiménez M J , Alethia Muñoz-Ramírez 1, Guillermo Pastor-Palacios 1, Sandra Pérez-Miranda 1, Alfredo Ramírez-Hernández 1, Joyce Trujillo 1 and Elihu Bautista 2022 A Review of the *Ephedra* genus: Distribution, Ecology, Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Properties vol(37) p:1-37

Dzotam JK, Touani FK, KueteV. (2015). Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosomamafa..ffa* Lam.; *Moringaoleifera* (L.) Schott and *Passifloraedulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria.. 16 : 1–8 .

-E-

-F-

Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1(5): p115. *Phytochemistry*, 47: p123-157.

Foidl N., Makkar H.P.S. et Becker K.2001 :« POTENTIEL DE MORINGA OLEIFERA EN AGRICULTURE ET DANS L'INDUSTRIE». Document d'origine la fiche Potentiel de développement des produits du *Moringa* 29 octobre - 2 novembre 2001, Dar es Salaam, Tanzanie. Page 2, 3,8,9,10,11,15,16.

-G-

Ghourri M., Zidane L., DouiraA. (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.17, pp. 2388.

Godinez-Oviedo, A.; Guemes-Vera, N.; Acevedo-Sandoval, O.,A. ; Nutritional and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Lam and its Potential Use as Nutraceutical Plant ; Review Pakistan Journal of Nutrition ; 2016,15,397-405.
G.Eisenbranda,B.poolzobelb,V.bakerc,M.ballsd,B.J.blaauboere,A.boobisf,A.carereg,S.keve kordesh,J-c.lhuguenoti,R.pieterse,Jkleinerj.2002. Methods of in vitro toxicology.p:193-236.

-H-

Hamoudi, M. (2021). Etude biologique, phytochimique et toxicologique des extraits de la plante *Ephedra nebrodensis* de la région des Aurès (Doctoral dissertation).

Hadjadj K. Décembre 2020 Importance thérapeutique de la plante *Ephedra alata* subsp. *Alend* dans la médecine traditionnelle pour la population de la région de Guettara (Djelfa, Algérie) | Université de Liège. P 1-19.

Hill, Anita; Hill, Quentin A. (2018-11-30). "Autoimmune hemolytic anemia". *Hematology*. 2018 (1): 382–389.

-I-

-J-

-Jaja-Chimedza, A., Graf, B.L., Simmler, C., Kim, Y., Kuhn, P., Pauli, G.F et al., (2017). Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched *Moringa oleifera* seed extract. USA, *PLOS ONE* 12(8): e0182658.

Jdaidi N, Selmi H, Aloui F, Jedidi S, Chaabane A, (2023),Évaluation des facteurs de menace et de vulnérabilité potentielles des plantes médicinales et aromatiques au nord-ouest tunisien,vol 11,No 1 .

Jean-Antoine A.2017 Consommation de tanins par le chevreuil et niveau d'infestation par des strongles gastro-intestinaux.

-K-

Karunamoorthi K, Jegajeevanram K, Vijayalakshmi J, Mengistie E. Traditional medicinal plants: A source of phytotherapeutic modality in resource-constrained health care settings. *EvidBasedComplementAltern Med.* 2013;18(1):67-74.

Kebili Zohra, 2016.Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla .

Kmail A., youssi B., Zaid H., Imtara H., Saad B, 2017 -In vitro evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of *Asparagus aphyllus L.*, *Crataegus azarolus L.*, and *Ephedra alata Decne.* in monocultures and co-cultures of HepG2 and THP-1-derived macrophages.*Pharmacogn. Commn,* 7(1):24-33p.

Kutullo M, Ugochukwu O, Elizabeth M, Ndivhuho B, Chinyerum S, (2023).Aperçu des effets de l'extrait de feuille de *Moringa oleifera* sur le stress oxydatif et l'infertilité masculine : un examen,*Appl. Sci.* 2023 , 13 (7),4387.

-L-

Laksmiani N.P.L, I W. A. Widiantara, K. D. Adnyani, A. B. S. Pawarrangan. January 2020. OPTIMASI METODE EKSTRAKSI KUERSETIN DARI DAUN KELOR (*Moringa oleifera L.*) 14 (1), p: 19 DOI:<https://doi.org/10.24843/JCHEM.2020.v14.i01.p04>

Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S, (2016): *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health: An overview. *Int.J. Mol. Sci,* 17, 2141.édition Maurizio Battino université de milan, Italie

Limberger R.P, Jacques ALB, Schmitt GC et Arbo MD, 2013 – Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products,* pp. 1217- 1237.

Liu Z , Gao W, Jing S , Zhang Y, Man S, Wang Y, Zhang J , Liu CH.(2013). Correlation among cytotoxicity,hemolytic activity and the composition of steroidal saponins from *Paris L.* P:422–430

Loomis T.A. ET Hayes A.W. (1996).Loomis's essentials of toxicology. (4thed)., California, *Academicpress.* 208- 245.

Louni, 2009. Extraction et caractérisation physicochimique de l'huile de graines de Moringa oleifera. Mémoire de Magister. Ecole nationale supérieure agronomique El-Harrach, Alger, Algérie. p. 15.

-M-

M El khasmi, M Farh ,(2022).Revue marocaine de néphrologie , volume 2 ,N 5.

Mahmood, KT ;Mugal, T. ;Haq, IU Moringa oleifera : Un don naturel—Un examen. *J.Pharm. Sci. Rés.* **2010**, 2, 775–781.

McKnight M, Allen J, Waterman JD et Al. (2014). Moringa tea blocks pig confinement dust-induced acute lung inflammation through a mechanism involving TNF- α expression, c-Jun N-terminal kinase activation, and neutrophil regulation. 10: 73–87.

MartheMakwenaMpongo, Didier LusimbamoDianzuangani, Ruth MaloboKatunda, FlorentBiduayaMukeba, Odette NganduKabena and FélicienLuyeyeLukoki. In vitro evaluation of the cytotoxicity of Dissotisrotundifolia (Sm.)Triana (Melastomataceae) and Emilia sagittata (Vahl) DC. (Asteraceae) plantsused in intimate hygiene among women in Mbandaka, Democratic Republic ofthe Congo. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2022; 11(3): 55-61

MeyerS.E, (2008).*Ephedra L.:ephedraor* Mormon-tea. In:Bonner, Franklin T.; Karrfalt, Robert P., eds. *The Woody Plant SeedManual. Agric. Handbook. 727.* Washington, DC. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, 492-494 p.

Mintzer D M,Billet S N, Chmielewski L. Drug-induced Hematologic Syndromes .**14 mai 2009.**p:1-11

Muhammad Q N, Ali TalhaKh, Muhammad A, Mehwish Shah ,Muhammad A , and Zabta Khan Shinwari .2019. Phytochemical Analysis, Ephedra Procera C. A. Mey.Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles,Their Cytotoxic and Antimicrobial Potentials p:11

Mohamed A, Tao X, Yang T, Yongheng Z, Fatma A, Xuan Y, BaiyiL,(2021). Avantages pour la sante et composes phénoliques des feuilles de moringa oleifera, revue complète, tome 93, 153771.

Mohammedi Zohra. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de laRégion Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, 2013,24pp.

-N-

Natalia V, Alexandre G, Victor C, Pradeep K, Saglara M, Tatiana M, Vishno d, (2023),Évaluation des facteurs de menace et de vulnérabilité potentielles des plantes médicinales et aromatiques au nord-ouest tunisien,*Horticulturae* 2023, 9 (2), 239.

Nile, S. H., Park, S. W., (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144.

Nurmaziah M, Raja N, Puspawathy K, Noorashikin A, Terance Y, (2022). Examen de la portée : évaluation de *Moringa oleifera* (Lam.) pour la cicatrisation potentielle des plaies dans des études in vivo, *Molecules*, **27(17),5541**.

-O-

Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H., 2003- place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, pp. 47-51

Ozenda P., 1991- Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). p :121-122

-P-

Paula G M, Rocio P, Gema N. (2021), Avantages pour la santé des utilisations et applications de *Moringa oleifera* dans les produits de boulangerie , *plantes* ,10(2),318.

Phinney K.W, Ihara T, Sande, L.C, (2005). Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077, pp. 90–92

Pirbalouti G A, Mohammadi M A, Azizi SH and Craker L. 2013. Healing Aling effect of hydro –alcoholic extract of ephedra pachycladaboiss. . in experimental gastric ulcer in rat vol 70p: 1008

-Q-

-R-

Reichl J, Benecke N, Eckert K G, Erber B, Golly I C, Kreppel H., Liebl B, Muckte H, Szinicz L et Zilker T. (2004). Guide Pratique de Toxicologie. (2ème Ed.). *DeBoeck*. 04.

RHAZI, N. Mise au point de mélanges collants écologiques à partir des écorces d'Acacia mollissima du Maroc. Thèse de doctorat Pau, **2015**. P:15-19.

Rong L, Jing L, Qi H, Shao L, Yueping J, *Moringa oleifera*: a systematic review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity , *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 74, Issue 3, pages 296-320.

-S-

Sarkar M, Bhowmick S, Hussain J, Hasan M, Hossain S .2017 Hot Water Extract of *Moringa oleifera* Leaves Protects Erythrocytes from Hemolysis and Major Organs from Oxidative Stress invitro **3(3): 120-126**

Sabater F, (2012). Détermination d'une dose efficace et d'une dose toxique de tanins condensés dans le contrôle des strongyloses digestives chez les caprins. (Thèse doctorant), p : 1-135 <http://oatao.univ-toulouse.fr/>

Saidi S, Saikh T, Alghamdi O, Hamden K. (2022) Ephedra alatasubsp. alenda (Ephedraceae) leaf extracts: phytochemical screening, anti-diabetic, anti-obesity and anti-toxic activities on diabetic-induced liver-kidney-testes toxicities and inhibition of α -amylase and lipase enzymes vol12, pp:1-12

Singh, A. K., Rana, H. K., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhlala, A. R., Pandey, A. K. (2020). Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. South african journal of botany, 129, 209-220

Song Y T, Ren J, Ling K, Guangli Y, Chang L, Ying H, Soleil H, Xi W, (2023). Ephedrae Herba : Un examen de sa phytochimie, de sa pharmacologie, de son application clinique et de sa toxicité des alcaloïdes, Molécules 2023 , 28 (2), 663.

Soua L, Koubaa M , Francisco J , Fakhfakh J, Ghamgui K H and Chaabouni S E. Water-Soluble Polysaccharides from Ephedra alata Stems: Structural Characterization, Functional Properties, and Antioxidant Activity. 8 May 2020; p:1-18

- T-

Tang S, Ren J , Kong L , Yan G , Liu CH , Han Y , sun H , Wang XJ. *Ephedra Herba* : A Review of its phytochemistry , Pharmacology , Clinical Application , and Alkaloid Toxicity 2023:28(2), 663

Trees for Life. (2013). [Accès le 02/10/13]. Etude des pratiques et croyances alimentaires pour Comprendre la malnutrition à Madagascar : et de l'introduction de feuilles de Moringa.

- V-

- W-

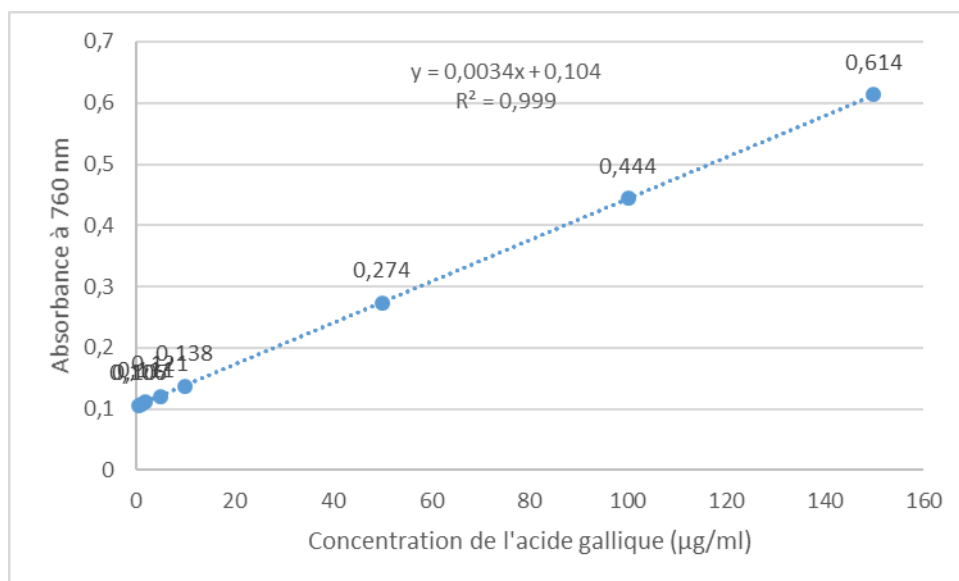
- Z-

Zahidul I, Rashadul I, Faruk H, Kazi M, Rakibul H, Rezaul K, (2021). Moringa oleifera est une source importante de nutriments avec des avantages potentiels pour la santé , Tome, id d'article 6627265.

Zeghad, N. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Constantine: université Mentouri, 2009.

Zhang B M , Wang Z B , Xin P , Wang Q H , Bu H, Kuang H X .2018 Phytochemistry and pharmacology of genus *Ephedra* vol 16(11) p:811-828

Annexes

Annexe A1 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

Résumé

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'évaluation de la cytotoxicité in vitro des extraits hydro-méthanoliques de plantes médicinales *Moringa oleifera* et de l'*Ephedra alata*, qui ont une grande importance thérapeutique dans le monde et à usage multiples. Dans la première partie de notre protocole, les extraits sont préparés par macération, le rendement d'extraction est calculé et la teneur en polyphénols totaux est déterminé. Dans la deuxième partie, on a évalué la cytotoxicité des extraits à différentes doses (250 à 5000 µg/ml) par le test d'hémolyse. Les résultats montrent que l'E. alata est plus riche en polyphénols totaux. Pour le test d'hémolyse, les extraits de plantes ne montre aucune cytotoxicité a faibles concentrations avec une dose seuil sans effet toxique de 500 µg/ml pour E. alata et de 1000 µg/ml pour de M. oleifera, au-delà de ces doses, l'effet hémolytique est dose-dépendant mais qui reste faible par rapport à celle de l'acide gallique.

En conclusion, l'effet cytotoxique des extraits de plantes étudiées est attribué aux composants phytochimiques qu'elles contiennent, ainsi, il est lié à la forte concentration des extraits, avec une cytotoxicité plus élevé pour E. alata.

Mots clés : *Moringa oleifera*, *Ephedra alata*, cytotoxicité, hémolyse, in vitro.

Abstract

This study is part of the evaluation of the in vitro cytotoxicity of the hydro-methanol extracts of *Moringa oleifera* and *Ephedra alata* medicinal plants, which are of great therapeutic importance worldwide and for multiple uses. In the first part of our protocol, the extracts are prepared by maceration, the extraction yield is calculated and the total polyphenols content is determined. The second part evaluated the cytotoxicity of extracts at different doses (250 to 5000 µg/ml) using the hemolysis test. The results show that E. alata is richer in total polyphenols. For the hemolysis test, plant extracts show no cytotoxicity at low concentrations with a threshold no toxic effect dose of 500 µg/ml for E. alata and 1000 µg/ml for M. oleifera, beyond these doses, the hemolytic effect is dose-dependent but still weak compared to that of gallic acid. In conclusion, the cytotoxic effect of the studied plant extracts is attributed to the phytochemical components they contain, so it is related to the high concentration of the extracts, with a higher cytotoxicity to E. alata.

Keywords: *Moringa oleifera*, *Ephedra alata*, cytotoxicity, hemolysis, in vitro.

ملخص

هذه الدراسة هي جزء من تقييم السمية الخلوية في المختبر لمستخلصات الميثانول المائي لنباتات *Moringa oleifera* و *Ephedra alata* الطبية، والتي لها أهمية علاجية كبيرة في جميع أنحاء العالم ولأغراض متعددة. في الجزء الأول من بروتوكولنا، يتم تحضير المستخلصات عن طريق النقع، ويتم حساب عائد الاستخراج ويتم تحديد إجمالي محتوى البوليفينول. قام الجزء الثاني بتقييم السمية الخلوية للمستخلصات بجرعات مختلفة (250 إلى 5000 µg/ml) باستخدام اختبار انحلال الدم. تظهر النتائج أن E. alata أغنى في إجمالي البوليفينول. بالنسبة لاختبار انحلال الدم، لا تظهر مستخلصات النبات أي سمية خلوية بتركيزات منخفضة مع عتبة عدم وجود جرعة تأثير سام تبلغ 500 µg/ml بالنسبة لـ E. alata و 1000 µg/ml بالنسبة لـ M. oleifera، بعد هذه الجرعات، فإن تأثير انحلال الدم يعتمد على الجرعة ولكنه لا يزال ضعيفاً مقارنة بحمض الغاليك.

في الختام، يُعزى التأثير السام للخلايا لمستخلصات النبات المدروسة إلى المكونات الكيميائية النباتية التي تحتوي عليها، لذلك فهو مرتبط بالتركيز العالي للمستخلصات، مع سمية خلوية أعلى لـ E. alata.

الكلمات الرئيسية: *Moringa oleifera*، *Ephedra alata*، السمية الخلوية، انحلال الدم، في المختبر.

