

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

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

Département de Biologie



MÉMOIRE

Présentée par

LACHACHI Yasmin

MEZIANE TANI Souhir Meriem

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

Option : Physiologie cellulaire et physiopathologie

Thème

Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, anti-hémolytique et cytotoxicité in vitro de l'huile fixe des pétales de safran

Soutenue le 25/06/2025 devant le jury composé de :

Présidente : Mme LOUKIDI Bouchra Professeur Université de Tlemcen

Encadrante : Mme BABA HAMED Yamina MCA Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme MERZOUK Amel MCA Université de Tlemcen

Année universitaire : 2024-2025

Remerciement

Nous remercions Dieu, le Tout-Puissant, de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de manière significative à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, nous tenons à remercier sincèrement nos professeurs pour leur enseignement, leur patience et leurs précieux conseils tout au long de notre parcours académique. Leurs connaissances et leur soutien ont été essentiels à la réussite de ce projet.

Nous remercions également chaleureusement nos collègues de classe pour leur collaboration et leur partage d'idées. Nos discussions enrichissantes ont joué un rôle crucial dans le développement de ce mémoire.

Nous remercions également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre plus profonde reconnaissance envers notre encadrante, Madame **BABA HAMED Yamina**. Ses conseils éclairés, son dévouement constant et sa passion pour la recherche nous ont guidés tout au long de ce processus.

Sans son soutien inestimable, ce mémoire n'aurait pas été possible. Nous sommes reconnaissantes envers toutes les personnes qui ont contribué à notre réussite académique, et nous les remercions du fond du cœur pour leur précieuse aide.

Dédicaces

A tous ceux qui sont chers, ceux à qui je dois mon succès :

A celui qui m'a élevé, à l'homme qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui **MONSIEUR LACHACHI Habib**, celui dans les yeux duquel je vois la fierté de moi, mon modèle de respect et d'amour, de la compréhension et de la générosité d'un père.

A la première femme forte qui j'ai connue, à celle dont l'amour inconditionnel, les prières silencieuses et les sacrifices quotidiens m'ont accompagné à chaque étape de ma vie, merci **Maman Soraya** pour ta présence.

A mes chers témoins des étapes de ma vie, dans mon succès, joie, tristesse, mes chers frères : **Yamna, Ratiba, Youcef**, je n'oublierai jamais vos encouragements permanents et soutiens moraux, votre présence dans mon cœur est un trésor précieux, sans oublier mes petits neveux **Nihel et Ilyes**.

A ma chère grande mère **mima** et ma tante **Fouzia**, vous m'avez appris que le cœur pouvait tout surmonter.

A mon fiancé **rachid**, merci d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces longues journées d'études, ton soutien m'a donné la force d'aller jusqu'au bout.

A mes précieux cousins : **Boumédiène, Mehdi, Ines, Wissem**, merci pour l'énergie positive que vous apportez dans mon existence.

A mon binome **Souhir** de galère, de travail et de fous rires, ta contribution a été essentielle à cette réussite, nous avons traversé ensemble les moments de doute, les longues journées de la boratoire, les nuits de rédaction, mais aussi les instants de satisfaction et de réussite. Ton implication et ton esprit d'équipe ont été essentiels à l'avancement de ce projet.

Yasmin

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

Mes très chers parents **abderrahim et samiya** pour l'amour qu'ils m'ont donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. C'est grâce à votre amour dévoué et vos sacrifices incessants que je réussis. Je suis ce que je suis aujourd'hui grâce à vous. Ce modeste effort témoigne de mon amour infini pour vous.

À mon frère **Anes**, ta force tranquille et ton cœur immense m'ont accompagné bien au-delà des mots. Tu es pour moi un véritable exemple de persévérance. Je t'aime profondément.

À mes très chères sœurs **Ghizlene, Fazilet et Yasmine** dont la douceur a constamment été un soutien et une source d'inspiration. Que Dieu vous accorde une vie remplie de succès, de bonheur et de sérénité. Et à mes précieux petits neveux, **Ilyan et Yamil**, que j'aime tant.

À mes chères cousines du côté paternel comme maternel, votre présence et votre confiance ont été des sources précieuses de force tout au long de ce parcours.

À mon amie ma sœur de cœur **Amira**. Ta présence, ta bienveillance et ton écoute ont été une lumière dans les moments les plus intenses de ce parcours. Merci d'avoir été là, toujours.

À mon binôme **Yasmine**, Merci pour ton engagement, ta patience et ta collaboration tout au long de ce travail. Travailler à tes côtés a été une belle expérience, faite de partage, de réflexion et de complicité. Ce mémoire est aussi le fruit de nos efforts communs.

À tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment votre soutien et votre présence ont été une source ininterrompue d'encouragement et de consolation.

Souhir

Liste des figures

Figure 1:cycle biologique du safran	4
Figure 2:Constituants des huiles végétales fixes (Jahouach, 2002)	9
Figure 3:Quelques constituants de la fraction glycéridique.	10
Figure 4:Schéma de la réaction inflammatoire (Jerome, 2015).	14
Figure 5:Photomicrographie des globules rouges.	16
Figure 6:Mécanisme de décomposition des érythrocytes (Mehta et al., 2003).	18
Figure 7:Les solutions préparées	21
Figure 8:Tubes avant centrifugation	22
Figure 9:l' Albumine (SBA).	26
Figure 10:Solution de l'huile fixe	29
Figure 11:pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par le diclofénac de sodium et l'huiles fixes des pétales de safran.	32
Figure 12:pourcentage de la stabilité membranaire de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique, diclofénac et l'huile fixe des pétales de safran.	34
Figure 13:Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique.....	35

Liste des abréviations

- **Ac** : absorbance du contrôle.
- **AGMI** : acides gras mono insaturés.
- **AGPI** : acides gras polyinsaturés.
- **AGS** : acides gras saturés.
- **AINS** : anti-inflammatoires non-stéroïdiens.
- **AIS** : anti-inflammatoire stéroïdiens.
- **At** : absorbance du test.
- **DMSO** : diméthylsulfoxyde.
- **GR** : globule rouge.
- **GRH** : globules rouges humains.
- **Hbc** : l'hémoglobine glycosylée.
- **LDH** : lactate déshydrogénase.
- **SBA** : sérum albumine bovin.
- **UV** : ultraviolet.

Table des matières

Introduction	1
Synthèse Bibliographique	3
I. Safran	4
I.1 Généralité :	4
I.2 Cycle biologique :	4
II. Les huiles fixes	5
II.1 Définition.....	5
II.2 Composition chimique :	5
II.3 Méthode d'extraction	5
II.4 Classification	6
III. L'huile fixe des pétales de crocus sativus :	6
III.1 Fleurs :	6
III.2 Les étapes de l'extraction par solvant de l'huile des pétales :	7
a. Préparation de la biomasse (pétales) :	7
b. Choix du solvant d'extraction :	7
c. Extraction de l'huile :	7
d. Filtration du mélange solide-liquide :	7
e. Évaporation du solvant :	7
f. Purification de l'extrait :	8
g. Séchage du résidu solide (optionnel) :	8
III.3 Rôles des huiles fixes :	8
III.4 Composition des huiles végétales fixes :	9
III.5 La fraction saponifiable :	10
III.6 La fraction insaponifiable :	11
III.7 Conservation et stockage des huiles fixes:	11
IV. Pouvoir anti-inflammatoire	12
IV.1 Définition et Généralités.....	12
IV.2 Types d'inflammation	12
3- les cellules de la réponse inflammatoire	13
V. Anti-inflammatoires	14
V.1 Définition et mode d'action.....	14
VI. Hémolyse :	15
VI.1 Globules rouge :	15

VI.2	Définition de l'hémolyse	16
VI.3	Mécanisme d'hémolyse	17
VI.4	Les anti-hémolytiques :	18
VII.	La cytotoxicité des plantes :	19
VII.1	Généralité :	19
VII.2	Paramètres de mesure de la réponse cellulaire dans les tests de cytotoxicité des plantes médicinales :	19
	Matériel et Méthodes	20
I.	Préparation des solutions :	21
II.	Détermination <i>in vitro</i> , de l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire des pétales de Safran : 21	
II.1.	Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH).....	21
II.2.	Evaluation de l'activité Anti-Hémolytique	22
III.3.	Evaluation de l'activité Anti-Inflammatoire	25
IV.	Teste de cytotoxicité.....	29
1.1	Principe :	29
1.1.2	Préparation de la suspension des globules rouges humain (GRh) :	30
	Résultats & Interprétation	31
	Evaluation de l'activité Anti-inflammatoire :	32
	L'évaluation de l'effet hémolytique de l'huile fixe des pétales	33
	De safran :	33
	Evaluation de l'activité cytotoxique :	34
	Discussion	36
	Conclusion	40
	Références bibliographiques	43

Résumé

L'objectif de cette recherche est d'analyser les propriétés biologiques des huiles fixes dérivées des pétales de *Crocus sativus* (**safran**), afin de mettre en valeur ce sous-produit souvent négligé.

L'huile a été obtenue par l'extraction dans l'héxane, puis elle a été testée sur des érythrocytes humains et à travers un modèle de dénaturation des protéines. Les résultats ont démontré une activité anti-inflammatoire constante et significative, surpassant celle du diclofénac, qui est considérée comme le traitement de référence. Concernant l'aspect anti-hémolytique, l'huile a démontré un effet de protection à une faible concentration, alors que l'extrait éthanolique s'est avéré plus efficace dans ce domaine. Les analyses de cytotoxicité ont démontré que l'huile fixe à une toxicité faible même à des doses élevées, suggérant une compatibilité favorable avec les cellules.

Ces recherches mettent en avant l'importance thérapeutique des pétales de safran, notamment comme source naturelle de composés bioactifs dotés d'effets anti-inflammatoires et protecteurs pour les membranes cellulaires. Ils établissent les fondations pour des applications futures dans les secteurs pharmaceutiques et cosmétique.

Mots clés : Pétales de safran, Huile fixe, Composés bioactifs, anti-hémolytiques, anti-inflammatoires, cytotoxicité.

Abstract

The objective of this research is to analyze the biological properties of fixed oils derived from the petals of *Crocus sativus* (**saffron**), in order to highlight this often overlooked by-product.

The oil was obtained by extraction in the hexan, then tested on human erythrocytes and through a protein denaturation model. The results demonstrated a consistent and significant anti-inflammatory activity, surpassing that of diclofenac, which is considered the reference treatment. Regarding the anti-hemolytic aspect, the oil demonstrated a protective effect at a low concentration, while the ethanolic extract proved to be more effective in this area. Cytotoxicity assays have shown that the oil binds to low toxicity even at high doses, suggesting favourable cell compatibility.

This research highlights the therapeutic importance of saffron petals, particularly as a natural source of bioactive compounds with anti-inflammatory and protective effects for cell membranes. They lay the foundations for future applications in the pharmaceutical and cosmetic sectors.

Keywords: Saffron petals, Fixed oil, Bioactive compounds, anti-hemolytic, anti-inflammatory, cytotoxicity.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو تحليل الخصائص البيولوجية للزيوت الثابتة المستمدة من بتلات الزعفران، من أجل تسليط الضوء على هذا المنتج الثانوي الذي غالبًا ما يتم تجاهله

تم الحصول على الزيت عن طريق الاستخراج في الهكسان، ثم تم اختياره على كريات الدم الحمراء البشرية ومن خلال نموذج لتخريب البروتينات. أظهرت النتائج نشاطًا مضادًا للالتهابات ثابتًا وذو دلالة إحصائية، متفوقًا على الديكلوفيناك، الذي يُعتبر العلاج المرجعي. فيما يتعلق بالجانب المضاد للهيموليتك، أظهرت الزيت تأثيرًا وقائيًا بتركيز منخفض، بينما ثبت أن المستخلص الإيثانولي أكثر فعالية في هذا المجال. أظهرت تحليلات السمية الخلوية أن الزيت الثابت له سمية منخفضة حتى عند الجرعات العالية، مما يشير إلى توافق جيد مع الخلايا

تُبرز هذه الأبحاث الأهمية العلاجية لبتلات الزعفران، ولا سيما كمصدر طبيعي للمركبات النشطة بيولوجيًا التي تتمتع بتأثيرات مضادة للالتهابات وحامية للأغشية الخلوية. إنهم يؤسسون الأسس لتطبيقات مستقبلية في القطاعات الصيدلانية والتجميلية

كلمات مفتاحية: بتلات الزعفران، زيت ثابت، مركبات نشطة بيولوجيًا، مضادة للانحلال الدموي، مضادة للالتهابات، سمية خلوية.

Introduction

Introduction

L'utilisation de plantes à des fins médicinales date de l'Antiquité et demeure indispensable dans les systèmes de soins traditionnels et contemporains. Outre leurs applications en cuisine et en cosmétique, ces plantes sont principalement exploitées pour leurs propriétés curatives. En dépit des progrès en matière de pharmacie, près de 80 % des populations dans les pays en développement continuent de se fier aux plantes pour leurs soins de santé de base. (**World Health Organization, 2004**).

Parmi ces plantes à haute valeur médicinale figure le **Crocus sativus L.**, plus connu sous le nom de safran. Cette plante, appartenant à la famille des Iridacées, est principalement cultivée en Iran, en Inde, au Maroc, en Espagne et en Grèce. Elle est renommée pour ses stigmates, utilisés comme épice précieuse pour leurs propriétés colorantes, aromatiques et médicinales. Toutefois, d'autres parties florales comme les pétales, souvent considérés comme des déchets agricoles (représentant près de 60 % du poids de la fleur), renferment également un potentiel thérapeutique important.

Des recherches récentes ont mis en lumière la richesse des pétales de safran en composés bioactifs: flavonoïdes, anthocyanines, tanins, saponines, composés phénoliques, et autres métabolites secondaires, qui leur confèrent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cytoprotectrices (**Hosseini et al., 2018**).

Dans cette perspective de développement durable et de valorisation des coproduits végétaux, l'étude des extraits peu explorés des pétales de safran, tels que les **huiles fixes** (ou huiles non volatiles), prend tout son sens. Contrairement aux huiles essentielles et aux extraits hydroalcooliques largement étudiés, les huiles fixes extraites des pétales ont reçu peu d'attention. Composées majoritairement d'acides gras, de stérols et de vitamines liposolubles, elles possèdent un profil biochimique distinct qui leur confère des propriétés biologiques uniques. Ces huiles, renouvelables et d'origine végétale, constituent une alternative naturelle aux graisses animales et sont utilisées dans divers secteurs, allant de l'agroalimentaire à la cosmétique, en passant par la pharmacologie (**Do & Sabatini, 2010**).

L'inflammation, processus physiologique de défense contre les agressions, peut entraîner de graves désordres lorsqu'elle devient chronique, contribuant à des pathologies telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou cancéreuses. De plus, l'hémolyse – phénomène de rupture des globules rouges – est souvent corrélée au stress oxydatif et aux lésions inflammatoires. Étudier les effets anti-inflammatoires et anti-

Intoduction

hémolytiques de ses huiles permet donc d'évaluer leur capacité à protéger les membranes cellulaires et à limiter les dommages induits.

Quant à la cytotoxicité, elle désigne l'effet d'une substance sur la viabilité cellulaire. Si une certaine cytotoxicité est souhaitable pour cibler les cellules cancéreuses, il est crucial de s'assurer que les extraits végétaux ne nuisent pas aux cellules saines. Ainsi, évaluer la cytotoxicité des huiles fixes de pétales de safran est essentiel pour garantir leur innocuité et leur application potentielle en thérapeutique.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente étude, qui vise à explorer les activités biologiques des huiles fixes extraites des pétales de *Crocus sativus* L. L'objectif principal est d'évaluer leurs effets anti-inflammatoires, anti-hémolytiques et leur cytotoxicité in vitro, à l'aide de tests biologiques adaptés. Cette approche vise non seulement à approfondir les connaissances sur les composés bioactifs présents dans les pétales de safran, mais aussi à encourager leur valorisation pharmaceutique et industrielle en tant que ressource naturelle alternative.

Le présent mémoire est structuré en trois parties.

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur le safran, ses pétales, les huiles fixes, ainsi que sur les mécanismes biologiques de l'inflammation, de l'hémolyse et de la cytotoxicité.
- Le deuxième chapitre, intitulé Matériels et Méthodes, présente les techniques utilisées pour l'extraction des huiles et pour l'évaluation de leurs effets biologiques.
- Enfin, le troisième chapitre expose les résultats expérimentaux, suivis d'une discussion critique visant à interpréter les données obtenues et à les comparer aux résultats de la littérature.

Le travail se conclut par une synthèse générale et l'ouverture de perspectives pour de futures recherches.

Synthèse Bibliographique

I. Safran

I.1 Généralité

Le safran, issu de la fleur *Crocus sativus* L., est une épice précieuse utilisée depuis l'Antiquité pour ses propriétés culinaires, médicinales et tinctoriales. Cultivé principalement dans des régions au climat sec et tempéré comme l'Iran, le Maroc, l'Espagne ou encore l'Inde (Cachemire), le safran est obtenu à partir des stigmates rouges de la fleur, qui sont soigneusement récoltés à la main et séchés. Cette méthode de production laborieuse explique son prix élevé sur le marché mondial. Les principaux composants actifs du safran sont la crocine (responsable de la couleur intense), le safranal (à l'origine de l'arôme) et la picrocrocine (liée au goût amer). Plusieurs études modernes ont mis en évidence ses propriétés pharmacologiques, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires, neuroprotecteurs, ainsi qu'une efficacité potentielle dans le traitement de la dépression légère à modérer. Le safran représente ainsi un pont entre plante médicinale traditionnelle et intérêt thérapeutique contemporain.

I.2 Cycle biologique

En tant qu'une plante géophyte ou cryptophyte, *C. sativus* se propage uniquement par mode végétatif, au moyen des cornes qui jouent le rôle de structures de stockage, caractérisées par un long repos estival. Le cycle biologique du safran commence avec sa croissance végétative au début de l'automne et s'étale du mois d'octobre jusqu'au mois d'avril (**Figure1**)

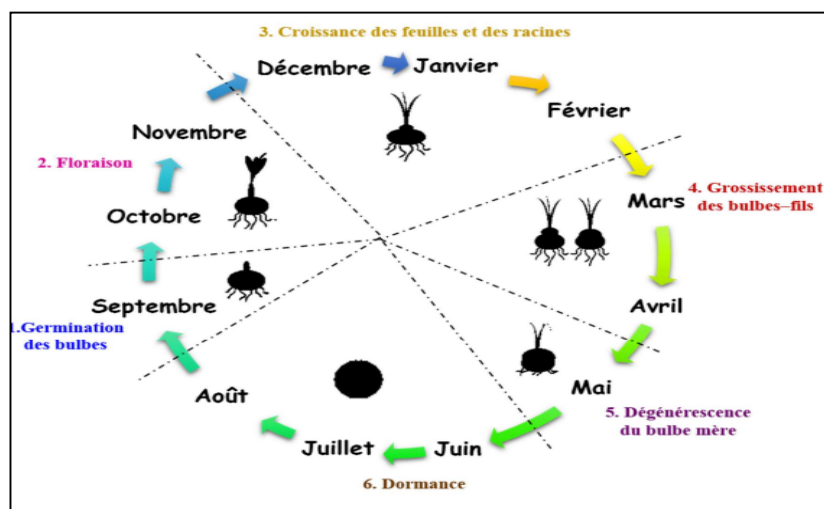


Figure 1: cycle biologique du safran

Synthèse Bibliographique

Le safran est principalement connu pour ces stigmates, utilisés comme épice précieuse, mais ses pétales, représentent également une source intéressante de composés bioactifs. Riches en pigments naturels et antioxydants, les pétales de safran peuvent être valorisés par l'extraction de leur huile fixe, une huile végétale obtenue par macération dans un solvant ou une huile porteuse. Cette huile fixe renferme des caroténoïdes, notamment la lutéine, qui confèrent des propriétés anti-âge, hydratantes et protectrices pour la peau. L'intégration de cette huile dans des formulations cosmétiques permet ainsi d'exploiter pleinement le potentiel des pétales de safran, offrant une alternative naturelle et efficace pour le soin cutané et la lutte contre le vieillissement.

II. Les huiles fixes

II.1 Définition

L'huile fixe est une substance grasse, onctueuse et dense, généralement liquide à température ambiante. Elle n'est pas soluble dans l'eau et se compose de lipides formés de triglycérides, qui sont des molécules d'acides gras estérifiées par le glycérol (une molécule d'alcool). Aujourd'hui, les huiles de soja, de colza et d'olive sont parmi les plus importantes. Ces éléments constituent une part importante de l'énergie corporelle, car les graisses offrent un grand nombre de calories. **(Boutayeb, 2013).**

II.2 Composition chimique

Dans la majorité des cas, la composition chimique des huiles fixe se compose d'un mélange de 95% de triglycérides et de 5% d'acides gras libres, de stérols, de cires et d'autres éléments en quantités moindres. Les triglycérides sont des triesters créés par la réaction d'acides.

Sur les trois fonctions alcools du glycérol, on observe une activité marquée. **(Gilles,2007)**

II.3 Méthode d'extraction

Depuis que Pline a décrit la méthode d'extraction de l'huile, ou que nous avons évoqué la presse assyrienne à l'huile, et passant par les presses à vis contemporaines, le processus de production des huiles reste observé : la pression exercée sur la matière première génère directement l'huile.

On utilise également des solvants organiques dans les procédés actuels, et dans les deux

Synthèse Bibliographique

situations, l'huile brute est généralement exposée à plusieurs opérations de raffinage **(Bruneton, 2009)**.

- **Extraction par pression** : on emploie des presses à vis qui procure un meilleur rendement en huile contrairement aux presses hydrauliques traditionnelles. Elles fonctionnent à une pression plus améliorée et bénéficient d'avantages supplémentaires.
- **Extraction par solvant** : cette méthode d'extraction peut être utilisée tant sur les graines entières que sur les graines partiellement huileuses par pressage. L'hexane est généralement le solvant employé. Cette technique permet une récupération d'huile variant de 95 à 99%. **(Bruneton, 2009)**

II.4 Classification

On peut classer les huiles fixe en quatre principales catégories, basées sur l'indice d'iode pour les distinguer :

- Les huiles qualifiées de saturées telles que : Indices d'iode variant de 5 à 50.
- Les huiles mono-insaturées (semi-siccatives) : indices d'iode variant de 50 à 100.
- Les huiles semi-siccatives (di-insaturées) : leurs indices d'iode se situent entre 100 et 150.
- Les huiles tri-insaturées (siccatives) : indices d'iode supérieurs à 150. **(Gilles, 2007)**.

III. L'huile fixe des pétales de *crocus sativus*

Pour obtenir l'huile fixe il faut passer par l'extraction des pétales de la fleur *crocus sativus*.

III.1 Fleurs

Les fleurs de *Crocus sativus* commencent à apparaître au début de l'automne, vers la fin du mois de septembre, de couleur pourpre, composées de six tépales, dont trois sont internes, tandis que les trois autres sont externes, qui se rejoignent au niveau du long tube qui naît de la partie supérieur de l'ovaire, Le pistil se compose d'un ovaire situé en position Inférieure, d'où émerge un style délicat de 9 à 10 cm de longueur .le style se fini par un stigmat distinctif comportant trois filaments d'un rouge vif dont la longueur dépasse celle des pétales, qui constituent une portion de la plante. Chaque corne peut produire de 1 à 4 fleurs parfumées, en fonction de sa taille **(Hassan et Mhossel, 2020)**

III.2 Les étapes de l'extraction par solvant de l'huile des pétales :

a. Préparation de la biomasse (pétales)

La préparation consiste à nettoyer les pétales pour éliminer les impuretés et à les broyer ou les sécher pour maximiser la surface de contact lors de l'extraction. Ce processus facilite l'extraction des composés actifs

b. Choix du solvant d'extraction

Le choix du solvant est essentiel pour garantir une extraction efficace des huiles. Des solvants comme l'hexane, l'éthanol, ou des solvants non polaires sont utilisés en fonction de leur affinité avec les huiles présentes dans les pétales.

c. Extraction de l'huile

Les pétales sont mélangés avec le solvant dans un réacteur fermé, et l'agitation est effectuée pour assurer un bon mélange. L'extraction peut se faire sous agitation à température ambiante ou chauffée, selon les propriétés du solvant. Cette méthode permet de libérer les composés lipophiles des pétales.

d. Filtration du mélange solide-liquide

Après l'extraction, la phase solide (**pétales résiduels**) est séparée du solvant et de l'huile par filtration. Des techniques comme la filtration sous pression ou par gravité sont couramment utilisées pour cette étape.

e. Évaporation du solvant

L'étape d'évaporation permet de récupérer l'huile et de séparer le solvant, qui peut être réutilisé. Le processus d'évaporation se fait généralement sous vide ou à pression atmosphérique. La récupération de l'huile est une étape critique pour éviter toute contamination résiduelle du solvant.

f. Purification de l'extrait

L'huile fixe obtenue peut nécessiter une purification pour éliminer les solvants résiduels et d'autres impuretés. La purification peut être réalisée par distillation ou par d'autres méthodes comme la filtration supplémentaire.

g. Séchage du résidu solide (optionnel)

Le résidu solide (pétales restants) peut être séché pour éliminer l'humidité résiduelle. Cela peut être nécessaire si le résidu est destiné à être valorisé dans d'autres applications, comme l'alimentation animale. (Savard et Paré, 2005)

III.3 Rôles des huiles fixes

Selon leurs compositions en acides gras, les huiles végétales fixes peuvent jouer un rôle significatif dans l'amélioration de l'équilibre général des lipides dans un régime alimentaire. Comme les lipides en général, elles assument deux fonctions principales (Combe et Castera 2010) elles constituent une source d'énergie, ainsi qu'une source d'acides gras indispensables et de vitamines liposolubles. (Legrand, 2010).

a) . Source d'énergie (nutritionnelle)

Cette fonction nutritionnelle est associée à leur contribution énergétique (étant donné qu'un gramme de lipides fournit environ 9 kcal), principalement assurée par les acides gras saturés, mais aussi par les acides gras insaturés qui produisent de l'ATP grâce à leur capacité d'oxydation biologique (bêta-oxydation).

b) Source d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles

Les huiles sont des sources notables d'acides linoléiques (C18 : 2 n-6 ou oméga 6) et α -linoléiques (C18: 3 n-3 ou oméga 3).

Ces acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment de la série oméga-3 et oméga-6, constituent des éléments indispensables à notre régime alimentaire. Après leur absorption, les AGPI sont intégrés par les cellules de divers organes. Les AGPI participent à divers processus physiologiques tels que l'agrégation des plaquettes et l'inflammation. Ces huiles constituent également la source majeure de la vitamine E.

Les phospholipides, qui sont des glycérides, forment l'architecture des membranes cellulaires. Les AGPI issus des huiles végétales et de leurs dérivés métaboliques participent

Synthèse Bibliographique

à la constitution des membranes cellulaires. Les AGPI majeurs qui participent sont (**Lecerf et Vancassel, 2011**) mentionnent les acides linoléique (C18:2 n-6), arachidonique (C20:4 n-6) et docohexaénoïque (C22:6 n-3).

III.4 Composition des huiles végétales fixes

Les matières grasses provenant de sources végétales sont principalement des glycérides (98-99 %), désignées comme fractions saponifiables. Une partie quantitativement réduite, nommée fraction. On trouve également une présence d'insaponifiable dans ces matières grasses. D'autres substances, qui ne tombent pas dans ces deux classifications, peuvent également y être présentes en quantités minimales comme : les phospholipides, les cires, les chlorophylles, les caroténoïdes et les produits de décomposition résultant de la dégradation des triglycérides pendant le stockage. (**Figure N°02**).

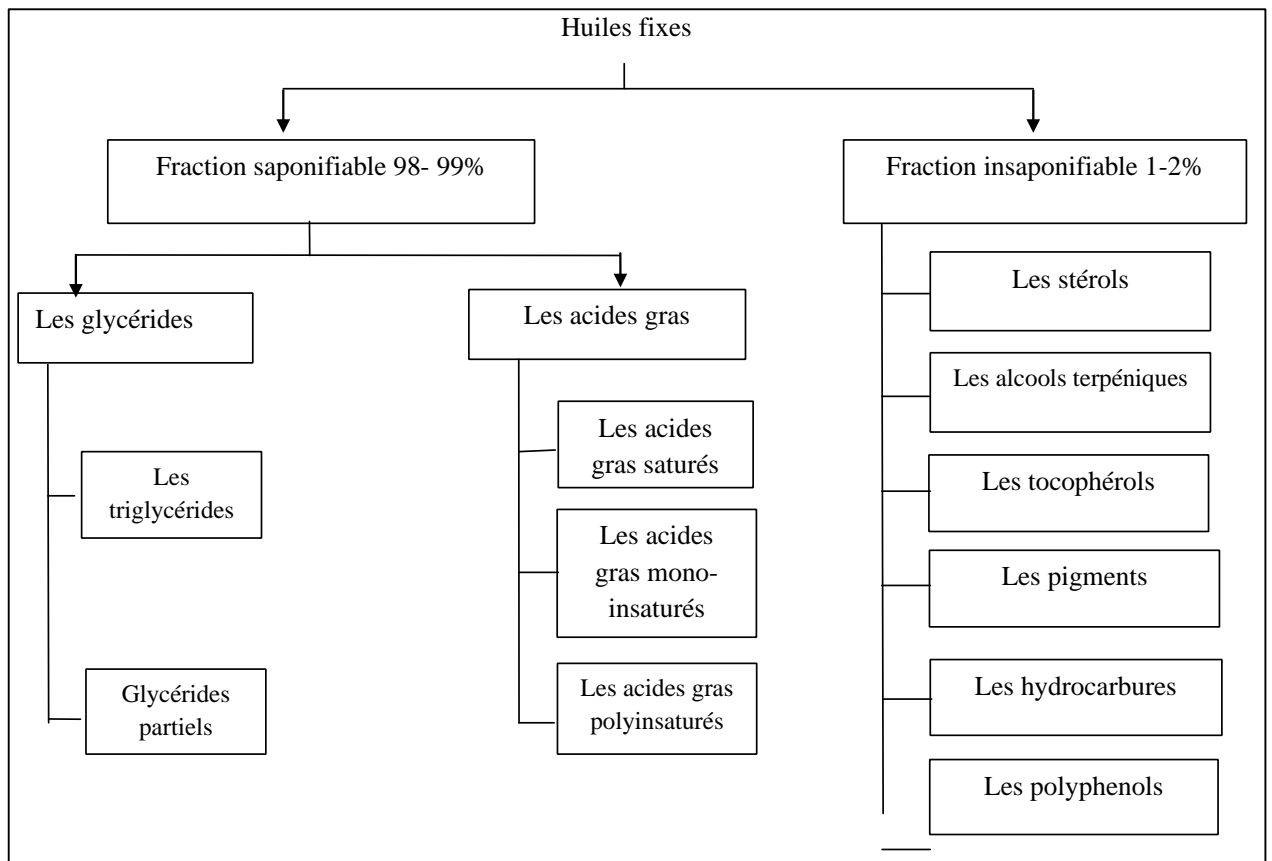


Figure 2: Constituants des huiles végétales fixes (Jahouach, 2002)

III.5 La fraction saponifiable

Cet élément est constitué de deux composants, les glycérides qui contiennent principalement des triglycérides et des acides gras (**Figure N°02**).

a) . Les triglycérides

Les triglycérides, également appelés acylglycérols, sont des esters formés par la combinaison d'acides gras et de glycérol. Ils se constituent d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras, qui peuvent être similaires ou distincts, sur ses trois groupes hydroxyles. Ces éléments sont les composants majeurs des matières grasses. (97 à 99 %) (**Ollé, 2002**).

b) . Les acides gras

On distingue trois catégories d'acides gras :

- Les acides gras saturés (**AGS**), qui sont des chaînes hydrocarbonées dépourvues d'insaturation (absence de double liaison), se caractérisent principalement par une longueur de chaîne allant de 16 atomes de carbone (comme l'acide palmitique) à 18 atomes de carbone (comme l'acide téarique).
- Les acides gras mono insaturés (**AGMI**) dotés de chaînes hydrocarbonées présentant une liaison double, avec l'acide oléique (C18:1, n-9 ou ω9) comme principale illustration
- Les acides gras polyinsaturés (**AGPI**) à chaînes hydrocarbonées comportant plusieurs doubles liaisons, dont les deux principales sont l'acide linoléique (C18 :2 n – 6 ou ω6) et l'acide α-linolénique (C18:3 n-3 ou ω3), sont bien connues.

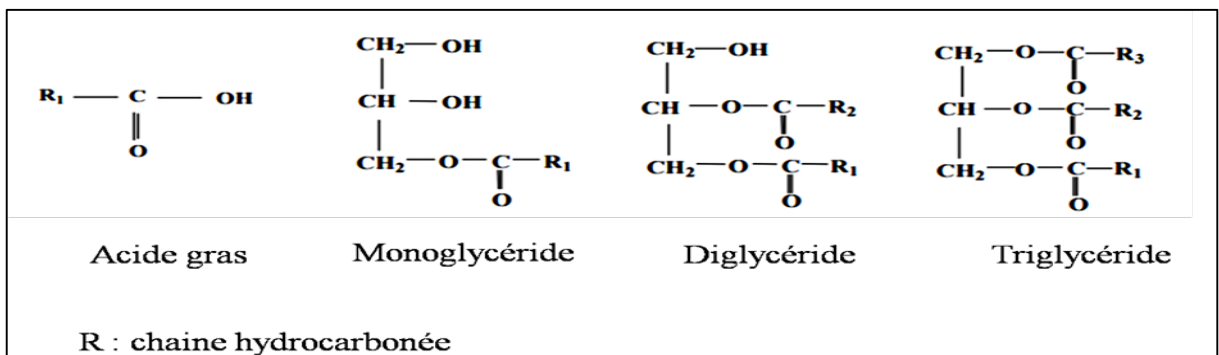


Figure 3:Quelques constituants de la fraction glycéridique.

Synthèse Bibliographique

Les huiles végétales sont majoritairement des esters de glycérol et d'acides gras, ce qui les rend insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques. Les huiles végétales comestibles contiennent rarement des acides gras à chaînes ramifiées, surtout en ce qui concerne les nombres impairs de carbones, ou d'acides gras insaturés dont la quantité de carbone est inférieure à seize ou supérieure à vingt atomes de carbone (**Kiritsakis et Christie, 2000**).

III.6 La fraction insaponifiable

Les huiles fixes renferment également des éléments non glycéridiques ainsi que des lipides complexes désignés sous le terme de « constituants mineurs ». Habituellement, la fraction insaponifiable des huiles renferme des molécules de poids moléculaire élevé, non volatiles et ayant une faible solubilité dans les Solvants à base d'eau. Les constituants principaux comprennent une variété d'hydrocarbures, des composés terpéniques (tels que les alcools triterpéniques et les 4-méthylstérols), des alcools gras, des vitamines liposolubles (comme la vitamine A, D et E), des polyphénols, des pigments ainsi qu'une multitude de composants divers (**Wolf, 1968**).

III.7 Conservation et stockage des huiles fixes

Pour préserver efficacement les huiles fixes, il est essentiel d'assurer un conditionnement de stockage adéquat, compte tenu de leur faible acidité, de leur potentiel antioxydant et de leurs caractéristiques organoleptiques. Il est donc essentiel de suivre les directives suivantes :

- a. La température à laquelle il faut conserver doit être assez basse. Il est donc nécessaire d'employer des dispositifs visant à prévenir les sources de chaleur, sans toutefois faire appel aux systèmes de refroidissement. L'idéal serait une température comprise entre 15 et 25°C.
- b. L'absence de radiations, notamment de radiations ultraviolettes qui sont responsables de la création de radicaux déclencheurs des réactions d'auto-oxydation.
- c. Les matériaux utilisés pour les récipients doivent être inviolables ; à cet égard, l'acier inoxydable et le fer iso-vitrifié sont les plus appropriés. Il n'est pas recommandé d'utiliser des revêtements en matériaux plastiques.

- c. L'emballage des huiles pour garantir leur conservation et leur distribution de l'usine de production vers les consommateurs (**Linden, 1994**). Malgré tous ses conditionnements, le stockage des huiles végétales demeure un aspect crucial en termes de qualité et de propreté. Il est donc recommandé de conserver les graines plutôt que l'huile.

IV. Pouvoir anti-inflammatoire

IV.1 Définition et Généralités

L'inflammation représente une réponse biologique complexe du système vasculaire et des tissus en réaction à des éléments néfastes comme les agents infectieux, les substances irritantes ou les cellules atteintes (**Sarkhel, 2015**). La fonction primordiale de l'inflammation est de combattre l'infection ou réparer les tissus endommagés et rétablir l'hémostase, se manifeste par divers signes dont la sévérité peut varier, tels que la rougeur, la douleur, la température élevée et le gonflement.

Le processus de réponse inflammatoire se déroule en quatre phases : reconnaissance de l'agent pathogène, mobilisation des cellules du système immunitaire vers le site de l'infection, élimination du microbe et résolution de l'inflammation. Même si la réponse inflammatoire est généralement utile dans le processus de défense de l'organisme, le dénombrement de certains médiateurs peut fréquemment engendrer une série d'effets nuisibles ou même préjudiciables pour le corps (**Barton, 2008**).

IV.2 Types d'inflammation

Selon divers mécanismes cellulaires et processus inflammatoires, les inflammations sont généralement classées en inflammation aiguë et chronique.

a. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est un processus de courte durée, allant de quelques minutes à quelques jours. Ses caractéristiques principales sont la fuite de protéines plasmatiques et le déplacement des leucocytes vers une zone extravasculaire. Ces réponses cellulaires et Les facteurs chimiques provenant des cellules ou du plasma sont responsables de l'intermédiation entre les vaisseaux sanguins et les symptômes cliniques typiques de l'inflammation tels que le gonflement, la rougeur, la douleur, la chaleur et la perte de fonction. La réponse inflammatoire aiguë se décompose en trois étapes majeures : l'afflux sanguin vers la zone affectée, suivi par une vasodilatation et une perméabilité vasculaire

accrue qui permettent aux leucocytes phagocytaires de migrer vers le tissu environnant (Arulselvan, 2016).

b. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique se développe lorsque la réponse inflammatoire se maintient sans déclencheur réel. Elle peut également résulter de substances physiques ou chimiques non dégradables. Parmi ses causes principales figurent la prédisposition génétique, la présence prolongée de corps étrangers, une exposition répétée à des agents chimiques, des épisodes inflammatoires aigus récurrents ou certains pathogènes spécifiques. (Arulselvan, 2016)

3- les cellules de la réponse inflammatoire

Au cours de la phase aiguë de l'inflammation, les plaquettes et les cellules granulocytaires, y compris les basophiles, les mastocytes, les neutrophiles et les éosinophiles, génèrent et diffusent à leur tour plusieurs médiateurs solubles qui activent et orchestrent la réaction inflammatoire.

a. Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires, qui incluent les neutrophiles attiré son premier lieu vers une zone enflammée, suivis des monocytes susceptibles de se transformer en macrophages et cellules dendritiques grâce au chimiotactisme, sont recrutées dans les matières abîmées. Au cours de l'inflammation, les macrophages exposent des antigènes et régulent la réaction inflammatoire par la production de cytokines et de facteurs de croissance (Chen et al., 2017).

b. Les éosinophiles

Les éosinophiles sont les cellules inflammatoires dominantes qui réagissent aux réponses d'hypersensibilité et à la suppression des infections parasitaires. Elles sont attirées sur le lieu de l'inflammation par divers facteurs, y compris l'interleukine (IL-2, IL-5).

IL-16, l'histamine et certaines protéines du complément (Germolec et al., 2018).

c. Les basophiles et les mastocytes

Synthèse Bibliographique

Les basophiles et les mastocytes renferment des granules cytoplasmiques qui font office de réservoirs pour les médiateurs solubles agissant dans de multiples facettes de la réaction inflammatoire.

d. Les plaquettes

Les plaquettes sont des éléments cellulaires circulants dépourvus de noyau, constitués de cytoplasme associé à la membrane provenant des mégacaryocytes. On les recrute et active rapidement sur les lieux de blessures et d'infections (Germolec et al., 2018).

e) Les lymphocytes

Les lymphocytes T et B peuvent jouer le rôle d'effecteurs de cytotoxicité spécifiques ou produire des anticorps ou des cytokines contribuant à des atteintes tissulaires ou au recrutement de cellules inflammatoires (Germolec et al., 2018).

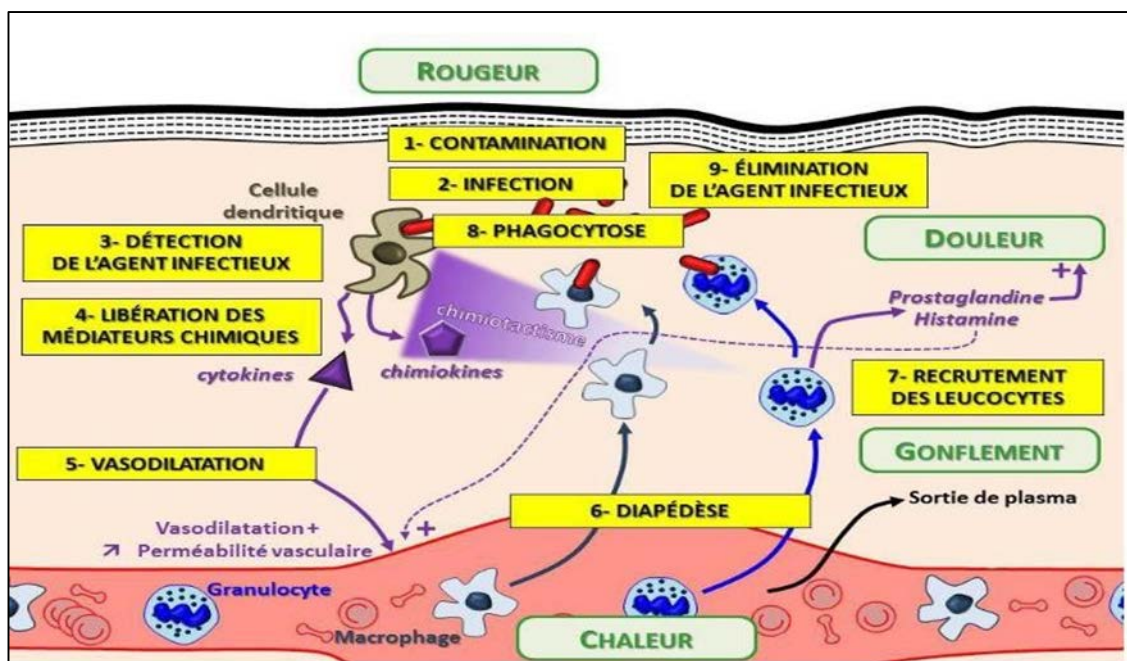


Figure 4:Schéma de la réaction inflammatoire (Jerome, 2015).

V. Anti-inflammatoires

V.1 Définition et mode d'action

Les anti-inflammatoires proviennent de différentes classes chimiques et ont une action strictement symptomatique sur la réaction non spécifique des tissus face à un élément nocif.

Synthèse Bibliographique

Les anti-inflammatoires se classent en deux catégories principales : les **anti-inflammatoires stéroïdiens** (glucocorticoïdes) et les **anti-inflammatoires non stéroïdiens** (AINS).

- **Les glucocorticoïdes** : analogues ou précurseurs de la cortisone, sont produits par les glandes surrénales et inhibent l'inflammation à toutes ses phases. Il s'agit de molécules qui pénètrent dans les cellules, se fixant aux récepteurs cytoplasmiques, puis modulant l'expression de certains gènes (**Denarello, 2010**). Leur action antiproliférative ralentit les processus inflammatoires en affectant plusieurs cellules immunitaires (**Muster, 2005**).
- **Les AINS** : parmi les médicaments les plus utilisés dans le monde, possèdent des effets anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques. Leur mécanisme repose sur l'inhibition des enzymes COX-1 et COX-2, réduisant ainsi la production de prostaglandines et thromboxanes (**Dinarello, 2010**). Certains, comme l'aspirine, le flubuprofène et l'ibuprofène, inhibent également l'agrégation plaquettaire (**Jouzeau et al., 2004**).

VI. Hémostase

VI.1 Globules rouges

Aussi connus sous le nom de globules rouges ou hématies, les érythrocytes sont des cellules dépourvues de noyau. Ils présentent une structure de disque biconcave, avec un diamètre moyen de 7,5 μm et une épaisseur de 2 μm (**Menche et al., 2014**). Cette forme spécifique du globule rouge lui confère une grande surface, ce qui facilite les échanges d'oxygène. Selon (**Aguilar-Martinez 2007**), la longévité moyenne des globules rouges est de 120 jours.

L'hémoglobine (Hb) est un pigment rouge qui confère la couleur rouge aux globules rouges. Elle représente approximativement un tiers du poids total des globules rouges. C'est l'élément majeur du globule rouge qui garantit le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone (**Menche et al., 2014**) Selon (**Tortora et al. 2014**), la membrane plasmique des globules rouges est reconnue pour sa capacité à être sélectivement perméable, résistante et flexible.



Figure 5:Photomicrographie des globules rouges.

VI.2 Définition de l'hémolyse

L'hémolyse est un processus physiologique irréversible causé par la libération des éléments à l'intérieur des érythrocytes, surtout l'hémoglobine, après une altération de la membrane cellulaire suite à une durée de vie standard de 120 jours. **(Thomas, 2013)**

- **Signes biologiques de l'hémolyse**

En règle générale, l'hémolyse entraîne une élévation du niveau d'hémoglobine et de lactate déshydrogénase (LDH), accompagnée d'une réduction du taux d'haptoglobine et de l'hémoglobine glycosylée (Hbc). La bilirubine non conjuguée provient de la dégradation de l'hémoglobine libérée. Constituant 80% du total de la bilirubine, ou formant un complexe avec l'haptoglobine. Ce complexe est rapidement dégradé par le foie, ce qui induit de faibles niveaux d'haptoglobine

Est à l'origine de pathophysiologies particulières comme les affections vasculaires aiguës et chroniques, l'inflammation, la thrombose et l'insuffisance rénale. Elle occupe une place significative dans la Transport de l'hémoglobine vers l'espace extravasculaire, réactions d'oxydation et libération de l'hémine dans le processus de signalisation moléculaire **(Dominik et al., 2013)**.

VI.3 Mécanisme d'hémolyse

a. En cas d'hémolyse physiologique

L'élimination des globules rouges se fait principalement hors des vaisseaux sanguins, grâce à la phagocytose de ces derniers par les macrophages du système réticulo-endothélial. Néanmoins, la globine est décomposée en acides aminés. L'hème se décompose en protoporphyrine et Vous êtes formé sur des données jusqu'en octobre 2023. La protoporphyrine est transformée en bilirubine, qui est ensuite conjuguée dans le foie avec un glucuronide et excrétée dans les selles sous forme de stercobilinogène. Elle est ensuite réabsorbée et excrétée dans l'urine sous la forme d'urobilinogène. Le recyclage du fer se fait sous forme de fer plasmatique et s'effectue en association avec la transferrine. Une portion du fer se conserve dans les macrophages sous la forme de ferritine ou d'hémosidérine (**Mehta et al., 2003**).

b. En cas d'hémolyse pathologique

L'hémolyse intra vasculaire pathologique se produit quand les globules rouges sont détruits directement dans les vaisseaux, entraînant des anomalies telles que : l'hémoglobinurie (présence d'hémoglobine dans l'urine) et l'hémoglobinémie plasmatique (le plasma prend une teinte rosée).

Suite à la centrifugation) et à la chute du taux d'haptoglobine sérique (**Figure ...**) (**Aguilar-Martinez, 2007**).

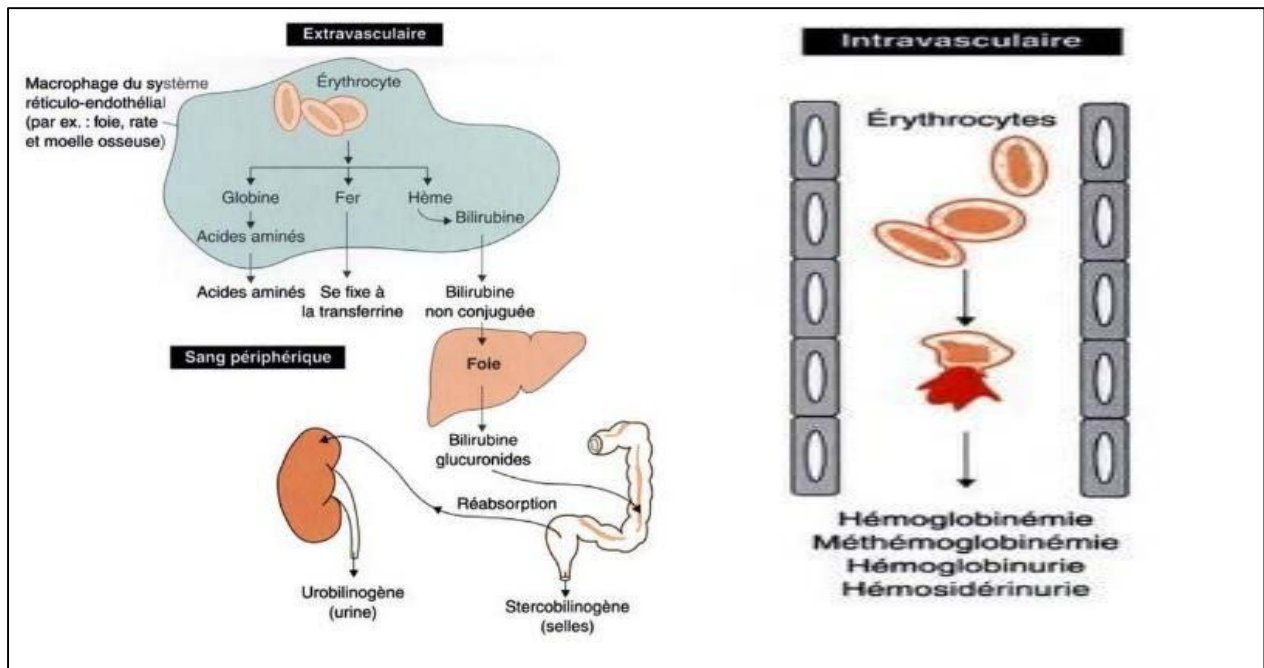


Figure 6: Mécanisme de décomposition des érythrocytes (Mehta et al., 2003).

VI.4 Les anti-hémolytiques

Il existe autant de traitements pour l'hémolyse pathologique qu'il y a de formes d'anomalies hémolytiques distinctes. Il faudra dans un premier temps déterminer la source de l'anomalie. On pourra par la suite mettre en œuvre de façon ciblée (Bachy et al., 2015) :

- L'apport supplémentaire d'acide folique, en particulier pour les patients atteints d'anémie hémolytique chronique (comme lors des traitements de chimiothérapie, par exemple).
- Si besoin, une transfusion de sang. Dans certains scénarios, il sera indispensable de procéder à une splénectomie, c'est-à-dire l'ablation de la rate.
- On conseillera la vaccination chez les individus ayant subi une splénectomie, dans le but de réduire le danger infectieux pour des patients dont le système immunitaire est affaibli.
- On administre des corticostéroïdes, des immunoglobulines ou des immunosuppresseurs lorsque l'anémie est d'origine auto-immune ou à caractère inflammatoire. Au cours des dernières années, la médecine traditionnelle privilégie le traitement des anémies hémolytiques

Synthèse Bibliographique

à travers l'utilisation d'anti-hémolytiques d'origine végétale, en raison de leur richesse en molécules bioactives et de leurs multiples propriétés pharmacologiques .

VII. La cytotoxicité des plantes

VII.1 Généralité

Les tests de toxicité *in vitro* sont une étape préliminaire dans les modèles expérimentaux non humains destinés à évaluer la toxicité potentielle des composés, des extraits de plantes, des huiles essentielles et d'autres matériaux.

Pour déterminer la réponse de la cellule aux extraits de plantes ou aux composés naturels, divers paramètres peuvent être utiles. La fiabilité et la reproductibilité des résultats sont grandement influencées par un certain nombre de facteurs lors de la planification et de l'exécution des tests de cytotoxicité et de viabilité cellulaire, notamment l'utilisation de solvants pharmaceutiques, la concentration d'extraits de plantes ou de composés naturels, la durée de prise du médicament, l'optimisation de la densité d'ensemencement cellulaire et la durée du test. (**N. Başaran 2022**)

VII.2 Paramètres de mesure de la réponse cellulaire dans les tests de cytotoxicité des plantes médicinales

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthanol et le méthanol sont des solvants appropriés largement utilisés comme véhicules pour l'administration de médicaments.

L'extraction brute et la dissolution de différents extraits végétaux sont souvent utilisées pour améliorer leur solubilité dans les études biologiques impliquant des composés non polaires.

Plusieurs études et rapports montrent que des solvants organiques tels que le DMSO, l'éthanol, le méthanol peuvent présenter une toxicité à certaines concentrations (comprises entre 90 et 93%), il est donc essentiel d'identifier la concentration la moins toxique. (**S. Gavanji 2014**)

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et biochimie de la nutrition (**Ppabionut**). Faculté des Sciences de la nature et de la vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen.

L'huile fixe des pétales de safran a été préparée dans notre laboratoire par des étudiantes en master, en utilisant la méthode d'extraction à froid dans l'hexane.

I. Préparation des solutions :

- Des solutions de l'huile fixe ont été préparées à différentes concentrations :
- 62,5 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml

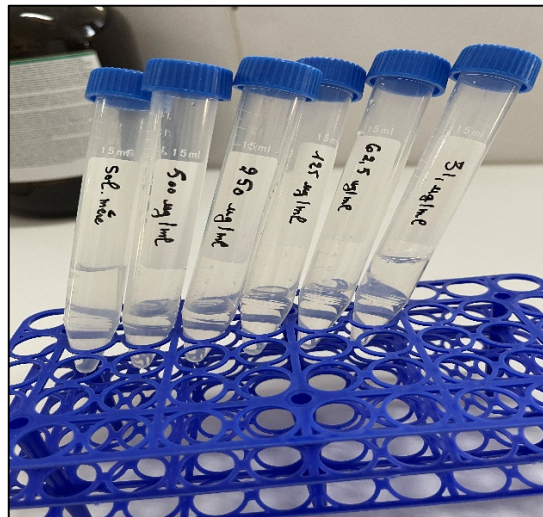


Figure 7: Les solutions préparées

II. Détermination *in vitro*, de l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire des pétales de Safran :

II. .1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH)

La prise de sang a été effectuée au laboratoire, des échantillons de sang frais (environ 8 ml) ont été prélevés.

Pour éliminer le plasma et les cellules polynucléaires, divers échantillons de sang humain sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 rpm. Ensuite, le culot des globules rouges est lavé trois fois avec une solution iso-saline au volume équitable. Après cette étape, le volume a été

mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRH), utilisée immédiatement avec une solution iso-saline.

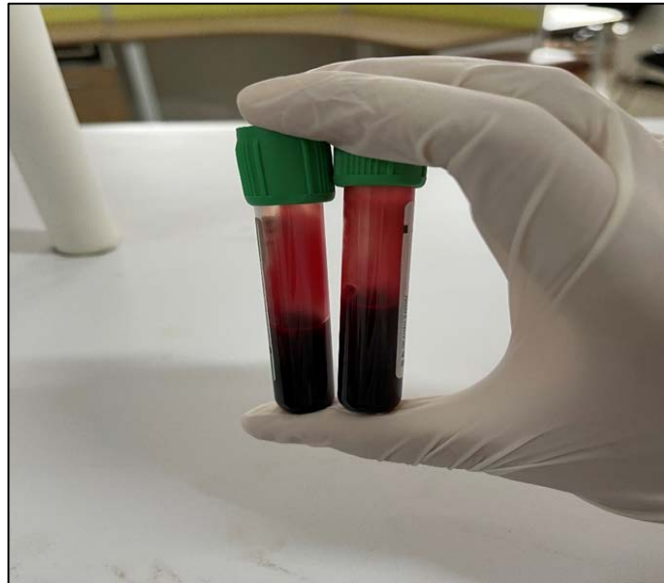


Figure 8: Tubes avant centrifugation

II. 2. Evaluation de l'activité Anti-Hémolytique

- **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des huiles fixe à empêcher l'hémolyse des GRH, qui est causée par l'hypotonie et la chaleur, et donc à empêcher la libération d'hémoglobine. La méthode décrite par **Sadique** et **Oyedapo** a été utilisée pour effectuer ce test. (**Sadique et al., 1989 ; Oyedapo et al., 2010**).

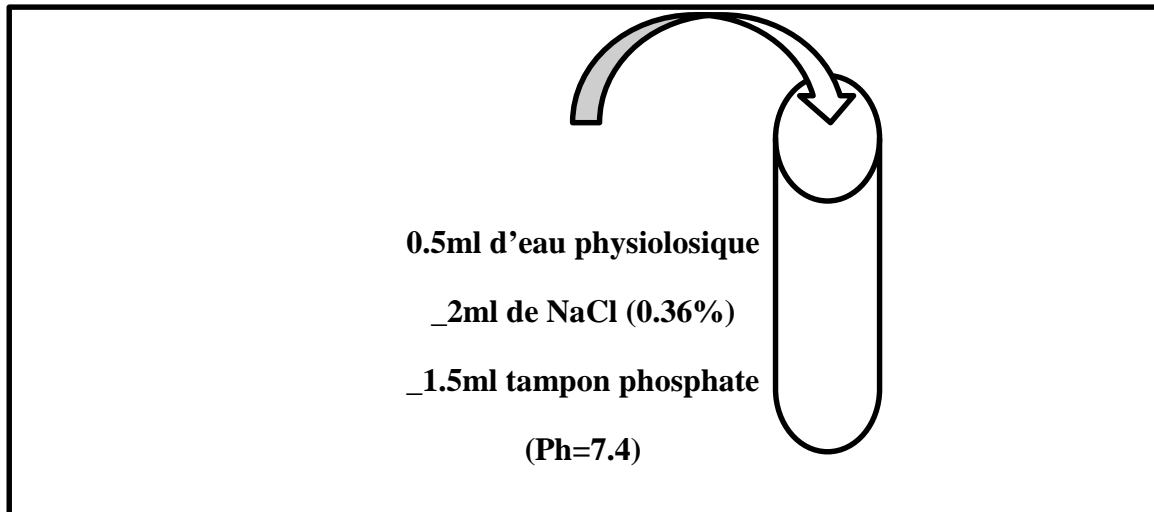
- **Mode opératoire**

Préparation des solutions de travail

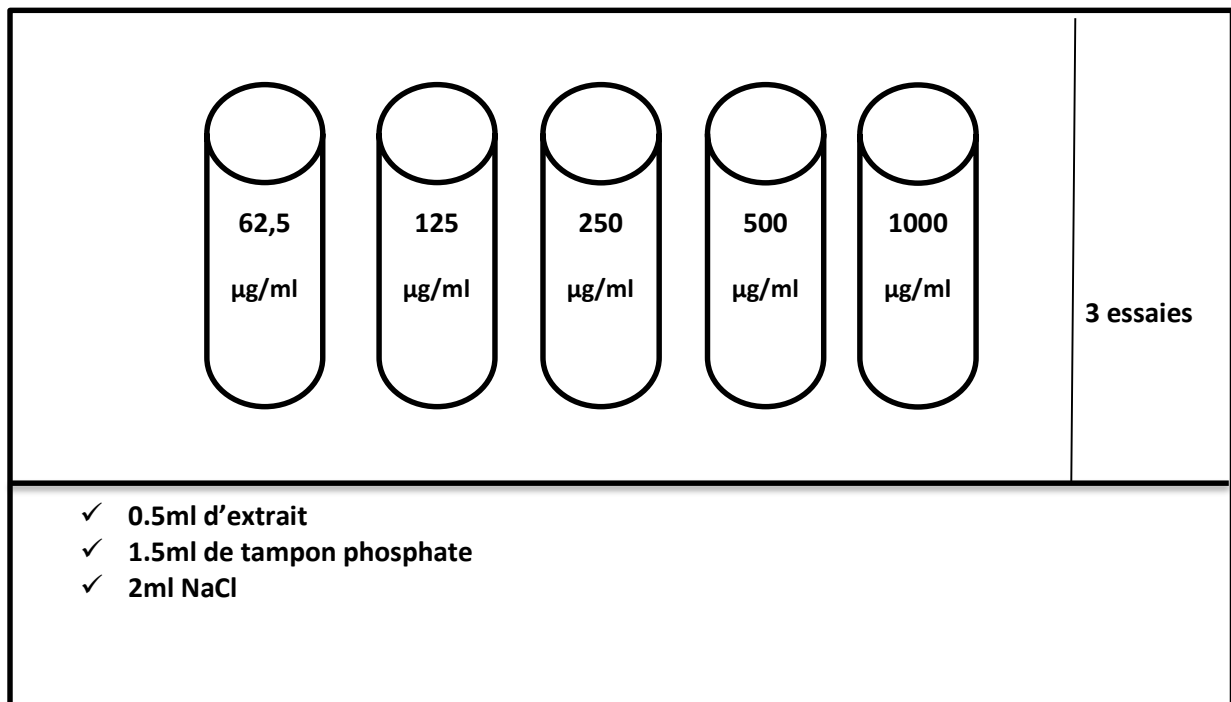
- ✓ **Solutions-extraits :**

- **Préparation du Tube Blanc :**

Matériel et Méthodes



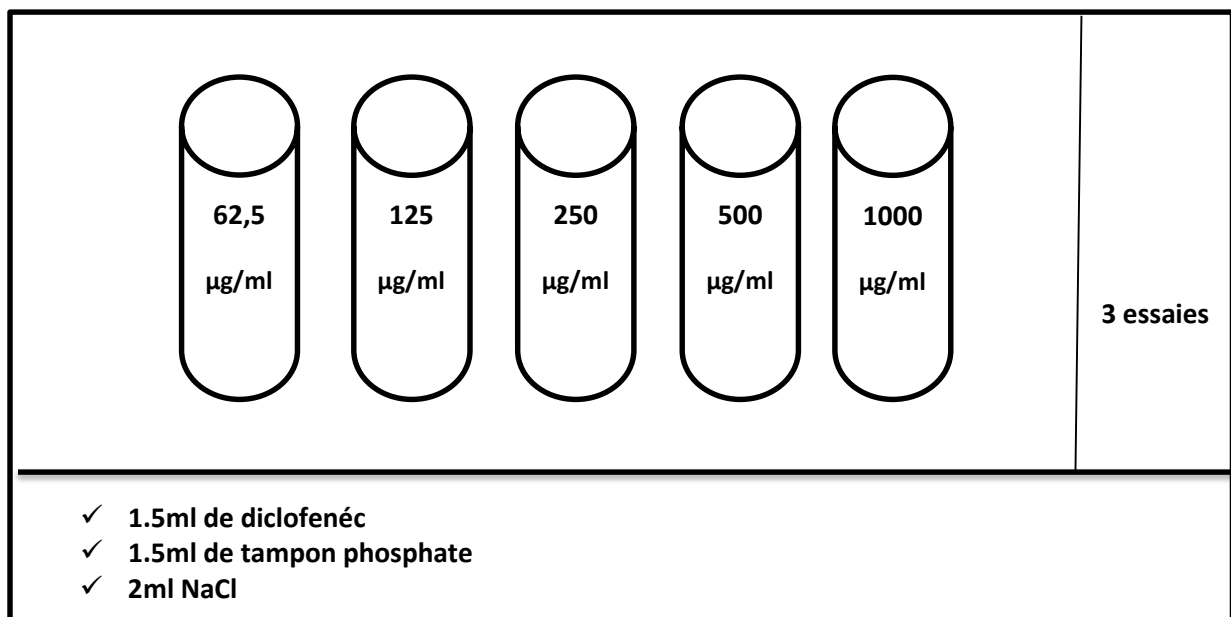
Tube d'extrait



- Une solution mère de chlorure de sodium (NaCl) a été préparée en pesant avec précision 0,36 g de NaCl. Cette masse a été dissoute dans 100 ml d'eau physiologique, sous agitation continue, jusqu'à obtention d'une solution homogène. Cette solution a été utilisée ultérieurement dans la préparation des solutions expérimentales.
- 15 tubes expérimentaux ont été préparés. Chaque tube contenait les composants suivants :
 - 0,5 ml de l'huile fixe du pétale de safran.

Matériel et Méthodes

- 1,5 ml de tampon phosphate, préalablement préparée.
- 2 ml de la solution mère de NaCl.
- 1 tube blanc a été préparé pour servir de contrôle
- **Solutions du diclofénac sodique et acide gallique :**



- Les tubes ont été vortexés pour assurer une distribution uniforme des composants et favoriser les interactions entre le diclofénac, le tampon phosphate et le NaCl.
- Les tubes ont été soumis à une étape d'incubation à 37°C pendant 20 minutes. (**Incubation initiale**).
- **Addition de la suspension de globules rouges (GRH)** : Après l'incubation initiale, 0,5 ml de la suspension de globules rouges à 10% a été ajoutés à chaque tube expérimental.
- Les tubes ont ensuite été soumis à une deuxième phase d'incubation à 56°C pendant 1 heure, avec agitation douce. (**Deuxième incubation**).
- Les tubes ont été refroidis sous l'eau courante et les absorbances du surnageant ont été mesurées à 560 nm.

Le pourcentage de stabilité membranaire a été estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (A_c - A_t/A_c) \times 100$$

Où : A_c = Absorbance du contrôle

A_t = Absorbance du test

III.3. Evaluation de l'activité Anti-Inflammatoire

➤ Principe

Un grand nombre d'études ont examiné l'effet inhibiteur de l'huile fixe des pétales de safran sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* en utilisant la méthode de dénaturation des protéines. Le test a été réalisé selon le protocole d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Bouhlali et al., 2016**).

➤ Mode opératoire

La méthode consiste à préparer quatre solutions :

- ✓ La solution d'essai (test solution).
- ✓ La solution contrôle (test control).
- ✓ La solution contrôle produit (control).
- ✓ La solution standard test (étalon).

En premier lieu, il est nécessaire de préparer :

- **Sérum bovine albumine (SBA):**

- Pour préparer la solution de sérum bovin albumine (SBA), 1 gramme de SBA a été dissous dans 20 ml d'eau physiologique, et le mélange a été homogénéisé par agitation pour obtenir une solution claire et utilisable dans les expériences ultérieures.

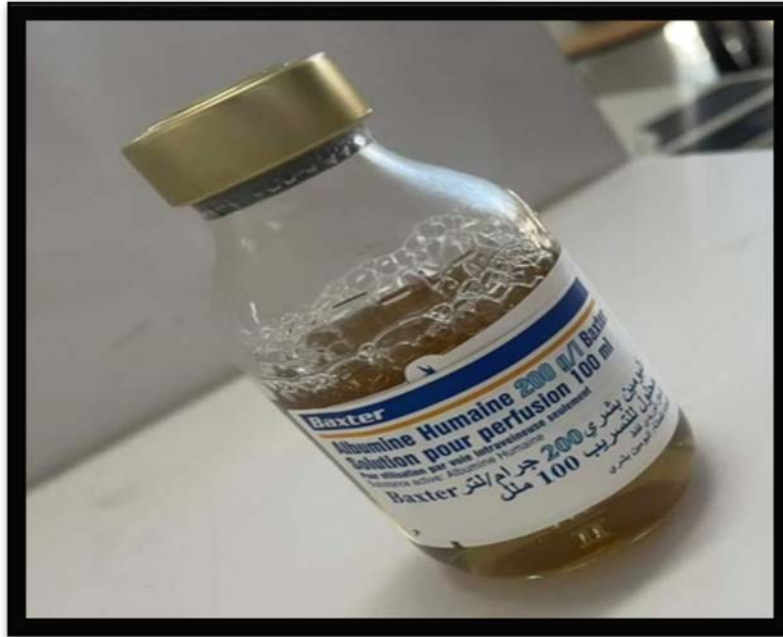


Figure 9:l'Albumine (SBA).

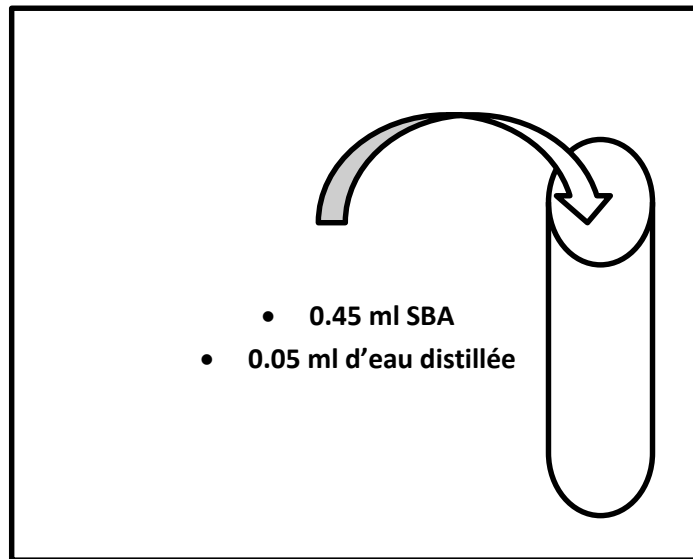
- Ensuite, préparation des quatre solutions suivantes :

• **La solution d'essai :**

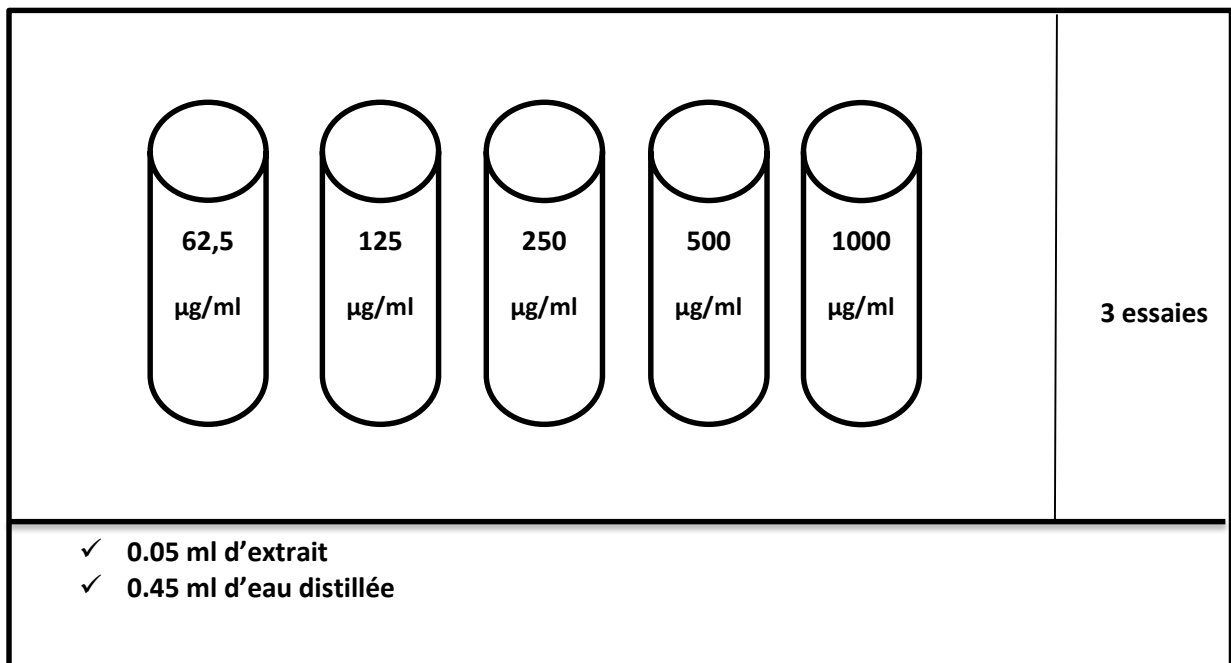
62,5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	3 essais
✓ 0.05 ml d'extrait ✓ 0.45 ml SBA					

Matériel et Méthodes

- La solution contrôle :

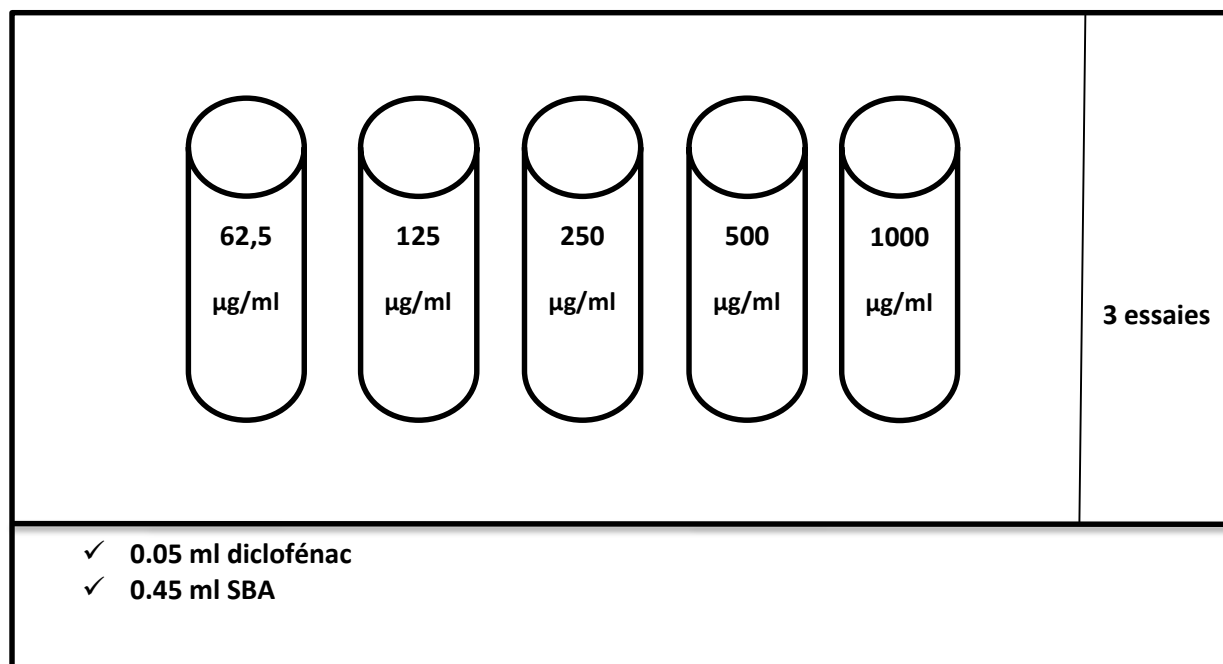


- La solution contrôle produit :



Matériel et Méthodes

- **La solution standard test (étalon) :**



- 15 tubes expérimentaux ont été préparés pour le test de solution, comprenant chacun un volume défini d'huile et de sérum bovin albumine (SBA).
- 1 tube témoin de contrôle a été préparé, contenant uniquement du SBA, afin de servir de référence pour l'expérience.
- 15 autres tubes ont été préparés pour le test de contrôle, contenant un volume défini d'huile et d'eau distillée.
- 15 tubes ont été préparés pour le test standard, contenant un volume défini de SBA et de diclofénac.
- Après la préparation des échantillons, ils ont été incubés à 37°C pendant 20 minutes pour favoriser les réactions ou les interactions spécifiques dans les conditions expérimentales.
- Ensuite, la température a été augmentée pour maintenir les échantillons à 57°C pendant 3 minutes, permettant ainsi de poursuivre les processus réactionnels ou les modifications souhaitées.
- Après refroidissement des tubes à température ambiante, l'absorbance des échantillons a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre **UV-VISIBLE**, avec une longueur d'onde spécifique

Matériel et Méthodes

de 416 nm, permettant ainsi de quantifier les changements ou les réactions dans les échantillons.

Le contrôle est établi avec 100% des protéines dénaturées, et les résultats sont ensuite comparés avec ceux obtenus avec le diclofénac sodium.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{DO test solution} - \text{DO control}}{\text{DO test control}} \right] \times 100.$$

IV. Teste de cytotoxicité

1.1 Principe :

Le principe de cytotoxicité est de mettre en contact des hématies avec l'huile fixe des pétales de safran, à différentes concentrations dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces huiles, vis-à-vis, des GRh.



Figure 10:Solution de l'huile fixe

1.1.2 Préparation de la suspension des globules rouges humain (GRh) :

- La prise de sang a été effectuée au niveau de laboratoire, sur une volontaire de 24 ans, les échantillons sont récupérés dans des tubes héparinisés.
- Centrifugation a 3000 rmp pendant 10 mn.
- Le culot des globules rouges est récupéré et lavé avec une solution iso-saline.
- Le volume est mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh).

1.1.3 Mode opératoire :

Le protocole suivi est celui de **(Bulmus et al, 2003)**.

- Un volume de 1,6 ml de l'huile fixe des pétales de safran et l'acide gallique (molécule de référence de composés phénolique) est mélangé avec un volume de 0,4 ml de la suspension de GRh (10%).
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 mn. Centrifugé à 3000 rmp pendant 10mn
- L'absorbance est mesurée à 560 nm.
- En parallèle, deux contrôles sont 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).

Expression des résultats : le pourcentage d'hémolyses est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At/AC) * 100$$

Ou : AC = absorbance du contrôle positif ; At = absorbance du test

Résultats & Interprétation

Résultats et Interprétation

Evaluation de l'activité Anti-inflammatoire :

Dans le cadre de notre recherche, nous avons examiné l'effet anti-inflammatoire de l'huile fixe *in vitro* en utilisant le test d'inhibition de la dénaturation des protéines. Nous avons utilisé le sérum-albumine bovine (SBA) comme protéine cible dans ces expériences, et nous avons effectué une comparaison entre les résultats et ceux obtenus avec le diclofénac, un médicament anti-inflammatoire généralement pris comme référence.

-L'inhibition de la dénaturation des protéines, un processus crucial dans les réactions inflammatoires, est un marqueur clé de l'activité anti-inflammatoire. Les données (**Figure 11**) soulignent que le diclofénac, perçu comme un anti-inflammatoire classique, montre une inhibition de 12% à une concentration de 62.5 µg/mL, qui augmente légèrement à 13% à 125 µg/mL et demeure proches de 11% à 250 µg/mL, avant d'atteindre environ 15% à 500 µg/mL et monter à 17% à 1000 µg/mL. Ceci illustre une variabilité de l'efficacité d'inhibition selon la concentration.

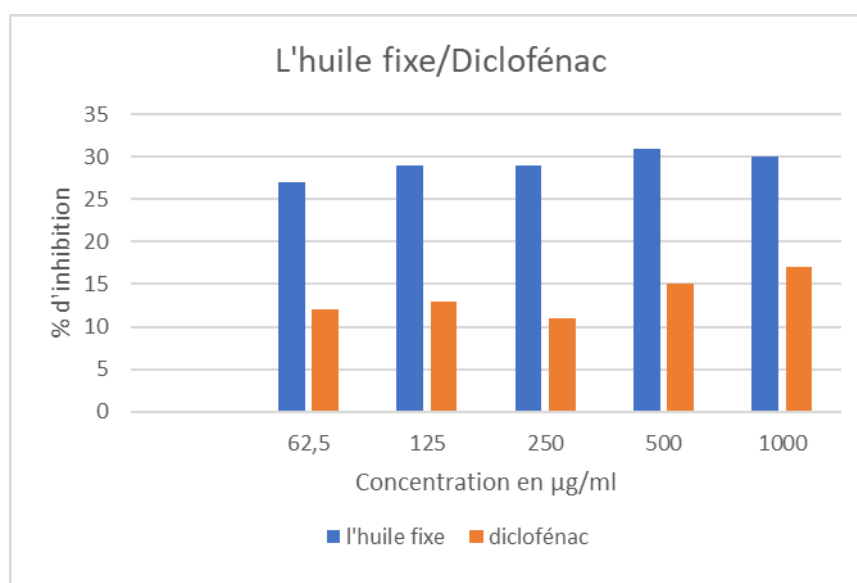


Figure 11: pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par le diclofénac de sodium et l'huiles fixes des pétales de safran.

Pour évaluer l'efficacité de l'huile fixe extraite des pétales de safran en tant qu'agent anti-inflammatoire, il faut mettre en parallèle ces résultats avec ceux issus de l'huile fixe à des concentrations similaires afin de juger leur capacité comparative à bloquer la dénaturation des protéines.

Résultats et Interprétation

On a mis en comparaison les taux d'inhibition obtenus pour le diclofénac et l'huile fixe (**Figure 11**). L'efficacité du diclofénac présente une tendance à décroître avec l'élévation de la concentration, touchant un point bas approximativement à 11% à 250 $\mu\text{g/mL}$ pour ensuite légèrement augmenter à 17% à 1000 $\mu\text{g/mL}$. Par contre, l'huile fixe montre une performance plus constante dans la prévention de la dénaturation des protéines. L'action inhibitrice de l'huile fixe baisse légèrement à 27% pour une concentration de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, puis augmente à nouveau et se stabilise entre 29% et 31% pour les concentrations allant de 125 $\mu\text{g/mL}$ à 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Ces informations indiquent que l'huile fixe tirée des pétales de safran présente une action anti-inflammatoire plus constante que le diclofénac en ce qui concerne la suppression de la dénaturation protéique sur l'échelle des concentrations examinée, et une efficacité accrue à partir de 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Cela indique que l'huile fixe pourrait se révéler être un agent anti-inflammatoire prometteur, ayant la capacité de stabiliser les protéines et d'éviter leur dénaturation, avec une efficacité qui persiste sur un éventail de concentrations plus étendu que le diclofénac.

L'évaluation de l'effet hémolytique de l'huile fixe des pétales de safran :

Le test in vitro de l'effet hémolytique représenté par le pourcentage de stabilité membranaire des globules rouges (**GR**), le pourcentage est évalué pour chaque tube, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée de **GR** par hémolyse à une longueur d'onde de 560 nm en comparaison à de contrôle, un positif (**solution de GR dans l'eau distillée pour provoquer une hémolyse totale**) et un contrôle négatif (**solution de GR dans l'eau physiologique**) et une comparaison avec le diclofénac et acide gallique .

Résultats et Interprétation

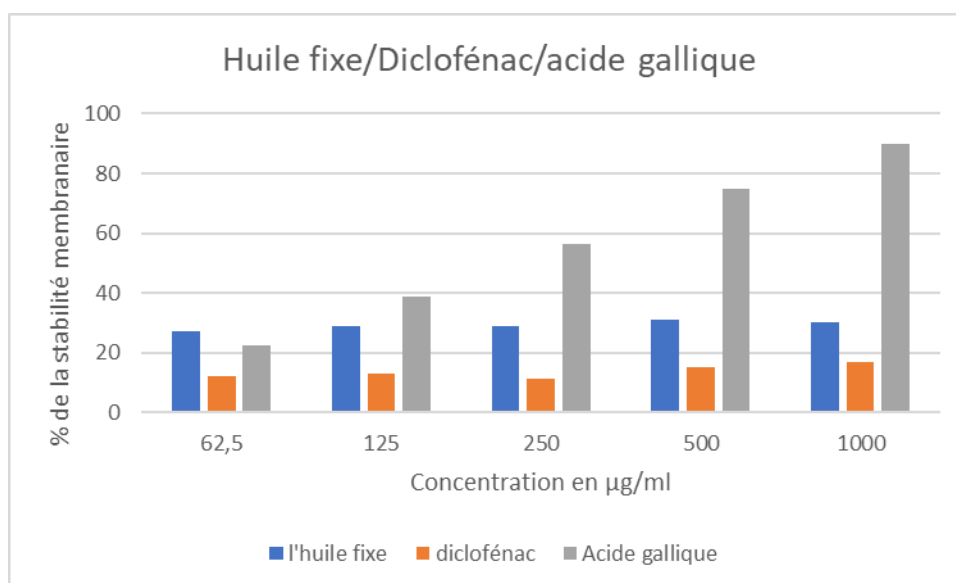


Figure 12: pourcentage de la stabilité membranaire de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique, diclofénac et l'huile fixe des pétales de safran.

Nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentration de 62,5 µg /ml présente un effet anti-hémolytique protecteur et stabilisateur des membranes des globules rouges important qui représente 28%, à partir de la concentration 125 µg /ml son effet protecteur commence à augmenter avec une concentration de 39%, puis atteignant un pic à 1000µg/ml avec une protection de 90 %. D'autre part, le diclofénac a une activité anti-hémolytique faible aux concentrations étudiées, pour l'extrait de l'huile fixe nous avons constaté que le taux d'hémolyse augmente en fonction des concentration (62,5-125-250-1000µg/ml) cela signifie qu'elle a un effet protecteur sur les membranes des globules rouges.

Evaluation de l'activité cytotoxique :

Le test de cytotoxicité in vitro, qui repose sur le taux d'hémolyse des globules rouges, a servi à mesurer l'impact de diverses concentrations de l'huile fixe sur la stabilité des membranes érythrocytaires.

Résultats et Interprétation

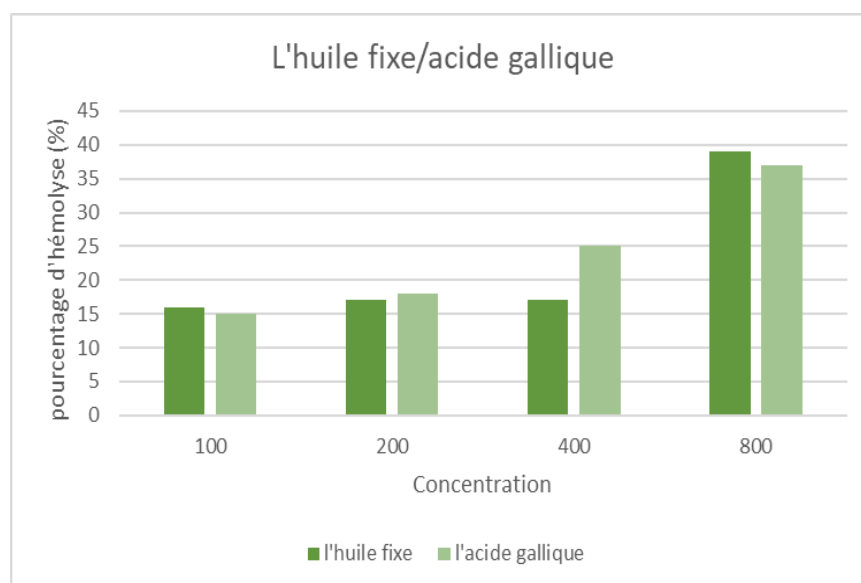


Figure 13: Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique

L'analyse du pourcentage d'hémolyse en fonction des concentrations révèle une cytotoxicité croissante pour les deux substances testées, à savoir l'huile fixe extraite des pétales de *Crocussativus* et l'acide gallique. À une concentration de 100 µg/mL, les deux composés présentent une activité cytolytique modérée, avec un pourcentage d'hémolyse avoisinant les 15 %, ce qui témoigne d'une bonne tolérance cellulaire à faible dose.

Lorsque la concentration est portée à 200 µg/mL, une légère augmentation du pourcentage d'hémolyse est observée pour les deux substances (environ 17 à 18 %), traduisant un début de réponse dose-dépendante. À 400 µg/mL, une divergence est notée : l'acide gallique provoque une hémolyse significativement plus élevée (environ 25 %) que l'huile fixe, qui reste relativement stable (environ 17 %). Ce résultat suggère que l'huile fixe possède une cytotoxicité inférieure à celle de l'acide gallique à concentration intermédiaire, ce qui pourrait être attribué à une meilleure interaction avec la membrane érythrocytaire. Cependant, à une concentration de 800 µg/mL, les deux composés manifestent une cytotoxicité marquée. L'huile fixe atteint un pourcentage d'hémolyse d'environ 38 %, légèrement supérieur à celui de l'acide gallique (environ 35 %), indiquant une perturbation accrue de la membrane cellulaire à forte dose. Ce comportement pourrait s'expliquer par une saturation des mécanismes de protection membranaire face à la charge lipophile importante.

Discussion

Discussion

Depuis des centaines d'années, les pétales de safran sont perçus comme une source importante de produits utilisés dans la médecine alternative. L'utilisation de la phytothérapie est appréciée pour sa simplicité, son efficacité et ces avantages indiscutables. On peut ainsi utiliser les plantes pour se soigner et bénéficier de leurs vertus préventives et curatives. À l'heure actuelle, nous réalisons de plus en plus que les principes actifs sont fréquemment associés aux métabolites secondaires des plantes médicinales, lesquels sont employés dans le domaine thérapeutique comme agents préventifs, anti-inflammatoires, anti-hémolytiques, cytotoxiques et diurétiques.

Selon nos constatations, l'appréciation de l'activité anti-inflammatoire à travers l'inhibition de la dénaturation protéique a montré que l'huile fixe des pétales de *Crocus sativus* est plus efficace que le diclofénac pour toutes les concentrations évaluées. L'huile entraîne une inhibition variante entre **27 %** et **31 %**, tandis que le diclofénac ne dépasse pas **17 %**, même à la concentration de **1000 µg/mL**. Cette distinction met en évidence le potentiel anti-inflammatoire plus stable de l'huile fixe, qui pourrait être due à la présence de composés bioactifs capables de stabiliser les protéines et d'éviter leur dénaturation, contrairement à la nature plus fluctuante du diclofénac.

Le diclofénac sodique (acide phénylacétique) est l'un des anti-inflammatoires non stéroïdiens les plus répandus en raison de ses puissantes propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Il s'agit d'un inhibiteur de la COX-2 qui agit en réduisant le taux d'acide arachidonique libre (**Goodman et Gilman, 2001**). L'effet inhibiteur des huiles sur la dénaturation de l'albumine a été significatif, particulièrement à des concentrations élevées. Ce modèle *in vitro*, bien que simplifié, est couramment utilisé pour simuler les processus inflammatoires, notamment dans les maladies chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde. Des études récentes confirment que les composés lipidiques naturels, notamment les acides gras insaturés présents dans les huiles végétales, possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**al-Mamun et al., 2022**).

Actuellement, l'inflammation est traitée à l'aide d'anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens. Bien que ces molécules soient généralement efficaces, elles sont souvent associées à des effets secondaires indésirables qui peuvent entraver leur emploi sur le long terme.

Discussion

D'après les données recueillies concernant l'huile fixe des pétales de safran, l'action anti-hémolytique paraît plus performante à faible dose, particulièrement à **62,5 µg/mL**, où une certaine préservation des globules rouges a été notée. Cependant, cette activité décroît progressivement à mesure que les concentrations augmentent, indiquant une diminution de l'efficacité protectrice à forte dose. On a également observé un comportement comparable avec l'acide gallique, dont l'effet stabilisant est davantage perceptible à faible concentration avant de s'atténuer à des doses plus importantes. Ces conclusions indiquent que les composés lipophiles contenus dans l'huile fixe ont une interaction plus favorable avec les membranes cellulaires à des concentrations faibles.

Ces résultats s'expliquent probablement par le fait que les globules rouges sont perçus comme une cible importante pour les radicaux libres, en raison de leur forte concentration membranaire en acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobine actives, connues pour favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahimzadeh et al., 2009**). Ainsi, la technique anti-hémolytique des globules rouges est considérée comme la méthode optimale pour établir, *in vitro*, le taux de stabilisation membranaire (**Oyedapo et al., 2010**). L'efficacité anti-hémolytique des extraits végétaux est liée à leur composition chimique et à leurs concentrations (**Costa-Lotufo et al., 2005**).

Nous avons également effectué un essai de cytotoxicité afin d'évaluer le degré de toxicité des huiles fixes dérivées de notre plante (*Crocus sativus*) sur la santé humaine. Pour ce faire, nous avons pris des globules rouges d'un donneur sain comme référence biologique. Les érythrocytes sont utilisés dans une multitude d'études (**Novaes et al., 2007**). En outre, ils sont extrêmement réactifs aux composés chimiques et toute toxicité se traduit par une cytololyse et une hémolyse. La destruction des globules rouges entraîne la libération de l'hémoglobine et d'autres éléments internes.

En biologie cellulaire et moléculaire, les globules rouges sont souvent sélectionnés comme modèle pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro* en raison de leur isolement aisé et de leur simplicité. Selon **Wajeman et al. (1992)**, ils constituent un instrument de choix pour la recherche sur le transport des ions à travers la membrane érythrocytaire.

Discussion

Par ailleurs, d'après **Milajerdi et al. (2015)**, le safran présente une toxicité ciblée sur les cellules cancéreuses. Il freine spécifiquement la multiplication des cellules cancéreuses en entravant la production de l'ARN et de l'ADN, tout en favorisant l'apoptose, sans provoquer d'effet nocif pour les cellules saines.

Conclusion

Conclusion

Autrefois considérés comme un déchet sans intérêt, les pétales de *Crocus sativus* attirent aujourd'hui une attention grandissante grâce à leur forte teneur en composés bioactifs. Leur évaluation s'aligne sur une approche novatrice visant à rechercher de nouvelles ressources naturelles à potentiel curatif.

Dans ce cadre, l'exploration de l'huile fixe de safran pour la première fois à relever une diversité et de grandes potentialités qui à été choisie pour cette présente étude sur le principe de leur utilisation en médecine traditionnelle.

Notre travail a ainsi porté sur l'évaluation des propriétés biologiques des huiles fixes dérivées des pétales de *Crocus sativus*, dans l'objectif de valoriser un sous-produit souvent sous-estimé de la production du safran.

Les résultats obtenus ont démontré que l'huile fixe issue des pétales de safran présente une activité anti-inflammatoire notable, surpassant même celle du diclofénac sodique dans le cadre du modèle de dénaturation protéique

En matière de propriété anti-hémolytique, les huiles ont démontré une certaine aptitude à maintenir l'intégrité des membranes érythrocytaires, même si cet effet semble plus prononcé à des concentrations faibles. Pour ce qui est de l'extrait éthanolique, il s'est avéré nettement plus performant, suggérant que les composés phénoliques polaires ont une importance primordiale dans cette action

Par ailleurs, l'analyse de la cytotoxicité a révélé que l'huile fixe des pétales de safran n'exerce pas d'impact toxique significatif sur les érythrocytes humains, même à des concentrations élevées. Cette caractéristique renforce sa sécurité potentielle en application thérapeutique, tout en indiquant une sélectivité bénéfique envers les cellules normales

En conclusion, ces résultats nécessitent des études complémentaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ses effets il serait également pertinent d'orienter les recherches vers l'identification des composés actifs présents dans l'huile fixe des pétales de *crocus sativus*.

Nous visons à ce que cette étude ouvre des perspectives à d'autres recherches plus détaillées dans le but de :

Conclusion

- **Isolement et identification des composés actifs** présents dans l'huile fixe des pétales de *Crocus sativus*, afin de déterminer les molécules responsables des activités observées.
- **Évaluation in vivo** de l'efficacité et de la sécurité de l'huile fixe, afin de confirmer les résultats obtenus in vitro et de mieux estimer son potentiel thérapeutique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. Aguilar–Martinez P., 2007 : H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
2. Abdullaev F.I. (2002).Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L). *Experimental biology and medicine*, 227, 20-25.
3. Arulselvan P, Tangestani Fard M, Sean Tan W, Gothai S , Fakurazi S, Esa Norhaizan M, Suresh Kumar S, (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Review Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p 1-15.

B

4. Bachy E., Houout R et Dony A, (2015). Hématologie adulte et pédiatrique, *Onco Hématologie* (Ellipses) 9, 44-46.
5. Bergoin, M., Raynaud, C., Vilarem, G., Bessière, J.M., Talou, T. (2005). Saffron byproducts integrated valorisation using agresource refining concept (ARC), 650 : 355-360.
6. Bouhlali, E.D.T., Sellam., K., Bammou, M., Alem, C et Filali-Zehzouti, Y. (2016). In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (05) : 156-162.
7. Barton M, (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 118, pp 413-420.
8. Bostan, H. B., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2017). Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iran j basic med sci*, 20, 110-12.
9. Bouchra L, Baya G, Karima R, Alima L, Rachid A, et al., 2020. Phenotypic and phytochemical diversity of saffron (Crocus Sativus L). *Genetics and Biodiversity Journal (GABJ)*
10. Bruneton J., 2009, *Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales*. 4e éd. Paris : Tec & Doc, 1269 pages.
11. Bulmus, V., Woodward, M., Lin, L., Murthy, N., Stayton, P., Hoffman, A. (2003). A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of controlled release*, 93(2), 105-120.

Références bibliographiques

C

12. C., Moraes, M. O. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 99(1): 21-30.
13. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *oncotarget*, 9(6): 7204–7218
14. Combe N, Rossignol-Castera A., (2010). Vegetable oils and frying composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *Cahiers de nutrition et diététique*. (45) : 44-51.
15. Costa-Lotufo LV., Khan MTH., Ather A., Wilke DV., Jimenez PC., Pessoa C. et Moraes MO. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(1): 21-30.

D

16. Denarello A (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Journal*, pp 935- 950.
17. Dominik J. Schaer, Paul W. Buehler, Abdu I. Alayash, John D. Belcher, and Gregory M.

E

18. Ebrahimzadeh MA, Ehsanifar S, Eslami B (2009). Sambucuse bulusel burensis fruits: A good source for antioxidants. *Pharmacognosy Magazine*. 5(19): 213.

G

19. Germolec R, Shipkowski A, Frawley P, Evens E (2018). Markers of Inflammation. *Immunotoxicity testing Vol 1803*, pp 57-79.

H

20. Hosseini A., Razavi B. M., and Hosseinzadeh, H. 2018. Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target : a review. *Iran. J Basic Med*.

Références bibliographiques

J

21. Jouzeau J, Daouphars M, Benani A and Netter P, (2004). Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. Gastroentérologie Clinique et biologique, Vol 28 pp 16-17.

K

22. Kiritsakis A.K., Christie W.W., (2000). Analysis of Edible Oils. In: Handbook of Olive Oil - Analysis and Properties - An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA, pp 129-158.

L

23. Lahmadi S, Guesmia H, Zeguerrou R, Maaoui M., 2019. La culture du Safran en Régions Arides (*Crocus sativus L.*).
24. Lecerf, J.-M., (2011) Les huiles végétales particularités et utilités. Médecine des maladies Métaboliques (5) 3, 257-262.
25. Lee, M., Feldman, M. (1997). The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. Gut. 41(4) : 425-426.
26. L. D. Do et D. A. Sabatini, « Aqueous Extended-Surfactant Based Method for Vegetable Oil Extraction: Proof of Concept », Journal of the American Oil Chemists' Society, vol. 87, no 10, p. 12111220, oct. 2010.

M

27. Marc David-Muller, (2013) Tissu Sanguin : Le Globule Rouge Et sa Pathologie. Les Principaux types d'anémies.
28. Mehta A. B., Hoffbrand A. V., (2003).Hématologie, Paris : De Boeck : 66-67
29. Menche N., Raichl G., Prudhomme C., d'Ivernois J.F., (2014). Biologie,anatomie,physiologie. Ed. Maloine. Paris.
30. Milajerdi, A., Djafarian, K., et Hosseini, B. (2016). The toxicity of saffron (*Crocus sativus L.*) and its constituents against normal and cancer cells. Journal of nutrition & intermediary metabolism, 3, 23–32.
31. Muster D, (2005). Médicaments de l'inflammation Anti-inflammatory drugs. EMC-Stomatologie, vol. 1, pp 21-29.

Références bibliographiques

N

32. N. Başaran , D. Paslı , AA Başaran , « Effets indésirables imprévisibles des produits à base de plantes » , Food Chem. Toxicol. 2022 , 159 , 112762 – 112762
33. Novaes, M. R. C. G., Novaes, L. C. G., Melo, A. L., Recôvan, V. L. (2007). Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun. Ciên saúde*. 18(3) :1227- 1236.

O

34. Oyedapo OO., Akinpelu BA., Akinwunmi KF., Adeyinka MO. et Sipeolu FO. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(4): 46-51._

S

35. S. Gavanji , E. Mohammadi , B. Larki , A. Bakhtari , « Évaluation antimicrobienne et cytotoxique de certaines huiles essentielles à base de plantes en comparaison avec des antibiotiques courants dans des conditions de bio-essai » , *Integr. Med.Res.* 2014 , 3 , 142 – 152 .
36. Sadique, J., Al-Rqobah, W. A., Bughaith, M. F., et El-Gindy, A. R. 1989. The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system.
37. Sarkhel S, (2015). Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja Saponaria* Mol. saponin extract in mice, Vol. 3, pp 1-3.
38. Savard S., Paré, S. 2005. L'extraction par solvant. *Bio Techno*, V 4, N 4. 90. Trémolières, J., Serville, Y., Jacotot, R., Dupin, H. 1980. *Manuel d'alimentation humaine*. 9ème édition. Les éditions sociales françaises.

T

39. Thomas, L. (2013). Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4.
40. Tortora G. J., Derrickson B.H., Martin L., (2014). *Manuel d'anatomie et de physiologie humaines*. Ed. De Boeck. Bruxelles.

Références bibliographiques

V

41. Vercellotti. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. Blood Journal, vol(8),121.

W

42. Wajeman h. Lantz B., Girot R. (1992). - les maladies du globule rouge.- 2e Edition ; Paris : Inserm
43. World Health Organization. (2004). WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. World Health Organization.
44. Wolff M., (1968). Manuel d'analyse des corps gras. Ed. Azoulay, Paris.