

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA –Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité Pharmacotoxicologie



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

***Évaluation de l'activité antioxydante
et antihémolytique de la plante Asplenium ceterach***

Présenté par :

MERZOUK Yasmine

Soutenu le : **03 juillet 2025**

Devant le jury composé de :

M ^{me} BOUDJOUAN Asma	MCB	Présidente
M ^{me} SADAoui Khalida	MCA	Examinatrice
M ^{me} ABDERRAHIM Sabiha	MCA	Promotrice
M ^{me} MEZAHem Tassadit	MAA	Co-promotrice

Année universitaire : 2024 / 2025

REMERCIEMENT

Je remercie tout d'abord Le Plus Puissant ALLAH de m'avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et de m'avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.

Toutes les expressions de l'estime et de gratitude du monde sont Insuffisantes pour exprimer mes remerciements à mes parents qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours

J'exprime mes profonds remerciements à ma promotrice madame khamtache-Abderrahim Sabiha pour avoir accepté l'encadrement de ce travail, pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et sa confiance, qu'il trouve ici toutes nos chaleureuses gratitude.

Je remercie madame Mezahem Tassadit pour son aide et ses conseils, les ingénieurs du laboratoire.

Je remercie le membre de jury ; c'est un véritable plaisir pour moi que vous avez accepté de présider mon jury de mémoire

DÉDICACE

Je dédie ce travail à ma chère famille, pilier de mon existence, pour son amour inconditionnel, son soutien moral et ses prières constantes qui m'ont portée jusqu'ici.

À mes parents, pour leurs sacrifices silencieux, leur patience et leur confiance en moi.

À mon frère Amazigh, mes sœurs Fatine et Liza, à mes neveux Adam et lyna pour leur affection et leur présence réconfortante.

À mes amis fidèles et camarades de route, avec qui j'ai partagé les moments de doute, de joie, de fatigue et d'encouragement.

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail



Sommaire

Liste des abréviations**Liste des tableaux****Liste des figures****Introduction 1****I. Synthèse Bibliographique**

I.1. Présentation générale de la plante <i>Asplenium ceterach</i> L.	3
I.2. Classification botanique	4
I.3. Habitat naturel et répartition géographique.....	4
I.4. Composition phytochimique	5
I.5. Intérêt médicinal et pharmacologique	5
I.6. Contexte et justification de l'étude	6
I.7. Étude de l'activité antioxydante.....	6
I.7.1. Définition de l'activité antioxydante.....	6
I.7.2. Définition causes et conséquences de stress oxydatif	6
1.7.2.1. Définition de stress oxydatif.....	6
I.7.2.2. Origine et causes du stress oxydatif	6
I.7.2.3. Conséquences biologiques du stress oxydatif	7
I.7.3. Les espèces réactives de l'oxygène.....	7
I.7.3.1. Définition et types des espèces réactives de l'oxygène	7
I.7.3.2. Sources endogènes et exogènes des espèces réactives de l'oxygène	7
I.7.3.3. Rôle physiologique et pathologique des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	7
I.7.4. Les antioxydants.....	8
I.7.4.1. Définition des antioxydants.....	8
I.7.4.2. Classification des antioxydants	8
I.7.4.3. Mécanismes d'action des antioxydants	9
I.7.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	10
I.7.5.1. Méthodes basées sur le piégeage des radicaux	10
I.7.5.2. Méthodes basées sur la réduction de métaux	10
I.7.5.3. Autres méthodes.....	10
I.8. Étude de l'activité anti-hémolytique	10
I.8.1. Les globules rouges.....	11
I.8.2. La membrane érythrocytaire	11
I.8.3. Hémolyse.....	12
1.8.3.1. Hémolyse physiologique	12
1.8.3.2. Hémolyse pathologique ou hyperhémolyse.....	13

I.8.4. Approches thérapeutiques anti-hémolytiques	13
I.8.4.1. Anti-hémolytiques synthétiques.....	13
I.8.4.2. Anti-hémolytiques d'origine végétale.....	13

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal	14
II.2. Réactifs et produits chimiques	14
II.3. Appareil et matériel de base.....	14
II.4. Méthodes expérimentales	14
II.4.1. Préparation du matériel végétal	14
II.4.2. Méthode d'extraction.....	15
II.4.3. Rendement d'extraction.....	15
II.4.4. Dosages phytochimiques	16
II.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	16
II.4.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	17
II.4.5. Évaluation de l'activité antioxydante	18
II.4.5.1. Test DPPH	18
II.4.5.2. Test ABTS	19
II.4.5.3. Test FRAP.....	19
II.4.6. Activité anti-hémolytique (Test de l'innocuité « hémolyse »)	20
II.4.6.1. Préparation de la suspension des globules rouges	20
II.4.6.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges	21
II.4.7. Analyse statistique	22

III. Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction.....	23
III.1.1. Présentation des résultats.....	23
III.1.2. Discussion des résultats	23
III.2. Analyse phytochimique des extraits	24
III.2.1. Teneur des composés phénoliques	24
III.3. Évaluation de l'activité antioxydante	25
III.3.1. Test DPPH	25
III.3.1.1. Discussion partielle des résultats de test DPPH	26
III.3.2. Test ABTS	27
III.3.2.1. Présentation des résultats.....	27
III.3.2.2. Discussion partielle des résultats de Test ABTS	28
III.3.3. Test de FRAP	28

III.3.3.1. Expression des résultats.....	28
III.3.3.2. Discussion des résultats de test FRAP.....	29
III.4. Discussion générale de l'activité antioxydante	30
III.5. Activité antihémolytique : Etude de l'effet protecteur des extraits éthanolique d' <i>Asplenium ceterach</i> de sur les globules rouges	30
III.5.1. Test de cytotoxicité.....	30
III.5.2. Test anti hémolytique	32
Conclusion et perspectives	34
Références bibliographiques.....	35

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG : Acide gallique

BHA : Butylated Hydroxyanisole (Hydroxyanisole butylé)

BHT : Butylated Hydroxytoluène (Hydroxytoluène butylé)

CAT : Catalase

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

EAA : Équivalent acide ascorbique

EAG : Équivalent acide gallique

EQ : Équivalent quercétine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power (Pouvoir antioxydant réducteur du fer)

GPx : Glutathion peroxydase

GRd : Glutathion réductase

GRH : Globules rouges humains

GSH : Glutathion réduit

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

LDH : Lactate déshydrogénase

PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)

RBC: Red Blood Cells (Globules rouges)

rpm : Rotations par minute

SOD : Superoxyde dismutase

TFC : Total Flavonoid Content (Teneur en flavonoïdes totaux)

TPC : Total Phenolic Content (Teneur en polyphénols totaux)

TPTZ : 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine

Liste des tableaux

Tableau I: Photocomposant identifiés dans <i>Asplenium ceterach</i>	5
Tableau II: Classification des antioxydants.....	9
Tableau III: Résultats du test FRAP.....	28

Liste des figures

Figure 1: Photographie originale <i>Asplenium ceterach</i>	3
Figure 2: Photographie d' <i>Asplenium ceterach</i>	4
Figure 3: Schéma illustrant la génération des ERO, le stress oxydatif, les dommages cellulaires (ADN, lipides, protéines) et le rôle des défenses antioxydantes enzymatiques	8
Figure 4: Aspect morphologique des hématies	11
Figure 5: Structure de la membrane érythrocytaire	12
Figure 6: Carte géographique du lieu de la récolte d' <i>Asplenium ceterach</i>	14
Figure 7: Schéma récapitulatif des étapes de préparation de l'extrait sec d' <i>Asplenium ceterach</i>	15
Figure 8: Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes d'extrait éthanolique d' <i>Asplenium ceterach</i>	24
Figure 9: Valeurs d'IC ₅₀ des différents échantillons testés au DPPH.	26
Figure 10: Valeurs d'IC ₅₀ des différents échantillons testés au test ABTS.	27
Figure 11 : La cytotoxicité d'extrait éthanolique d' <i>Asplenium ceterach</i> des GRH.....	31
Figure 12 : Taux d'inhibition d'hémolyse d' <i>Asplenium ceterach</i> et d'acide gallique	32

Introduction

Les plantes médicinales occupent une place centrale dans les pratiques thérapeutiques traditionnelles à travers le monde. Elles constituent une source précieuse de molécules bioactives d'origine naturelle, largement utilisées pour la prévention et le traitement de nombreuses affections (**Ekor, 2014**). L'intérêt croissant pour ces plantes découle de leur accessibilité, de leur coût réduit, mais aussi de la complexité et des effets secondaires associés aux traitements pharmacologiques conventionnels (**Newman et Cragg, 2020**). Cependant, bien qu'elles soient naturelles, les plantes médicinales ne sont pas exemptes d'effets secondaires, et leur usage doit être encadré pour éviter toute toxicité ou interaction indésirable. Parmi les propriétés les plus étudiées des plantes médicinales figure leur capacité antioxydante. Les antioxydants naturels jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres, impliqués dans le stress oxydatif, le vieillissement cellulaire et diverses pathologies chroniques (**Pham-Huy et al., 2008**). La recherche actuelle s'oriente vers l'identification de nouvelles sources végétales riches en composés phénoliques et flavonoïdiques, reconnus pour leurs effets protecteurs et leur faible toxicité.

Le stress oxydatif affecte également la stabilité des membranes cellulaires, notamment celles des érythrocytes. L'hémolyse, processus de destruction des globules rouges, peut être déclenchée par des agents chimiques, osmotiques ou oxydants. L'évaluation de l'effet protecteur des extraits végétaux sur ce processus constitue un indicateur pertinent de leur potentiel biologique (**Rahman et al., 2015**). Dans ce contexte, l'évaluation simultanée du potentiel antioxydant et de l'activité antihémolytique permet de mieux comprendre les effets stabilisateurs de membrane des extraits végétaux. Il est également essentiel de vérifier l'innocuité de ces extraits sur les cellules humaines, notamment à travers des tests de cytotoxicité (**Bilia et al., 2014**).

Asplenium ceterach, également connue sous le nom de "doradille", est une fougère médicinale appartenant à la famille des *Aspleniaceae*. Elle est largement répandue dans les régions méditerranéennes, notamment en Europe du Sud et en Afrique du Nord. Utilisée traditionnellement pour ses propriétés diurétiques, expectorantes et anti-inflammatoires, cette espèce a récemment suscité l'intérêt scientifique. Des analyses phytochimiques ont révélé la présence de flavonoïdes et d'acides phénoliques, conférant à la plante une activité antioxydante potentielle (**Živković et al., 2017**). Toutefois, ses activités biologiques restent encore peu étudiées dans le contexte nord-africain. Malgré les connaissances émergentes sur sa composition chimique, peu d'études ont évalué de manière approfondie ses effets antioxydants et protecteurs au niveau cellulaire, notamment sur les membranes érythrocytaires.

Dans ce contexte, une question centrale se pose : l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* possède-t-il les propriétés antioxydantes et hémoprotectrices nécessaires pour soutenir son utilisation en médecine traditionnelle ?

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation de la flore médicinale algérienne. Il a pour objectif principal de caractériser les composés phénoliques présents dans *Asplenium ceterach* et évaluer son activité antioxydante et son effet antihémolytique.

Notre travail de recherche comporte deux parties :

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique de la plante étudiée. Cette revue englobe les informations disponibles sur ses caractéristiques botaniques, sa composition chimique, et surtout, ses activités biologiques connues.
- La deuxième partie de ce travail est axée sur la méthode d'extraction des composés phénoliques d'*Asplenium ceterach*, ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydantes et anti-hémolytiques. Elle présentera également les résultats obtenus et leur discussion, pour ensuite conclure avec les principaux résultats de l'étude.

I. Synthèse Bibliographique

I.1. Présentation générale de la plante *Asplenium ceterach* L.

Asplenium ceterach L., également appelé cétérach officinal, est une fougère vivace de la famille des Aspleniaceae (Trewick et al., 2004). D'un point de vue vernaculaire, cette plante est connue sous différents noms : en français, elle est appelée cétérach officinal, doradille ou encore herbe à rate ; en arabe dialectal algérien, elle est souvent désignée par chebret ou chberet, selon les régions. La Figure 1 illustre cette espèce caractéristique des milieux secs, fréquemment observée sur les rochers et les vieux murs calcaires. Elle possède une remarquable capacité de reviviscence : en période de sécheresse, ses feuilles s'enroulent en exposant leurs écailles protectrices, réduisant ainsi l'évapotranspiration (Živković et al., 2020). D'un point de vue morphologique, la plante mesure entre 5 et 15 cm, avec une souche courte et épaisse. Les feuilles, regroupées en touffes, sont initialement enroulées en crosse chez les jeunes frondes, puis s'étalent avec l'âge. Elles présentent un pétiole court, recouvert d'écailles, et un limbe étroitement oblong, pennatiséqué, à lobes courts, ovales-obtus, alternes, épais, verts sur la face supérieure et densément couverts d'écailles brillantes argentées au départ puis roussâtres sur la face inférieure. La fructification prend la forme de sores allongés, droits et obliques, répartis le long de la nervure médiane des frondes et dépourvus d'indusie (Van den Heede et al., 2003).



Figure 1: Photographie originale *Asplenium ceterach*.

I.2. Classification botanique

La classification d'*Asplenium ceterach* : est donnée comme suit (Tison et de Foucault, 2014) :

Règne : *Plantae* ;

Sous-règne : *Tracheobionta* ;

Division : *Pteridophyta* ;

Classe : *Filicopsida* ;

Ordre : *Polypodiales* ;

Famille : *Aspleniaceae* ;

Genre : *Asplenium* ;

Espèce : *Asplénium ceterach*. L., 1753

I.3. Habitat naturel et répartition géographique

Asplenium ceterach, aussi appelé Cétérach officinal, est une fougère chasmophyte et lithophyte, c'est-à-dire qu'elle pousse dans les fissures des rochers et sur les murs. Elle est répandue en Europe, en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye) et en Asie occidentale. Cette fougère préfère les endroits ensoleillés et secs, et peut survivre à la sécheresse grâce à sa capacité à revivre (Christenhusz et al., 2022)



Figure 2: Photographie d'*Asplenium ceterach* (Trewick et al., 2004).

I.4. Composition phytochimique

Des études phytochimiques ont révélé que les études phytochimiques d'*Asplénium ceterach* ont révélé la présence de divers composés bioactifs, principalement localisés dans les sporophytes, notamment des acides phénoliques (acide chlorogénique, acide caféique), des flavonoïdes, des tanins, des coumarines et des quinones. Les gamétophytes, quant à eux, sont riches en xanthones, dont la mangiférine et ses glycosides (Živković et al., 2020).

Le tableau I en dessous montre les différentes composantes phytochimiques d'*Asplénium ceterach* (Tomou et Skaltsa, 2018).

Tableau I: Photocomposant identifiés dans *Asplenium ceterach* d'après Tomou et Skaltsa (2018)

N°	Composé	Type chimique
1	Kaempférol-3-O-β-D-gentiobioside	Flavonoïde (flavonol)
2	Quercétine-3-O-β-D-glucuronide	Flavonoïde (flavonol)
3	Quercétine-3-O-β-D-gentiobioside	Flavonoïde (flavonol)
4	Acide caféique	Acide phénolique
5	Acide chlorogénique	Acide phénolique
6	p-Coumaroyl-4-O-β-D-glucoside	Acide phénolique
7	4-Vinyl-phenol-1-O-β-D-glucopyranoside	Phénol glycoside
8	3-(1-O-β-D-glucopyranosyl-4-hydroxyphényl)-propionic acid	Phénol glycoside
9	4-β-O-D-glucosyl-3,4-dihydroxybenzyl alcohol	Phénol glycoside
–	Esters éthyliques de palmitate, linoléate, α-linoléate	Acides gras

I.5. Intérêt médicinal et pharmacologique

L'*Asplenium ceterach*, ou doradille, est une plante médicinale traditionnellement utilisée pour ses propriétés diurétiques, expectorantes (favorisant l'expulsion des sécrétions bronchiques) et pour le traitement des calculs rénaux. Des recherches récentes ont confirmé son activité antioxydante, antimicrobienne et cytotoxique. Notamment, des extraits éthanoliques de la plante ont démontré une activité antimicrobienne significative contre diverses bactéries et champignons, ainsi qu'une capacité à protéger l'ADN contre les dommages oxydatifs (Berk et al., 2021).

I.6. Contexte et justification de l'étude

Malgré les usages traditionnels et les études préliminaires sur *Asplenium ceterach*, il existe encore des lacunes dans la compréhension approfondie de ses composés bioactifs et de leurs mécanismes d'action. Une exploration plus détaillée de sa composition phytochimique et de ses activités biologiques pourrait contribuer au développement de nouveaux agents thérapeutiques d'origine naturelle.

I.7. Étude de l'activité antioxydante

Cette section a pour objectif d'évaluer le pouvoir antioxydant de la plante *Asplenium ceterach*, connue pour ses usages traditionnels. À travers différentes méthodes d'analyse, nous chercherons à mesurer sa capacité à neutraliser les radicaux libres et à limiter les effets du stress oxydatif. Les tests sélectionnés permettront de quantifier cette activité antioxydante et de mieux cerner le potentiel de cette plante en phytothérapie.

I.7.1. Définition de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est la capacité d'une substance à neutraliser ou réduire les espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont des molécules potentiellement nocives pour les cellules. Cette activité est souvent évaluée en laboratoire, en utilisant des tests comme DPPH et ABTS, qui mesurent la capacité d'un composé à réagir avec des radicaux libres (Xie et Schaich, 2014).

I.7.2. Définition causes et conséquences de stress oxydatif

1.7.2.1. Définition de stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production de molécules réactives de l'oxygène (radicaux libres) et la capacité du corps à les neutraliser. Ce déséquilibre peut endommager l'ADN, les protéines et les lipides (Sies, 2015).

1.7.2.2. Origine et causes du stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou radicaux libres, proviennent de sources à la fois internes à l'organisme (endogènes) et externes (exogènes) (Valko et al., 2007).

I.7.2.3. Conséquences biologiques du stress oxydatif

Un stress oxydatif prolongé peut en effet entraîner des dommages significatifs à l'ADN (notamment l'accumulation de 8-oxo-dG), la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines. Ces altérations sont liées à l'apparition de diverses maladies, telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires (**Liguori et al., 2018**).

I.7.3. Les espèces réactives de l'oxygène

I.7.3.1. Définition et types des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules dérivées de l'oxygène, caractérisées par leur réactivité élevée due à la présence d'électrons non appariés. Elles incluent des espèces comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces ERO peuvent altérer les biomolécules, telles que les protéines, les lipides et l'ADN, potentiellement entraînant des dommages cellulaires (**Halliwell et Gutteridge, 2015**).

I.7.3.2. Sources endogènes et exogènes des espèces réactives de l'oxygène

La production de ERO (espèces réactives de l'oxygène) résulte à la fois de processus métaboliques normaux, comme la respiration mitochondriale, et de facteurs environnementaux tels que les radiations, les produits chimiques toxiques, ou les infections (**Phaniendra et al., 2015**).

I.7.3.3. Rôle physiologique et pathologique des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) jouent un rôle ambivalent dans les cellules. À faibles concentrations, elles sont des messagers importants pour la signalisation cellulaire et la régulation de fonctions cellulaires telles que la croissance et la différenciation. Elles participent également à la régulation de l'expression génique, à la défense immunitaire, et au maintien de l'homéostasie cellulaire. Cependant, en excès, elles provoquent des dommages oxydatifs aux macromolécules (ADN, protéines, lipides) et contribuent à l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée. Ce déséquilibre, appelé stress oxydatif, est impliqué dans le développement de nombreuses maladies (**Sies, 2015**).

La figure 3 ci-dessous illustre la formation des espèces réactives d'oxygènes leur implication dans le stress oxydatif et les dommages moléculaires qui en résultent ainsi que le rôle des systèmes antioxydants dans le rétablissement de l'équilibre (**Babazadeh et al., 2020**)

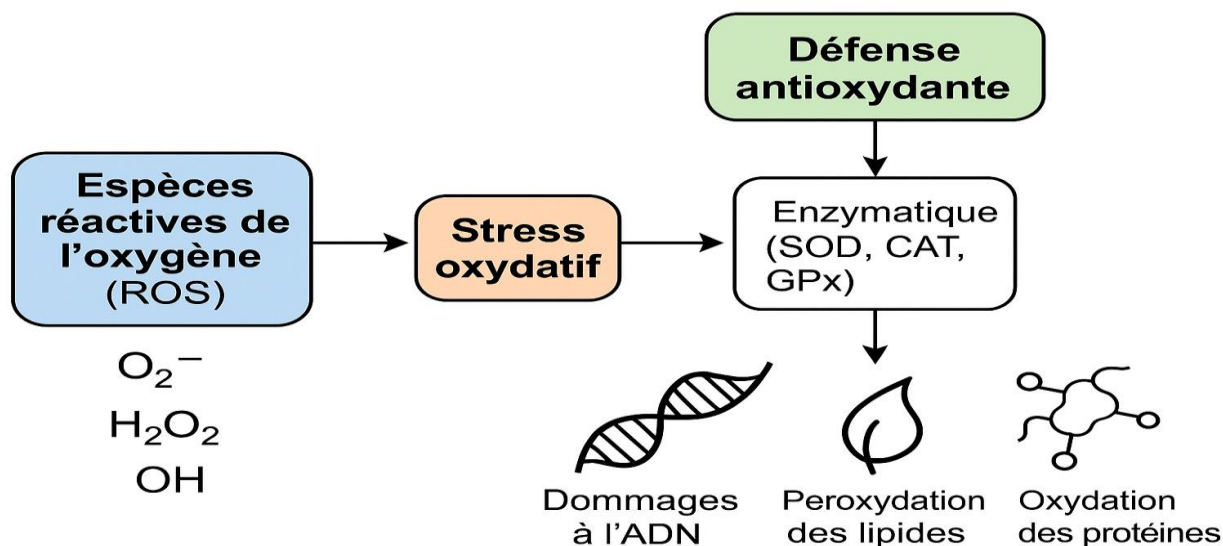


Figure 3: Schéma illustrant la génération des ERO, le stress oxydatif, les dommages cellulaires (ADN, lipides, protéines) et le rôle des défenses antioxydantes enzymatiques (Babazadeh et al., 2020).

I.7.4. Les antioxydants

I.7.4.1. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'empêcher l'oxydation des biomolécules, jouant ainsi un rôle protecteur essentiel dans les systèmes biologiques. Ils agissent en inhibant ou en réduisant les effets néfastes des radicaux libres, des molécules instables qui peuvent endommager les cellules (Halliwell et Gutteridge, 2015).

I.7.4.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants se divisent en deux grandes catégories : les antioxydants enzymatiques, comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase, et les antioxydants non enzymatiques, qui incluent les vitamines C, E, A et les polyphénols. Les antioxydants non enzymatiques proviennent principalement de l'alimentation (Mates et al., 1999), le tableau II (Flieger et al., 2021) ci-dessous nous donne la classification des antioxydants

Tableau II: Classification des antioxydants (Flieger et al., 2021).

Categories	Exemples	Mécanismes / Lieux d'action
Antioxydants enzymatiques (endogènes)	Superoxyde dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathion peroxydase (GPx), Glutathion réductase (GRd)	Convertissent les ERO : $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2$ (SOD), $H_2O_2 \rightarrow H_2O$ (CAT, GPx) ; GR régénère le GSH
Antioxydants non-enzymatiques (endogènes)	Glutathione (GSH), Acide urique, Uricinol	Piègent les radicaux libres directement, régénèrent les enzymes, neutralisent ERO
Antioxydants non-enzymatiques (exogènes/naturels)	Vitamine C, E, Coenzyme Q, Carotènes, Polyphénols, Flavonoïdes, Acides phénoliques, Stilbènes, Lignanes, Minéraux : Se, Zn, Mn	Scavenging de radicaux, prévention de la peroxydation lipidique, chélation des métaux
Antioxydants synthétiques	BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), Propyl gallate	Interruptions de chaîne radicalaire, prévention de rancissement lipidique

I.7.4.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent principalement par trois mécanismes : la neutralisation des radicaux libres, la chélation des métaux de transition, et l'inhibition des enzymes pro-oxydantes. En d'autres termes, ils aident à protéger les cellules du corps contre les dommages causés par le stress oxydatif (Sies, 2015).

I.7.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

I.7.5.1. Méthodes basées sur le piégeage des radicaux

- **Test DPPH** : Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode simple et rapide pour évaluer l'activité antioxydante d'une substance. Il repose sur l'utilisation du radical stable DPPH•, qui est violet en solution et devient jaune lorsqu'il est réduit par un antioxydant. La diminution de l'absorbance à 517 nm est proportionnelle à la quantité d'antioxydant présente dans l'échantillon (**Brand-Williams et al., 1995**).

- **Test ABTS** : Le test ABTS, amélioré par Re et al. (1999), mesure la capacité antioxydante d'une substance en évaluant sa capacité à réduire le radical cation ABTS•+. Ce radical, de couleur bleu-vert, est généré par oxydation chimique et, lorsqu'il est mis en présence d'antioxydants, il est réduit, ce qui entraîne une diminution de son absorbance à 734 nm. Ce test est polyvalent, car il peut être utilisé pour des échantillons à la fois hydrophiles et lipophiles, offrant une estimation globale de l'activité antioxydante (**Re et al., 1999**).

I.7.5.2. Méthodes basées sur la réduction de métaux

- **Test FRAP** : Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est une méthode colorimétrique utilisée pour évaluer la capacité antioxydante globale d'un échantillon. Il mesure la capacité des antioxydants à réduire le complexe ferrique Fe^{3+} -TPTZ en Fe^{2+} -TPTZ, formant un complexe bleu dont l'absorbance est mesurée à 593 nm. Cette mesure fournit une estimation du pouvoir réducteur total de l'échantillon et est considérée comme fiable et reproductible (**Benzie et Strain, 1996**).

I.7.5.3. Autres méthodes

Les tests ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygénés) et de chélation du fer sont deux méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante. Le test ORAC mesure la capacité d'un composé à neutraliser les radicaux libres de type pyroxyles, tandis que le test de chélation du fer évalue son affinité pour le fer, ce qui permet d'inhiber les réactions de type Fenton, qui produisent des radicaux libres (**Benzie et Strain, 1996**).

I.8. Étude de l'activité anti-hémolytique

Cette section s'intéresse à l'évaluation de l'activité anti-hémolytique de l'extrait d'*Asplenium ceterach*, afin de déterminer son aptitude à stabiliser la membrane érythrocytaire et à limiter la lyse cellulaire induite par un stress.

I.8.1. Les globules rouges

La figure 4 (**Howard, 2004**) illustre, en microscopie électronique à balayage, l'aspect morphologique des hématies, également appelées globules rouges ou érythrocytes. Leur production atteint environ 200×10^9 cellules par jour (**Guillaume, 2007**). Ces cellules, les plus nombreuses dans la circulation sanguine, présentent une forme biconcave, aplatie en leur centre, ce qui leur confère un aspect de disque, et mesurent environ $7 \mu\text{m}$ de diamètre pour $2 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Elles sont anucléées et contiennent essentiellement de l'hémoglobine, un pigment respiratoire responsable du transport de l'oxygène (O_2) des poumons vers les tissus, ainsi que du dioxyde de carbone (CO_2) des tissus vers les poumons (**Howard, 2004**).



Figure 4: Aspect morphologique des hématies (Howard, 2004).

I.8.2. La membrane érythrocytaire

La membrane plasmique des globules rouges est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent de nombreuses protéines associées au cytosquelette sous-membranaire (**Mannargadoo et al., 2016**). En termes de composition pondérale, elle est constituée d'environ 52 % de protéines, 40 % de lipides et 8 % de glucides. Parmi les lipides membranaires, on retrouve majoritairement des phospholipides (63 %), des cholestérols non estérifiés (25 %) ainsi que des glycosphingolipides.

Certaines glycoprotéines et glycolipides de la membrane expriment à la surface des érythrocytes les déterminants des groupes sanguins (**Dodge et al., 1963**). La membrane contient également des protéines fonctionnelles impliquées dans les échanges avec le milieu extracellulaire, telles que les pompes Na^+/K^+ -ATPase et Ca^{2+} -ATPase, ainsi que des protéines de transport des anions, de l'eau et du glucose (**Bichis et al., 2000**). Ces protéines assurent aussi un rôle essentiel dans la stabilité et l'ancrage des hématies via leur interaction avec le cytosquelette cellulaire (**Elgsaeter et al., 1986**) (Figure 05).

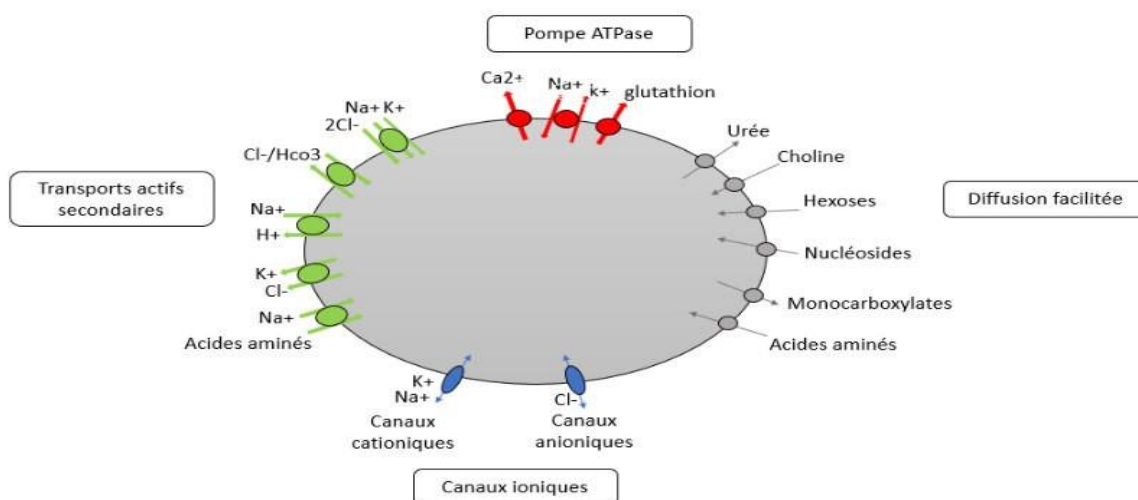


Figure 5: Structure de la membrane érythrocytaire (Jauregui, 2015).

I.8.3. Hémolysse

L'hémolysse (du grec *hémo* : sang, et *lyse* : destruction) désigne un processus irréversible entraînant la rupture de la membrane des érythrocytes, avec pour conséquence la libération de leur contenu intracellulaire, notamment l'hémoglobine, dans le plasma (Kato et al., 2017).

Ce phénomène s'accompagne généralement d'une augmentation du taux d'hémoglobine libre et de la lactate déshydrogénase (LDH), ainsi que d'une diminution du taux d'haptoglobine et de celui de l'hémoglobine glycosylée (Marchand et al., 1980). L'hémolysse peut être à l'origine de pathologies spécifiques telles que les maladies vasculaires aiguës et chroniques, l'inflammation, la thrombose ou encore l'insuffisance rénale (Schaer et al., 2013).

Il est toutefois essentiel de distinguer l'hémolysse physiologique de l'hémolysse pathologique, également appelée hyperhémolysse (Dahmani et al., 2000).

1.8.3.1. Hémolysse physiologique

L'hémolysse physiologique correspond à la destruction naturelle des globules rouges, en fin de vie, soit après environ 120 jours de circulation. Ce processus de vieillissement est compensé de manière constante par la moelle osseuse, assurant ainsi un renouvellement sans répercussions cliniques ni biologiques. L'hémolysse physiologique peut être détectée visuellement par une coloration dorée à rougeâtre du surnageant après centrifugation, ou bien par une mesure spectrophotométrique de la densité optique de l'hémoglobine libérée (Mezzour et al., 2006).

1.8.3.2. Hémolysse pathologique ou hyperhémolysse

L'hyperhémolysse se manifeste par une augmentation anormale du processus hémolytique, excédant le rythme physiologique. Elle résulte soit d'une destruction excessive des hématies, soit d'un raccourcissement de leur durée de vie. Ce processus peut être dû à une origine intrinsèque (*hémolysse corpusculaire*) ou extrinsèque (*hémolysse extra corpusculaire*) (Ucar, 2002).

I.8.4. Approches thérapeutiques anti-hémolytiques

Les multiples causes de l'anémie hémolytique, qu'elles soient héréditaires ou acquises (auto-immunes, toxiques, traumatiques), rendent cette affection complexe et nécessitent une approche diagnostique spécialisée pour adapter le traitement. En effet, le traitement des anémies hémolytiques dépend principalement de la cause sous-jacente. Parmi les options thérapeutiques, on distingue les anti-hémolytiques synthétiques et ceux d'origine végétale, capables de retarder ou inhiber la lyse des globules rouges (Federici et al., 2007 ; Zanella et al., 2014 ; Barcellini et al., 2015).

I.8.4.1. Anti-hémolytiques synthétiques

Plusieurs médicaments peuvent être utilisés pour ralentir ou inhiber la lyse des globules rouges (érythrocytes), notamment l'acide folique, les suppléments de fer, la vitamine B12, d'autres vitamines, les corticostéroïdes et divers immunosuppresseurs. L'acide folique et la vitamine B12 sont essentiels à la production de globules rouges et aident à prévenir certains types d'anémie. Les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs peuvent être utilisés pour traiter les anémies hémolytiques auto-immunes en réduisant l'activité du système immunitaire qui attaque les globules rouges (Federici et al., 2007 ; Zanella et al., 2014 ; Barcellini et al., 2015).

I.8.4.2. Anti-hémolytiques d'origine végétale

La découverte de composés végétaux à effet anti-hémolytique connaît une dynamique croissante. De nombreux laboratoires à travers le monde explorent l'efficacité d'extraits de plantes dans ce domaine. Plusieurs de ces extraits ont démontré leur potentiel en tant qu'agents anti-hémolytiques, ouvrant la voie à des approches naturelles complémentaires dans la prise en charge de l'hémolyse (Federici et al., 2007 ; Zanella et al., 2014 ; Barcellini et al., 2015).

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

La plante étudiée dans ce travail est *Asplenium ceterach* L., une fougère appartenant à la famille des Aspleniaceae. Elle a été récoltée dans le village d'El Mechta, situé dans la commune de Ighrem, daïra d'Akbou, wilaya de Béjaïa (Algérie), à une altitude de 1200 mètres. L'identification botanique de l'espèce a été effectuée par Pr Bouadam, enseignant chercheur au niveau de la faculté SNV de Béjaïa et confirmée par comparaison avec des flores de référence (Quezel et Santa, 1962). Après la récolte, l'ensemble de la plante (feuilles, tiges et rhizomes) a été soigneusement lavé à l'eau distillée, puis séché dans une étuve à 40 °C pendant 7 jours.

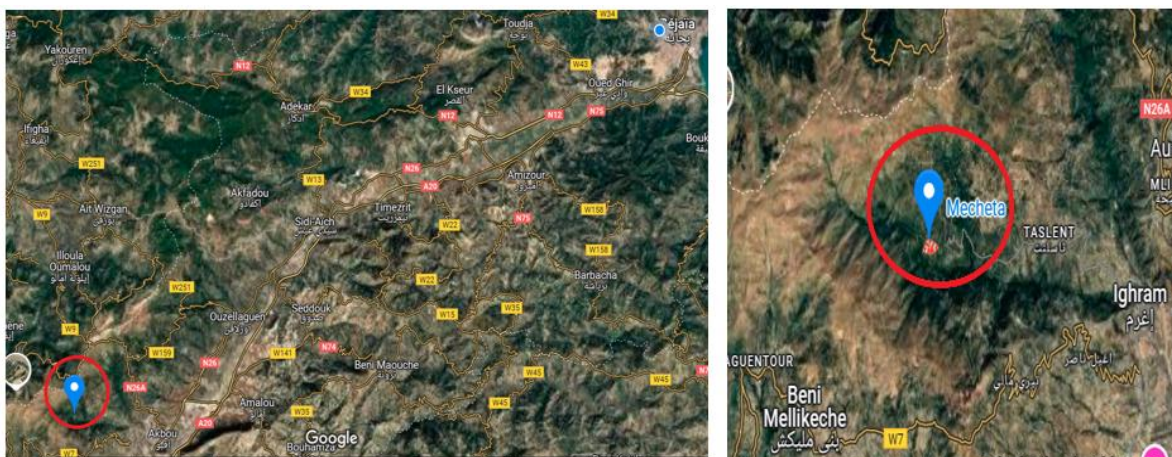


Figure 6: Carte géographique du lieu de la récolte d'*Asplenium ceterach* (Photo Originale).

II.2. Réactifs et produits chimiques

Les principaux réactifs utilisés dans ce travail sont illustrés en annexe 1.

II.3. Appareil et matériel de base

Ils sont illustrés en annexe 2.

II.4. Méthodes expérimentales

II.4.1. Préparation du matériel végétal

Le matériel séché a ensuite été broyé manuellement, puis réduit en poudre à l'aide d'un moulin électrique. La poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamis de 125 µm, le séchage permet d'éliminer l'humidité qui pourrait altérer les principes actifs ; le broyage augmente la surface de contact pour une meilleure efficacité d'extraction, tandis que le tamisage garantit une poudre homogène, condition essentielle pour une extraction reproductible. Elle a ensuite été conservée dans des boîtes en verre hermétiquement fermées, à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'à son utilisation pour les analyses.

II.4.2. Méthode d'extraction

L'extraction des composés bioactifs de *Asplenium ceterach* L. a été réalisée par macération à froid avec de l'éthanol à 70 % (v/v), afin de préserver les composés sensibles à la chaleur. Deux cents grammes de poudre végétale ont été répartis dans quatre flacons de 50 g, chacun avec 500 mL d'éthanol (rapport 1 :10, m/v), puis agités en continu pendant trois jours, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette durée d'extraction a été choisie afin d'optimiser la solubilisation et la diffusion des composés bioactifs, en assurant un contact maximal entre le solvant et la matrice végétale. Après filtration sur papier Wattman, les extraits ont été concentrés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif, ce qui a permis d'obtenir un concentré brut. Ce dernier a été versé dans des cristallisoirs, puis placé dans une étuve à 40 °C pendant plusieurs jours pour séchage complet. L'extrait sec obtenu a été ensuite récupéré dans des boîtes de Pétri en verre, hermétiquement fermées, puis conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation pour les analyses.

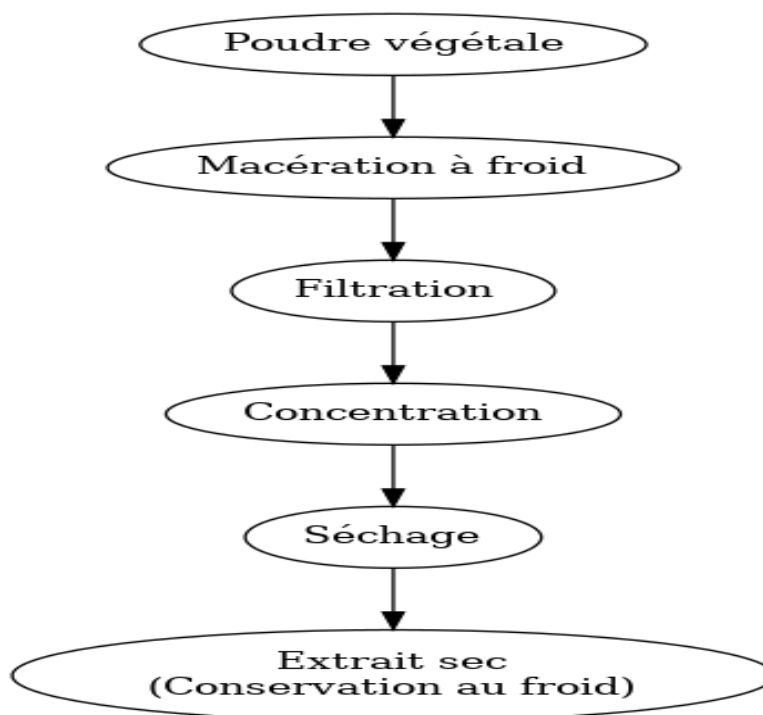


Figure 7: Schéma récapitulatif des étapes de préparation de l'extrait sec d'*Asplenium ceterach*.

II.4.3. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{masse d'extrait sec} / \text{masse de poudre végétale sèche}) \times 100$$

II.4.4. Dosages phytochimiques

Tous les résultats sont exprimés par gramme d'extrait sec, base de travail adoptée pour l'ensemble des dosages, calculs et représentations graphiques. Ce choix garantit la cohérence méthodologique du travail expérimental effectué.

II.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Ce dosage repose sur une réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques et le réactif du Folin-Ciocalteu, formant un complexe bleu dont l'intensité, mesurée à 765 nm, est proportionnelle à la concentration en substances réductrices, principalement les polyphénols. Cependant, ce réactif n'est pas spécifique des polyphénols et peut réagir avec d'autres composés réducteurs présents dans l'extrait. (**Folin et Ciocalteu ,1927**).

➤ Préparation des réactifs

Réactif de Folin-Ciocalteu 10 % : 10 mL de réactif commercial complétés à 100 mL avec de l'eau distillée.

Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % : 7,5 g dans 100 mL d'eau distillée, utilisé pour alcaliniser le milieu de réaction, ce qui permet le bon déroulement de la réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

➤ Préparation des extraits

Une solution mère à 1 mg/mL a été préparée, suivie d'une dilution au 1/2.

➤ Protocole expérimental

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique a été évaluée par la méthode de **Folin et Ciocalteu (1927)** où un volume de 200 μL d'extrait a été mélangé avec 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Après 4min, 800 μL de Carbonate de Sodium (Na_2CO_3) dilué à 7,5% ont été ajoutés. Après 2h d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ Courbe d'étalonnage (acide gallique)

Une solution mère d'acide gallique à 1 mg/mL a été diluée pour obtenir des concentrations de 2,5 à 160 µg/mL. Les dilutions ont été traitées selon le même protocole que les extraits. Les absorbances ont été mesurées à 765 nm en triplicata. La courbe d'étalonnage a permis d'obtenir une équation de droite de régression. La concentration ainsi obtenue est exprimée en équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait sec en se référant à la droite d'étalonnage (Annexe 3) (**Wong et al., 2006**). Le dosage a été réalisé en triple afin de calculer les valeurs moyennes.

II.4.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

➤ Principe

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe jaune entre les ions Al^{3+} et les groupements hydroxyles des flavonoïdes, mesuré à 415 nm (**Chang et al., 2002**).

➤ Préparation des réactifs

Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2 % : 0,2 g dissous dans 100 mL d'éthanol.

➤ Préparation des extraits

Une solution mère à 1 mg/mL a été utilisée. Les extraits 1 et 2 ont été dilués au 1/10, les extraits 3 et 4 au 1/2.

➤ Protocole expérimental

L'estimation de la teneur en flavonoïdes a été réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (**Chang et al., 2002**), où un volume de 1 mL du réactif ($AlCl_3$) à 2% a été ajouté à 1 mL d'extrait. Après 30 min d'incubation, d'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la quercétine comme standard à une concentration de 1mg/ml.

- La concentration ainsi obtenue a été exprimée en équivalent de la quercétine (QE)/g d'extrait sec en se référant à la droite d'étalonnage (Annexe 4). Le dosage a été réalisé trois fois afin de calculer les valeurs moyennes.

➤ Courbe d'étalonnage

Une solution mère de quercétine à 1 mg/mL a été diluée pour obtenir des concentrations de 2,5 à 40 µg/mL. Chaque dilution a été traitée selon le même protocole. Absorbances mesurées à 415 nm en triplicata (sauf le blanc, fait une seule fois). La courbe d'étalonnage a permis d'obtenir une équation de droite de régression.

II.4.5. Évaluation de l'activité antioxydante

II.4.5.1. Test DPPH

- **Principe** : Le test a été réalisé selon la méthode de **Brand-Williams et al. (1995)**, il test repose sur la réduction du radical libre DPPH• par des antioxydants, qui lui cèdent un électron ou un atome d'hydrogène. Cette réduction entraîne une diminution d'absorbance à 517 nm.

➤ Protocole expérimental

Des gammes de concentrations ont été préparées pour l'extrait (extrait 3, 4) et pour l'acide ascorbique et BHA (utilisée comme témoin positif). Les concentrations testées étaient : 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200 µg/mL.

Les dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère de concentration 1 mg/mL. Pour l'extrait, une dilution initiale a permis d'obtenir une concentration de 200 µg/mL en mélangeant 800 µL de l'extrait mère avec 3,2 mL d'éthanol. À partir de cette solution, des dilutions successives ont été effectuées en prélevant à chaque fois 2 mL et en ajoutant le volume nécessaire de solvant, avec agitation au vortex, afin d'obtenir les concentrations souhaitées.

Pour chaque concentration :

- 500 µL de solution de DPPH (4mg dissout dans 80ml d'éthanol) ont été mélangés à 500 µL d'échantillon (extrait ou acide ascorbique et BHA).
- Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité.
- L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, contre un blanc :
- Pour les extraits : DPPH + éthanol
- Pour l'acide ascorbique : DPPH + eau distillée
- Tous les tests ont été réalisés en triplicata pour chaque concentration et même pour le blanc, garantissant la fiabilité des résultats.

II.4.5.2. Test ABTS

Principe : Le test a été réalisé selon une méthode adaptée de **Re et al. (1999)**, il repose sur la neutralisation du radical cation ABTS^{•+} par les antioxydants, via un transfert d'électron ou un transfert d'hydrogène, réduisant ainsi sa coloration bleue-verte mesurée à 734 nm.

➤ Préparation des extraits

Les extraits 3 et 4 ont été testés pour leur activité antioxydante par le test ABTS (**Re et al. ,1999**) Une dilution initiale a été réalisée en mélangeant 1,6 mL d'extrait brut avec 0,4 mL d'éthanol afin d'obtenir une concentration de 200 µg/mL. Des dilutions successives ont été effectuées en transférant 1 mL de la solution précédente dans un nouveau tube contenant 1 mL d'éthanol, avec vortex à chaque étape, pour obtenir une gamme de concentrations allant de 6,25 à 200 µg/mL.

➤ Protocole expérimental

Pour chaque concentration testée, 100 µL d'extrait dilué ont été mélangés à 1900 µL de solution de radical ABTS^{•+}. Le mélange a été incubé pendant 7 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

➤ Blancs et répétitions

Tous les essais ont été réalisés en triplicata. Un blanc en triplicata a été réalisé pour chaque extrait (3 et 4), ainsi qu'un blanc spécifique en triplicata pour l'acide ascorbique.

Courbe d'étalonnage –BHA

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de en testant une gamme de concentrations allant de 6,25 à 200 µg/mL. Pour chaque concentration, 100 µL de solution standard ont été ajoutés à 1900 µL de radical ABTS^{•+}, selon le même protocole que celui appliqué aux extraits. Un blanc a également été réalisé en triplicata.

II.4.5.3. Test FRAP

Principe : Le test a été réalisé conformément à la méthode de **Benzie et Strain (1996)**. Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mesure la capacité des antioxydants à réduire le complexe ferrique (Fe³⁺-TPTZ) en complexe ferreux (Fe²⁺-TPTZ), de couleur bleue, détecté à 593 nm.

➤ Préparation du réactif FRAP

Le réactif FRAP a été préparé à partir des trois solutions suivantes :

1. Tampon acétate de sodium 300 mM (pH 3,6) :

- 3,1 g d'acétate de sodium ont été dissous dans 16 mL d'acide acétique glacial.
- Le mélange a été complété avec de l'eau distillée jusqu'à 100 mL.
- Le pH a été ajusté à 3,6 à l'aide de HCl ou NaOH.

2. Solution de TPTZ (10 mM) :

- Préparée en dissolvant la masse correspondante de TPTZ dans 33 mM de HCl (avec environ 10 mL d'eau distillée).

3. Solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) :

- Préparée en dissolvant le sel dans de l'eau distillée.

Les trois solutions ont été mélangées dans un rapport 10 :1 :1 (100 mL de tampon acétate, 10 mL de TPTZ, 10 mL de FeCl_3) pour former le réactif FRAP.

Ce réactif a été préparé fraîchement le jour de l'expérimentation.

➤ Protocole expérimental avec les extraits

Les extraits 3 et 4 ont été testés à une concentration unique de 100 $\mu\text{g/mL}$. Pour cela, 100 μL d'extrait brut ont été dilués dans 900 μL d'éthanol. De cette solution diluée, 150 μL ont été prélevés et ajoutés à 2850 μL de réactif FRAP. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 593 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Les essais ont été réalisés en tube unique lors de la première manipulation, puis refaits en triplicata pour confirmation.

II.4.6. Activité anti-hémolytique (Test de l'innocuité « hémolyse »)

II.4.6.1. Préparation de la suspension des globules rouges

Le sang utilisé pour la préparation des suspensions érythrocytaires a été prélevé chez des donneurs sains dans des tubes contenant de l'héparine. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, le plasma a été éliminé et les globules rouges ont été lavés trois fois avec une solution de PBS (0,2 M, pH 7,4), suivie d'une centrifugation à 3000 rpm durant 5 minutes, jusqu'à obtention d'un surnageant clair. Le culot érythrocytaire a ensuite été dilué dans une solution de PBS au rapport 1 :9 (1 volume de culot pour 9 volumes de PBS), afin d'obtenir une suspension de globules rouges à 10 % d'hématocrite (Shobana et Vidhya, 2016).

➤ Protocole expérimental

Une quantité de 0,4 mL de chaque extrait, de ses différentes fractions ainsi que d'acide gallique a été préparée dans du PBS salin (pH 7,4), puis mélangée à 0,4 mL d'une suspension de globules rouges à 10 %. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'eau distillée a servi de témoin positif (provoquant 100 % d'hémolyse), tandis qu'un tube contenant uniquement le PBS salin a été utilisé comme témoin négatif. Après incubation, les échantillons ont été centrifugés à 2000 tours/minute, et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'hémolyse (\%)} = [(DoE - Doc-) / (Doc+)] \times 100$$

DoE : Densité optique de l'échantillon

Doc- : Densité du témoin négatif

Doc+ : Densité du témoin positif

II.4.6.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges

Selon la méthode décrite par Ganesh Gadamsetty et al. (2016), ce test permet d'évaluer la capacité des extraits aqueux et de leurs fractions à stabiliser la membrane des érythrocytes, en les exposant à une solution hypotonique sous chaleur afin d'induire une hémolyse.

➤ Protocole expérimental

Dans des tubes à essai, 0,5 mL de chaque extrait (dilué dans du Na Cl à 0,9 %) a été ajouté à 1,5 mL de tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4) et 2 mL de solution hypo-saline (NaCl à 0,36 %). L'ensemble a été incubé à 56 °C pendant 30 minutes. Après incubation, les tubes ont été placés dans un bain d'eau froide durant 20 minutes pour stopper la réaction, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le témoin est constitué de 2 mL de solution hypo-saline, 2 mL de tampon PBS et 0,5 mL de suspension de globules rouges.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été déterminé à l'aide de la formule suivante

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du témoin

At : absorbance de l'échantillon (test)

II.4.7. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n = 3$).

Le logiciel Origin 9.0 a été utilisé pour tracer les courbes dose-réponse de type sigmoïdal et pour calculer les valeurs d'IC₅₀.

III. Résultats et discussion

III.1. Rendement d'extraction

III.1.1. Présentation des résultats

Afin d'évaluer l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs présents dans *Asplenium ceterach*, le rendement d'extraction a été déterminé à partir de la formule standard mentionnée dans la partie méthodes expérimentales à partir de 200g de poudre végétale sèche utilisée ayant permis d'obtenir 22,23g d'extrait sec.

L'extraction par macération a été réalisée à l'aide d'éthanol. Le rendement d'extraction obtenu est de 11,12 %, ce qui reflète la quantité de composés solubles extraites à partir de la matière végétale sèche.

III.1.2. Discussion des résultats

Le rendement d'extraction représente la capacité du solvant à extraire les composés bioactifs de la plante. Dans notre étude, le rendement d'extraction par macération utilisant un solvant hydroalcoolique (mélange éthanol/eau) a atteint 11,12 %. Ce rendement a été comparé à ceux rapportés dans la littérature. En effet, **Negadi et al. (2021)** ont obtenu un rendement de 8 % à partir d'un extrait méthanolique de *Asplenium ceterach* collecté dans la région de Tiaret (Algérie), tandis que **Petrova et al. (2021)** ont rapporté un rendement de $9,8 \pm 1,1$ % pour un extrait méthanolique obtenu également par macération pour la même espèce.

Le rendement obtenu dans notre étude est donc supérieur à ceux mentionnés ci-dessus. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs intervenant dans le processus d'extraction. D'abord, le choix du solvant joue un rôle majeur : les solvants hydroalcooliques sont connus pour leur capacité à extraire un spectre plus large de composés bioactifs, en particulier les substances polaires et semi-polaires (**Handa et al., 2008**). Ensuite, des paramètres comme la température, la durée de macération, l'agitation, la taille des particules végétales, ainsi que l'origine géographique et l'état physiologique de la plante influencent également significativement le rendement d'extraction (**Azwanida, 2015**).

Ainsi, le rendement de 11,12 % obtenu dans notre étude peut être considéré comme modéré à élevé pour ce type d'extraction. Il reflète une efficacité acceptable du procédé mis en œuvre, justifiant le choix du solvant et des conditions opératoires appliquées.

III.2. Analyse phytochimique des extraits

III.2.1. Teneur des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques totaux et flavonoïdiques totaux a été réalisé respectivement par la méthode de Folin-Ciocalteu et celle au chlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique (EAG) pour les polyphénols et en équivalent de quercétine (EQ) pour les flavonoïdes, par gramme d'extrait sec.

Les concentrations ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine, présentées en Annexes (Annexe 3 et Annexe4). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 8.

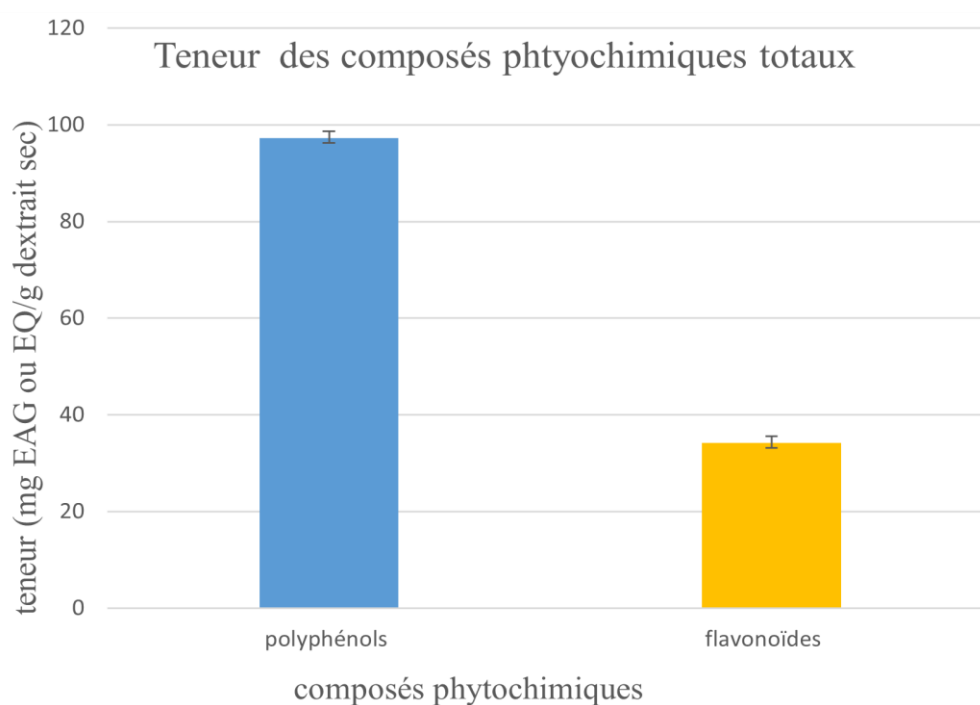


Figure 8: Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes d'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach*.

Dans notre étude, les teneurs en composés phytochimiques ont été évaluées à partir d'un extrait éthanolique brut d'*Asplenium ceterach*.

Le contenu en polyphénols totaux (TPC) a été mesuré à $193,10 \pm 1,43$ mg équivalent acide gallique (GAE) par gramme d'extrait sec, tandis que le contenu en flavonoïdes totaux (TFC) a atteint $34,18 \pm 0,52$ mg équivalent quercétine (QE) par gramme d'extrait sec.

Ces résultats ont été comparés à ceux rapportés dans la littérature pour la même espèce.

Petrova et al. (2021), utilisant un extrait méthanolique d'*Asplenium ceterach*, ont rapporté une teneur en polyphénols de $29,61 \pm 1,7$ mg GAE/g et une teneur en flavonoïdes de $18,42 \pm 1,2$ mg QE/g. De leur côté, **Halli et al. (2020)** ont obtenu, à partir d'un autre extrait méthanolique de la même plante, des teneurs de $231,5 \pm 13,6$ mg GAE/g pour les polyphénols et $25,5 \pm 1,6$ mg QE/g pour les flavonoïdes.

Les différences observées peuvent être attribuées à plusieurs facteurs. Le choix du solvant joue un rôle majeur : les solvants hydroalcooliques permettent l'extraction d'un spectre plus large de composés à polarité intermédiaire, tandis que le méthanol pur favorise certains polyphénols plus polaires (**Handa et al., 2008**). Les conditions opératoires comme la durée de macération, la température, l'agitation ou la granulométrie de la poudre végétale influencent aussi fortement les rendements en métabolites secondaires (**Azwanida, 2015**). Aussi, des facteurs environnementaux comme l'origine géographique, les conditions climatiques de la région de récolte ou encore le stade physiologique de la plante au moment de la cueillette peuvent moduler la concentration en composés bioactifs (**Bouyahya et al., 2018**).

La teneur en polyphénols obtenue dans notre étude se situe entre les valeurs rapportées par **Halli et collaborateurs** et **Petrova et ses collaborateurs.**, tandis que la teneur en flavonoïdes est la plus élevée des trois études comparées. Ces résultats suggèrent que notre protocole d'extraction éthanolique est particulièrement efficace pour l'obtention de flavonoïdes, et globalement performant dans l'extraction des composés antioxydants de cette espèce.

III.3. Évaluation de l'activité antioxydante

III.3.1. Test DPPH

Les concentrations inhibitrices 50 % (IC₅₀) des extraits ont été calculées à partir des courbes dose-réponse, présentées en annexe (Annexe 5, 6 et 7). Les résultats des IC₅₀ pour l'extrait éthanolique, l'acide ascorbique et le BHA sont présentés dans le tableau 6 et illustrés par un histogramme comparatif présenté dans la Figure 9 ci-dessous :

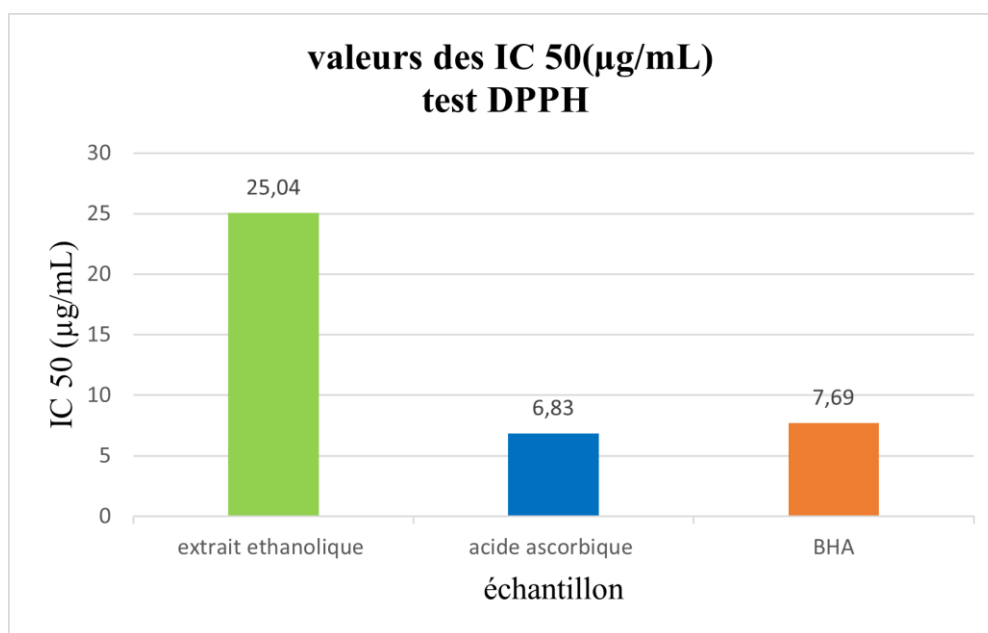


Figure 9: Valeurs d'IC₅₀ des différents échantillons testés au DPPH.

III.3.1.1. Discussion partielle des résultats de test DPPH

La valeur de l'IC₅₀ obtenue pour l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* dans le test DPPH est de 25,04 µg/mL. Cette donnée a été confrontée aux résultats rapportés dans d'autres études scientifiques sur la même espèce végétale, utilisant le même test antioxydant. **Chaabi et al. (2008)** ont rapporté une valeur de 18,20 µg/mL pour un extrait méthanolique d'*A. ceterach*, tandis que **Benariba et al. (2013)** ont obtenu 21,75 µg/mL pour un extrait éthanolique, et **Benslama et al. (2015)** ont trouvé 19,46 µg/mL.

Ces différences peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. D'abord, le type de solvant utilisé influence fortement la solubilité et l'extraction des composés phénoliques et flavonoïdes (**Dai et Mumper, 2010**). Par ailleurs, les conditions écologiques (sol, altitude, climat), la saison de récolte, l'âge des plantes, et même la méthode de séchage ou l'état de conservation peuvent altérer la composition phytochimique et, par conséquent, l'activité antioxydante (**Wojdyło et al., 2007 ; Yang et al., 2008**). Des variations inter-régionales dans la concentration des métabolites secondaires, en particulier des polyphénols, peuvent aussi justifier ces écarts (**Bilia et al., 2014**). Enfin, l'approche analytique peut également influencer les résultats : les différences dans la méthode de préparation des échantillons, le temps d'incubation avec le réactif DPPH ou les conditions expérimentales peuvent engendrer une variabilité non négligeable (**Brand-Williams et al., 1995**).

En conclusion, la valeur d'IC₅₀ de 25,04 µg/mL obtenue dans cette étude est supérieure à celles rapportées dans la littérature (entre 18,20 et 21,75 µg/mL), indiquant une activité antioxydante légèrement plus faible de notre extrait. Cette observation est probablement liée à des différences méthodologiques et environnementales affectant la composition en principes actifs cela confirme que *Asplenium ceterach* possède un potentiel antioxydant appréciable, bien qu'inférieur aux standards de référence. Ces résultats permettent de situer le pouvoir antioxydant de l'extrait testé et soutiennent son usage traditionnel en phytothérapie.

III.3.2. Test ABTS

III.3.2.1. Présentation des résultats

Les valeurs des IC₅₀ ont été déterminées à partir des courbes dose-réponse obtenues pour l'extrait éthanolique et le BHA. Ces courbes sont présentées en annexes (A8 et A9). Les résultats sont résumés dans la Figure 10 ci-dessous :

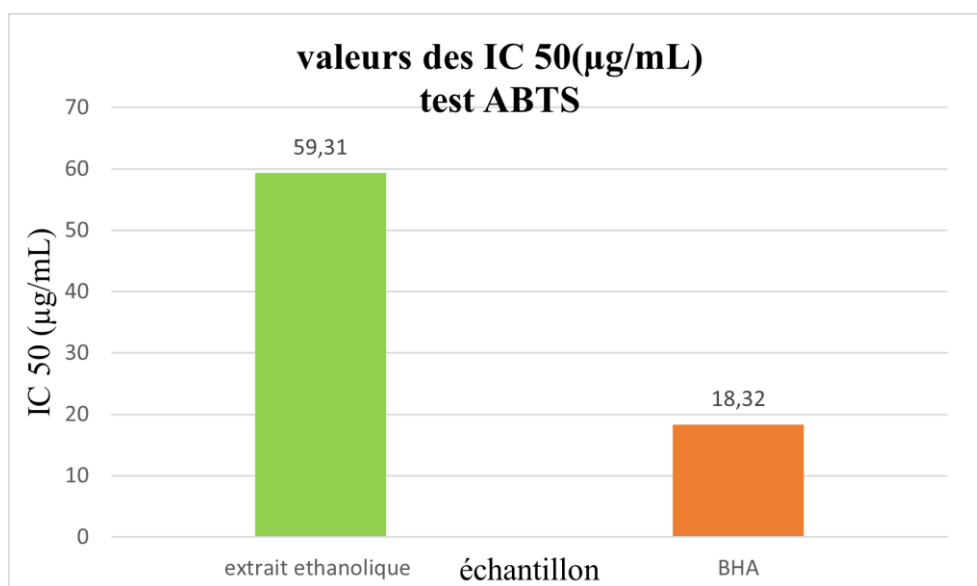


Figure 10: Valeurs d'IC₅₀ des différents échantillons testés au test ABTS.

III.3.2.2. Discussion partielle des résultats de Test ABTS

Dans le test ABTS, l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* a présenté une valeur d'IC₅₀ de 59,31 µg/mL. Cette valeur a été comparée aux données rapportées dans la littérature scientifique pour la même espèce végétale. **Benariba et al. (2013)** ont rapporté une IC₅₀ de 40,27 µg/mL pour un extrait méthanolique, tandis que **Benslama et al. (2015)** ont obtenu une valeur de 36,10 µg/mL avec un extrait éthanolique.

Les écarts observés entre ces différentes valeurs peuvent être attribués à plusieurs facteurs. Le choix du solvant d'extraction joue un rôle majeur : l'éthanol, le méthanol et les solvants hydroalcooliques n'extraient pas les mêmes fractions de composés bioactifs, notamment les polyphénols et les flavonoïdes (**Dai et Mumper, 2010**). De plus, des facteurs environnementaux tels que l'altitude, la nature du sol, la saison de récolte, l'exposition au soleil ou encore les conditions de séchage influencent les résultats **Wojdylo, A et al., (2007)**.

La variabilité des protocoles expérimentaux utilisés dans chaque étude constitue également une source importante de divergence. Par exemple, la durée d'incubation, le pH de la solution, la concentration initiale en ABTS et le mode de lecture spectrophotométrique peuvent modifier les résultats (**Re et al., 1999**).

En conclusion, bien que l'extrait d'*Asplenium ceterach* étudié présente une activité antioxydante contre le radical ABTS, cette activité est inférieure à celle rapportée dans la littérature pour la même plante, avec une IC₅₀ plus élevée (59,31 µg/mL contre des valeurs comprises entre 36,10 et 40,27 µg/mL). Cette différence peut être due à des paramètres environnementaux, techniques et analytiques.

III.3.3. Test de FRAP

III.3.3.1. Expression des résultats

Le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* a été évalué à l'aide du test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Les résultats ont été exprimés en équivalents acide ascorbique (EAA) par gramme d'extrait sec, à partir de la courbe étalon de l'acide ascorbique qui est jointe en (Annexe A10), les résultats exprimés en mg EAA/g d'extrait sec ± écart-type présenté par le Tableau 8 ci-dessous :

Tableau III: Résultats du test FRAP.

Extrait	[EAA] (µg/mL) ± ET	mg EAA/g extrait ± ET
Éthanolique (100 µg/mL)	185,0 ± 0,97	1850 ± 9,7

III.3.3.2. Discussion des résultats de test FRAP

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) permet d'évaluer le pouvoir réducteur des extraits végétaux en mesurant leur capacité à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}), traduisant leur aptitude à céder des électrons pour neutraliser les radicaux libres. L'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* a montré une activité antioxydante notable avec une valeur de $1850 \pm 9,6$ mg EAA/g (équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait sec). Cette valeur est proche de celles rapportées dans la littérature, notamment par **Sarikurkcü et al. (2019)** ($1980 \pm 17,3$ mg EAA/g) et **Ceylan et al. (2020)** ($1720 \pm 21,6$ mg EAA/g), confirmant le potentiel antioxydant élevé de cette plante. Les différences observées peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, dont la nature du solvant utilisé, qui influence la qualité et la quantité des métabolites extraits (**Dai et Mumper, 2010**), ainsi que les conditions environnementales (altitude, nature du sol, exposition au soleil, stress hydrique, saison de récolte), qui modulent la biosynthèse des composés phénoliques et flavonoïdiques (**Wojdyło et al., 2007 ; Yang et al., 2008**). En outre, les variations méthodologiques entre les protocoles expérimentaux, telles que la concentration des réactifs, le pH, la température ou le temps d'incubation, peuvent également impacter les résultats (**Brand-Williams et al., 1995 ; Bilia et al., 2014**).

En conclusion, l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* a présenté un fort pouvoir antioxydant dans le test FRAP, soutenant son intérêt en tant que source naturelle d'antioxydants efficaces, et justifiant son usage potentiel dans la prévention du stress oxydatif.

III.4. Discussion générale de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes (DPPH, ABTS et FRAP) a permis de mettre en évidence le potentiel antioxydant global de l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach*. Chaque test mettant en jeu un mécanisme distinct, leur utilisation combinée offre une vision plus complète de la capacité de l'extrait à neutraliser les espèces radicalaires.

Ces résultats traduisent une aptitude de l'extrait à intervenir dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif, processus impliqué dans de nombreuses pathologies. Ce pouvoir antioxydant peut être attribué à la richesse de l'extrait en composés phénoliques, notamment les polyphénols et flavonoïdes, reconnus pour leur rôle dans la neutralisation des radicaux libres et la stabilisation des molécules réactives.

La complémentarité entre les différents tests, associée à la composition chimique de l'extrait, suggère un potentiel intéressant pour une utilisation biologique ou pharmacologique dans la prévention des dommages oxydatifs.

III.5. Activité antihémolytique : Etude de l'effet protecteur des extraits éthanolique d'*Asplenium ceterach* de sur les globules rouges

III.5.1. Test de cytotoxicité

À fin d'étudier la toxicité d'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* sur les globules rouges, on a suivi la cytotoxicité par la fuite d'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains *in vitro*, dans lequel on a mis les GRH en contact avec les extraits bruts éthanoliques d'*A. ceterach* à différentes concentrations. L'évolution de l'effet hémolytique est évaluée par rapport à un témoin négatif (PBS) et un autre positif (eau distillé), les résultats obtenus de cette étape sont présentés dans la Figure11

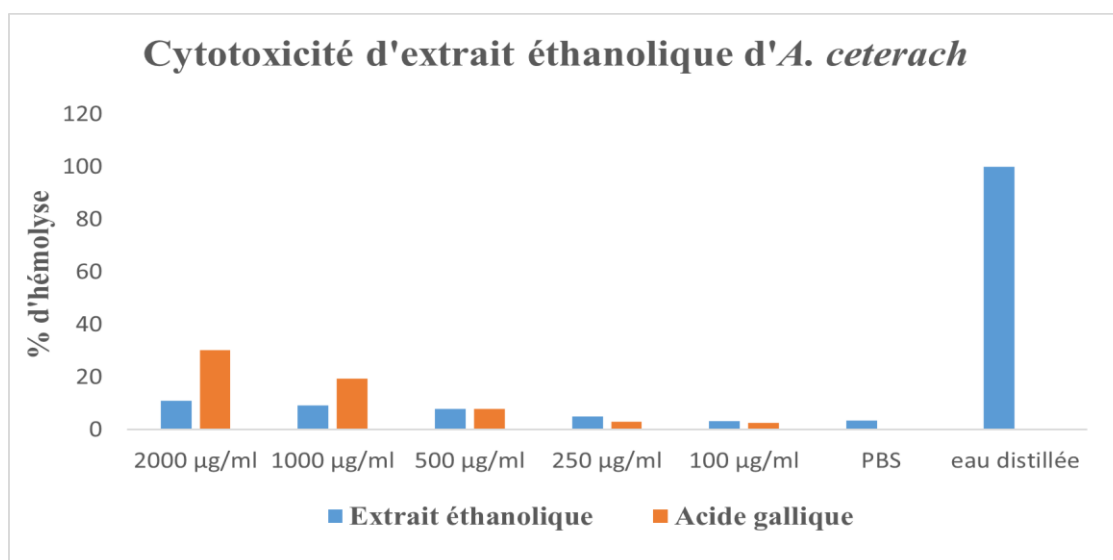


Figure 11 : La cytotoxicité d'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* des GRH

Les résultats (Figure11), révèlent que le traitement des globules rouges par l'acide gallique provoque une augmentation hautement significative du taux d'hémolyse, en fonction des concentrations. Cette molécule de référence présente un effet hémolytique significatif à partir de 0.025 mg/ml avec un pourcentage d'hémolyse de 07,84 %. L'effet hémolytique maximum est aux alentours de 30,27 % à une concentration de 2mg/ml, qui reste inférieur comparativement à l'hémolyse totale, induite par l'eau distillée.

L'effet d'extraits éthanoliques d'*A. ceterach* sur les hématies a été évalué jusqu'à une concentration maximale de 2 mg/ml pour déterminer sa cytotoxicité. D'après la Figure 11, il est évident que la présence des hématies en contact avec les différentes concentrations de l'extrait éthanolique de la plante étudiée ne provoque qu'une hémolyse modérée, comparé à l'acide gallique. Les pourcentages d'hémolyse obtenus montrent des différences très significatives entre l'extrait éthanolique ($P < 0.005$) à différentes concentrations et le contrôle positif. En effet les taux d'hémolyse sont très bas (entre 2 et 11%) même à des concentrations très élevées (100µg/ml [2%] 2000µg/ml [11%]), ses résultats nous ont clairement montré que l'extrait éthanolique d'*A. ceterach* n'avait pratiquement aucun effet sur les globules rouges. Ceci pourrait s'expliquer par la richesse de cette plante en acide phénolique (acide Protocatechique, acide p-Hydroxy benzoïque, acide Chlorogénique, acide Caféique, acide p-Coumarique, acide Rosmarinique) (Živković et al., 2017), et des flavonoïdes glycosylés (Gallocatechin Epigallocatechin Catéchine Epicatechine Epigallocatechin gallate et la Rutin) (Živković et al., 2017) qui sont connues par leur effet anti hémolytique d'une part et malgré qu'elles contiennent

des flavonoïdes, la glycosylation de ces derniers bloquerait leur entrée dans les cellules, d'où l'inactivité de certains extraits. En effet les flavonoïdes sont généralement cytotoxiques, mais cette efficacité dépend d'une part de leur glycosylation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation (Nadour, 2015).

III.5.2. Test anti hémolytique

La Figure 12 Présente les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse induite par un stress hypotonique en fonction des différentes concentrations des extraits éthanolique d'*A.ceterach* et l'acide gallique comme molécule de référence.

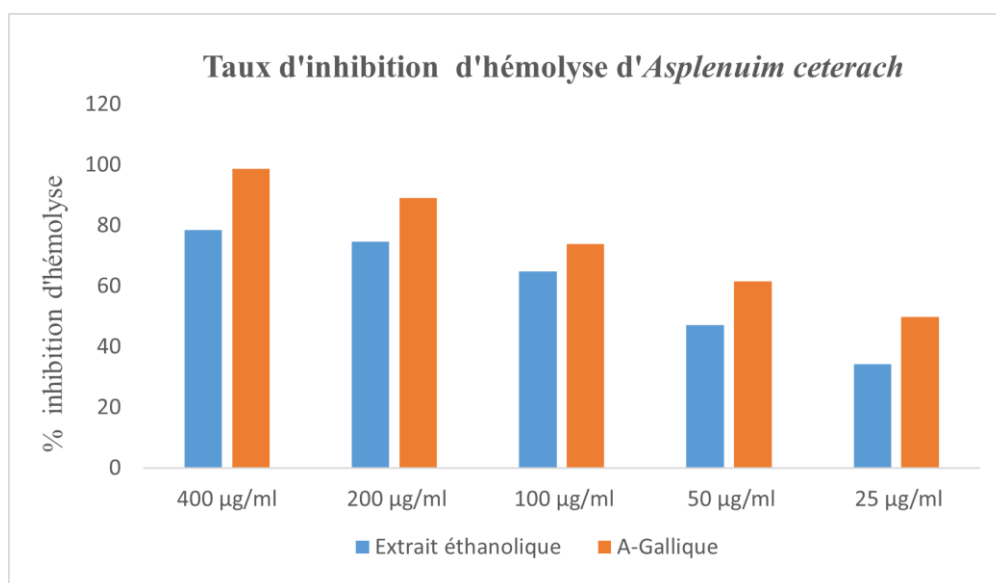


Figure 12 : Taux d'inhibition d'hémolyse d'*Asplenium ceterach* et d'acide gallique

L'analyse des résultats de l'activité antihémolytique (Figure12), induit par l'hypotonie associée avec la chaleur, montre que le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse augmente en fonction des différentes concentrations de l'extrait de plante et le standard (AG). En effet à la concentration 200µg/ml le taux d'inhibition d'hémolyse a atteint un taux maximal à 98.73% $\pm$ 1.16%) qui dépasse même la molécule de référence (AG) (78.46 $\pm$ 2.04 %), et un taux minimal de 49.76 $\pm$ 1.87 %) à une très faible concentration de l'ordre 25 µg/ml, ce qui renseigne sur la forte activité anti-hémolytique d'*Asplenium ceterach*.

L'action anti hémolytique *in vitro* d'*A. ceterach* ainsi que la molécule de référence, a été évaluée par l'utilisation de modèle érythrocytaire (Shobana et Vidhya, 2016). Les globules rouges sont aussi choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro*. Ils sont considérés comme un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire (Wajeman et al., 1992).

Si les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique, la rupture de sa membrane se produira, provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. L'effet hémolytique d'une solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Rahman et al., 2015 ; Labuet et al., 2015**). Les propriétés hémolytiques d'un agent hypotonique sont attribuées à son interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ce qui induit à une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions : entrée de Na⁺ et H₂O, sortie de K⁺, la membrane éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (**Majester-Savornin, 1991**).

Les taux de protection des cellules érythrocytaires par l'extrait éthanolique d'*A.ceterach* contre l'hémolyse ont été évalués en utilisant la densité optique (DO) pour mesurer la libération d'hémoglobine dans le surnageant.

Ces résultats confirment ceux de **Živković et al. (2017)**, qui ont montré que l'extrait d'*Asplenium ceterach* contient des composés bioactifs capables de stabiliser les membranes cellulaires. Les flavonoïdes glycosylés et les acides phénoliques qu'il renferme interagissent avec les phospholipides de la membrane et réduisent la perméabilité. De plus, la glycosylation des flavonoïdes limite leur entrée intracellulaire, ce qui explique la faible cytotoxicité observée (**Nadour, 2015**).

Les variations entre les résultats de cette étude et d'autres travaux peuvent être attribuées à plusieurs facteurs influents, notamment : les conditions environnementales (altitude, exposition au soleil, nature du sol et saison de récolte) (**Wojdyło et al., 2007 ; Yang et al., 2008**), les paramètres d'extraction (type de solvant, durée, température et agitation) (**Dai et Mumper, 2010**), ainsi que les conditions expérimentales du test (type de stress appliqué, pH, temps d'incubation et concentration des réactifs) (**Bilia et al., 2014**). L'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach* a démontré une faible cytotoxicité et une forte activité antihémolytique *in vitro*, surpassant l'effet protecteur de l'acide gallique. Ces résultats confirment le potentiel de cette plante en tant qu'agent naturel stabilisateur de membrane, pouvant contribuer à la protection cellulaire contre les déséquilibres osmotiques ou oxydatifs.

Conclusion

Et perspectives

Ce travail de recherche avait pour objectif l'évaluation du potentiel antioxydant et de l'activité antihémolytique de l'extrait éthanolique de la fougère *Asplenium ceterach*, une espèce utilisée dans la médecine traditionnelle. À travers une série d'analyses expérimentales, nous avons pu établir un profil biochimique et biologique significatif de cette plante.

Les résultats obtenus ont révélé un rendement d'extraction modéré mais suffisant pour permettre l'analyse de la composition chimique. Les dosages phytochimiques ont mis en évidence une richesse en composés phénoliques, flavonoïdes reconnus pour leurs propriétés biologiques bénéfiques.

Les activités antioxydantes mesurées par les tests DPPH, ABTS et FRAP ont montré une capacité de piégeage des radicaux libres et un pouvoir réducteur importants, témoignant de l'efficacité de l'extrait à neutraliser le stress oxydatif. Par ailleurs, l'activité antihémolytique a confirmé la capacité de l'extrait à protéger les membranes cellulaires contre l'hémolyse, tout en présentant une faible cytotoxicité.

Ces résultats confirment les vertus médicinales attribuées à *Asplenium ceterach* et soulignent son potentiel en tant que source naturelle d'agents antioxydants et stabilisateurs de membrane. Ce travail contribue à la valorisation scientifique de cette plante et ouvre des perspectives intéressantes pour la recherche pharmacologique.

Cependant, ce travail reste une étape exploratoire. L'absence d'identification structurale précise des composés actifs et la limitation aux essais *in vitro* constituent des axes à approfondir. À cet effet, des études complémentaires sont nécessaires, notamment l'analyse chromatographique des constituants, des tests cellulaires approfondis, voire des études *in vivo* portant sur les effets antioxydants et cytoprotecteur de l'extrait, afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et d'approfondir la compréhension de ses mécanismes d'action, afin de mieux cerner les mécanismes d'action et d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette espèce.

Cette étude contribue à une meilleure compréhension des vertus thérapeutiques d'*Asplenium ceterach* et ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de produits naturels à visée antioxydante et cytoprotectrice à usage pharmaceutique ou nutraceutique.

De futures recherches pourraient explorer la formulation de compléments alimentaires à base de cette plante, l'encapsulation pour améliorer sa biodisponibilité, ainsi que son intégration dans des dispositifs de délivrance ciblés. Des études pharmacocinétiques et toxicologiques complémentaires seraient également nécessaires pour valider son innocuité et son efficacité *in vivo*.

Références bibliographiques

A

Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants (Los Angeles)* 2015;4:1-6.

B

Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, Radice T, Nesa F, Cortelezzi A. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: A GIMEMA study of 308 patients. *Blood* 2015;126:79-86.

Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants from the Algerian flora. *Pharmacogn J* 2013;5:105-12.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-6.

Berk S, Yücel M, Özkan E, Işık K. In vitro biological evaluation and phytochemical profile of *Asplenium ceterach* L. extracts: Antioxidant, antimicrobial, DNA protection and cytotoxic activities. *Biologia* 2021;76:1567-78.

Benslama A, Boulfane S, Boudjelal A. Antioxidant activity of some *Asplenium* species. *J Chem Pharm Res* 2015;7:950-6.

Bichis C, Tanguy J, Bonnefont JP. Physiologie de l'érythrocyte. In: Beuzard M, ed. *Hématologie*. Paris: Flammarion, 2000:111-24.

Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri F. (2014). Plant bioactive compounds: Extraction and quality control. *Mini Rev Med Chem* 14(8):712–719.

Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential oil of *Melissa officinalis* L.: A review of its pharmacological properties. *Nat Prod Commun* 2014;9:1197-1204.

Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:651593.

Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Abrini J, Dakka N, Idaomar M. Medicinal plants used in traditional medicine to fight cancer in Morocco. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;2018:4328124.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 1995;28:25-30.

C

Ceylan R, Karadaş N, Sarikurkcu C. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory properties of *Asplenium ceterach* L. *Ind Crops Prod* 2020;149:112325.

Chaabi M, Allali H, Bennaceur M, Dib MEA. Activité antioxydante des extraits de quelques plantes médicinales algériennes. *Phytochem Pharmacol* 2008;1:23-8.

Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002;10:178-82.

Christenhusz MJM, Fay MF, Chase MW. *Plants of the World: An Illustrated Encyclopedia of Vascular Plants*. Chicago: University of Chicago Press, 2022.

Cuvelier ME, Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Food Chem* 1995;52:383-9.

D

Dahmani M, Djouadi F, Touitou Y. Les hémolyses pathologiques. *Rev Prat* 2000;50:2040-4.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010;15:7313-52.

Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-30.

E

Ekor M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 2014;4:177.

Elgsaeter A, Stokke BT, Mikkelsen A, Branton D. The molecular basis of erythrocyte shape. *Science* 1986;234:1217-22.

F

Federici AB, Barcellini W, Zaja F, Cortelezzi A. Therapy of autoimmune hemolytic anemias. *Haematologica Rep* 2007;2:7-10.

Flieger J, Czajka A, Piwowar A. Polyphenols and flavonoids in prevention of cardiovascular diseases. *Postepy Hig Med Dosw* 2021;75:210-23.

Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 1927;73:627-50.

G

Gadamsetty G, Maru SS, Sarada M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic leaf extract of traditionally used medicinal plant *Mimusops elengi* L. *J Pharm Sci Res* 2016;5:125.

Guillaume C. Érythropoïèse : De la moelle au globule rouge. *Hématologie* 2007;13:85-9.

H

Habibur Rahman M, Ismail A, Al-Ghamdi AA. Comparative study of hemolytic activity of some medicinal plants. *Asian J Biochem* 2015;10:165-71.

Habibur Rahman M, Labu ZK et al. In vitro membrane stabilizing activity of ethanolic extract of *Bacopa monnieri*. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8(1):130–134.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2015.

Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieste: ICS-UNIDO, 2008:1-266.

Howard J. Erythropoiesis and red cell life span. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17:47-64.

J

Jaureguierry MS. La membrane érythrocytaire : structure et fonctions. *Biochimie Méd* 2015;21:115-24.

K

Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest* 2017;127:750-60.

L

Labut EM, Assunção NA, da Silva SC. Oxidative stress and cytotoxicity evaluation in erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 2015;29:360-5.

Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;13:757-72.

M

Majester-Savornin B. *Biochimie médicale*. Paris: Masson, 1991:1-437.

N

Nadour M. Étude de l'activité biologique des flavonoïdes : Rôle de la glycosylation. Rabat: Université Mohammed V, 2015:1-186.

Negadi A, Meziani R, Boucherit K. Évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce *Asplenium ceterach* récoltée à Tiaret. *Bull Soc R Sci Liège* 2021;90:148-58.

Newman DJ, Cragg GM. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 83(3):770–803.

P

Petrova A, Dimitrova S, Zayova E. Antioxidant potential and phytochemical characterization of *Asplenium ceterach* L. extracts. *Plants* 2021;10:2724.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008;4(2):89–96.

Q

Quézel P, Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: CNRS, 1962:1-565.

R

Rahman MA, Fazal MA, Islam MN. In vitro hemolytic activity of medicinal plants used in traditional medicine in Bangladesh. BMC Complement Altern Med 2015;15:194.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26:1231-7.

S

Sarikurkcü C, Tepe B, Kocak MS, Uren MC. Biological activity and phytochemical profile of *Asplenium ceterach*. Ind Crops Prod 2019;128:644-9.

Shobana S, Vidhya VG. Protective role of flavonoids in hypotonically induced hemolysis in human erythrocytes. Int J Res Pharm Biosci 2016;3:1-4.

Shobhana C, Vidhya V. Evaluation of anti-hemolytic activity of ethanolic extract of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schult. using human erythrocytes. Int J Pharmacogn Phytochem Res 2016;8:619-22.

W

Wajeman R, Masmoudi H, Duret JP. Utilisation des globules rouges comme modèle cellulaire. Rev Fr Lab 1992;199:33-8.

Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem 2007;105:940-9.

Wong SP, Leong LP, Koh JHW. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chem 2006;99:775-83.

Y

Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT Food Sci Technol 2008;41:1060-6.

Z

Živković J, Barros L, Calhella RC, et al. Bioactive properties of wild and cultivated *Asplenium ceterach* L.: A comparative study. Food Funct 2017;8:963-70.

Živković S, Skorić M, Šiler B, et al. Phytochemical characterization and antioxidant potential of rustyback fern (*Asplenium ceterach* L.). Lekovite Sirovine 2017;37:15–20.

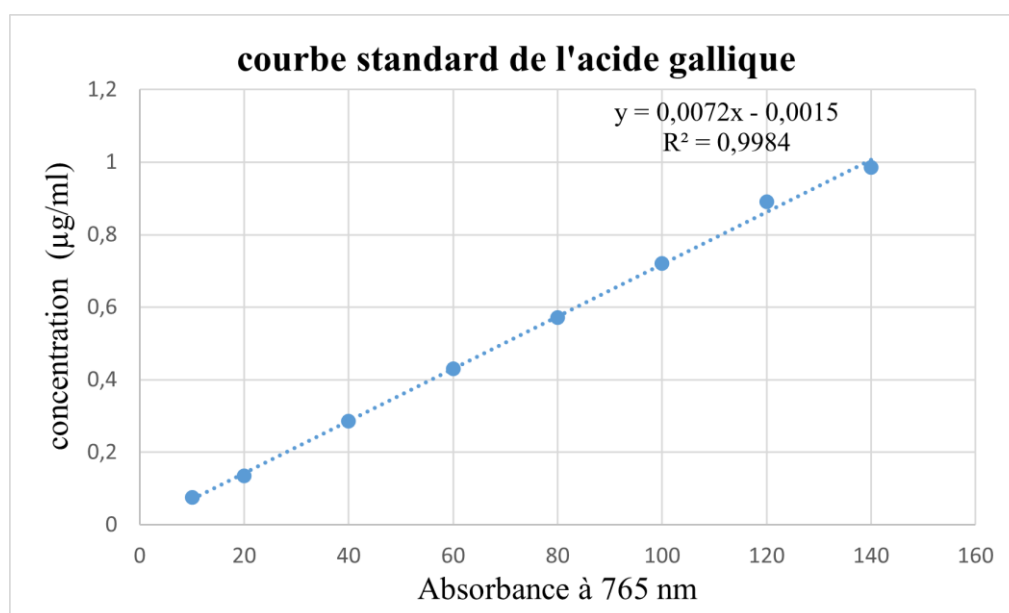
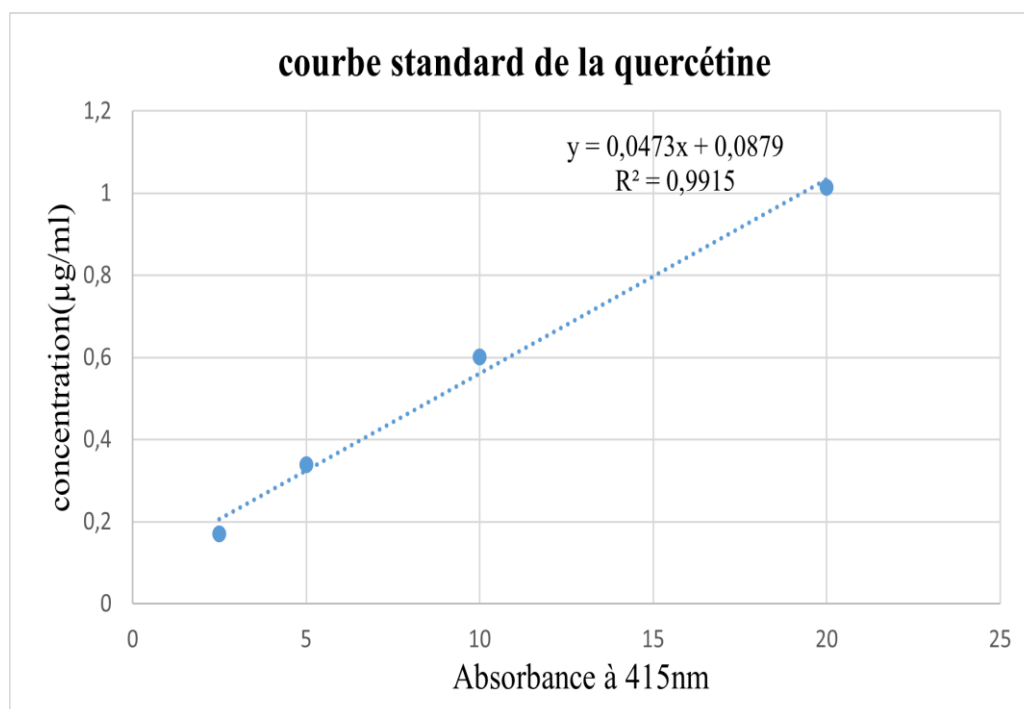
Annexes

AnnexeA1 : Liste des réactifs et produits chimiques utilisés

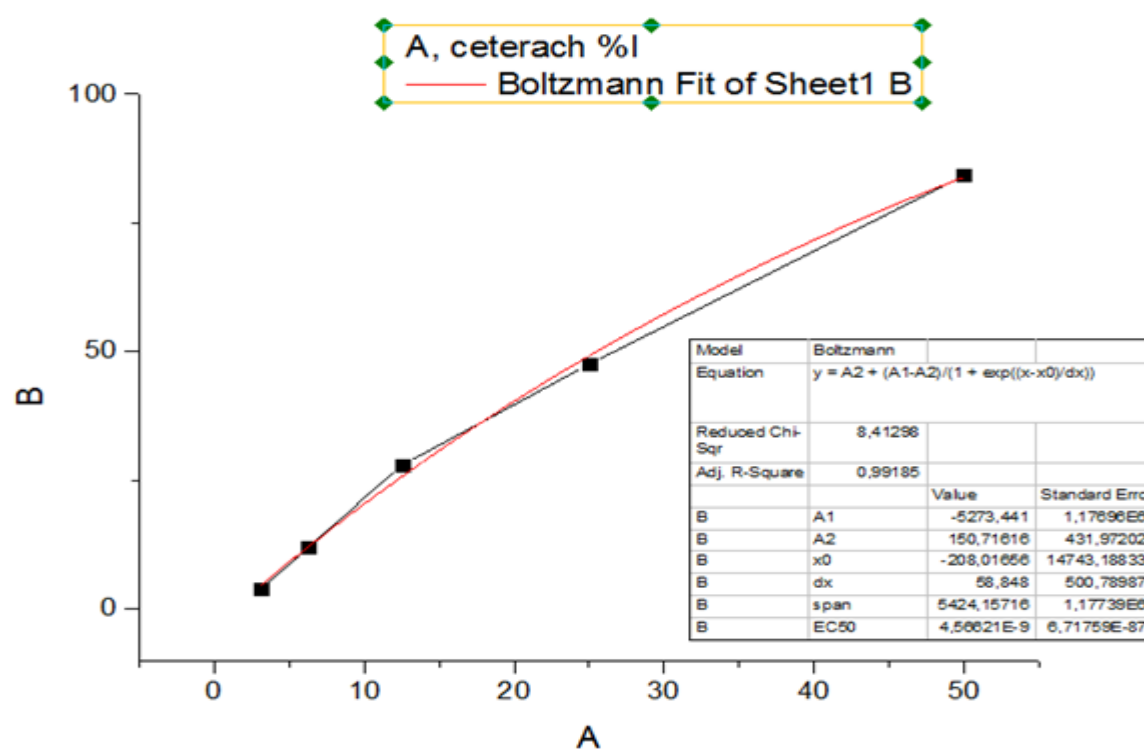
Nom du réactif	Formule / Description	Utilisation
Éthanol à 70 %	C ₂ H ₅ OH (70% v/v)	Solvant d'extraction
Réactif de Folin–Ciocalteu	-	Dosage des polyphénols totaux
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	Alcalinisant pour le test de Folin
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	Standard des composés phénoliques
Chlorure d'aluminium à 2 %	AlCl ₃	Réactif pour flavonoïdes
Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Standard des flavonoïdes
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	Test antioxydant radicalaire
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	Test antioxydant radicalaire
Persulfate de potassium	K ₂ S ₂ O ₈	Activation du radical ABTS• ⁺
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine	Réactif du test FRAP
Chlorure ferrique	FeCl ₃	Source de Fe ³⁺ pour FRAP
Acétate de sodium	CH ₃ COONa	Tampon pour test FRAP
Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆	Standard antioxydant (vitamine C)
BHA	Butylhydroxyanisole	Standard antioxydant
Solution de PBS	Phosphate Buffered Saline, 0,2 M, pH 7,4	Tampon pour tests biologiques
NaCl à 0,9 %	Chlorure de sodium	Solution isotonique
NaCl à 0,36 %	Chlorure de sodium	Solution hypo-saline
Tampon phosphate	0,15 M, pH 7,4	Tampon physiologique
Eau distillée	-	Solvant purifié

Annexe A2 : Appareils et matériel de laboratoire utilisés

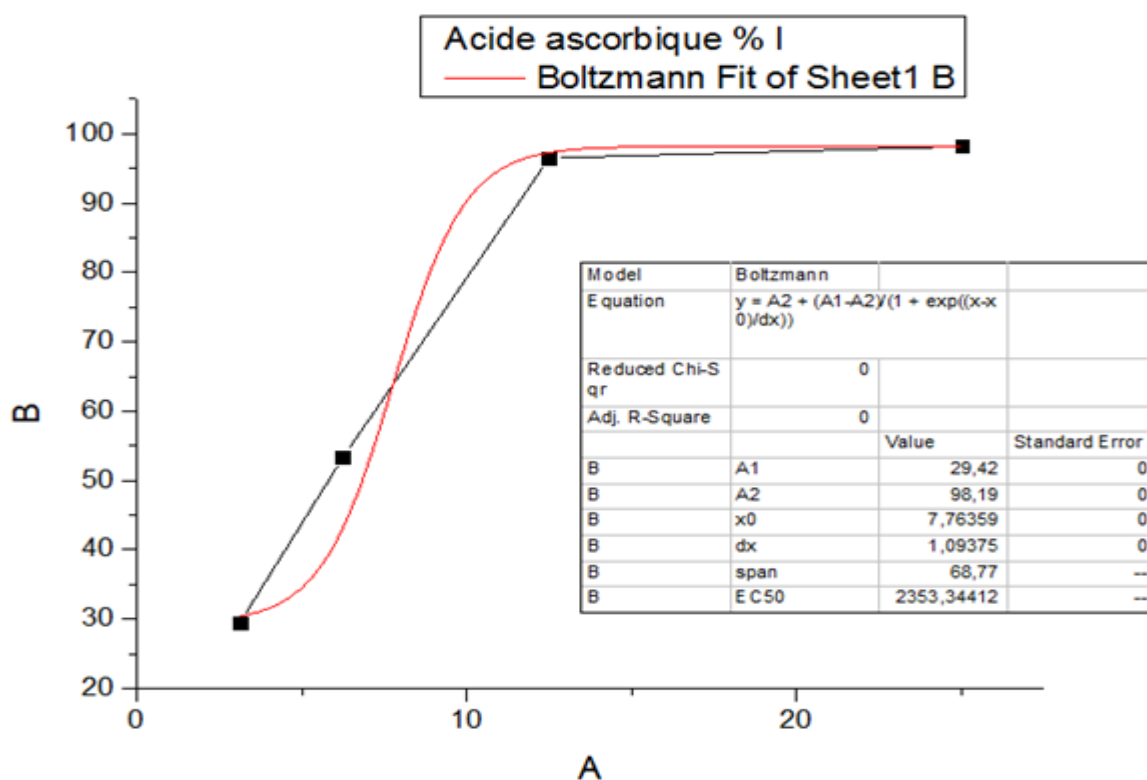
Appareil / Matériel	Utilisation
Balance électronique	Pesée des échantillons et des réactifs
Agitateur magnétique	Mélange des solutions
Centrifugeuse	Séparation des phases solides/liquides
Spectrophotomètre UV-Visible	Mesure des absorbances pour les dosages
Bain-marie	Chauffage contrôlé des échantillons
Micropipettes	Prélèvement précis de petits volumes
Pipettes graduées et jaugées	Mesure de volumes de liquides
Tubes à essai	Réactions chimiques en petit volume
Portoirs à tubes	Support des tubes à essai
Ballons et béchers	Préparation des solutions
Fioles jaugées	Préparation de solutions à volume précis
Verre de montre	Pesée des solides
Entonnoirs	Transfert de liquides et filtration
Filtre à papier	Filtration des extraits
Plaques chauffantes	Chauffage simple
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
PH-mètre	Mesure du pH des solutions

Annexe A3 : Courbe standard de l'acide gallique**Annexe A4 : Courbe standard de la quercétine**

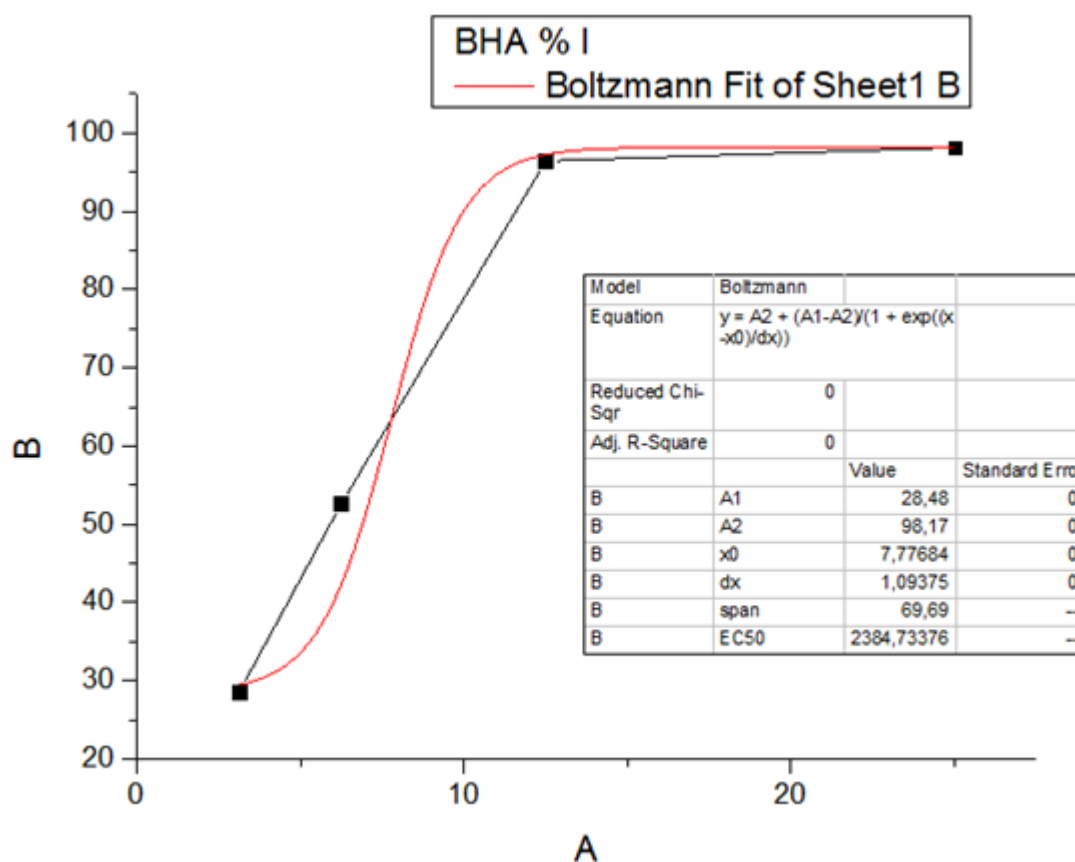
Annexe A5 : Courbe dose -réponse extrait éthanolique
(TEST DPPH)



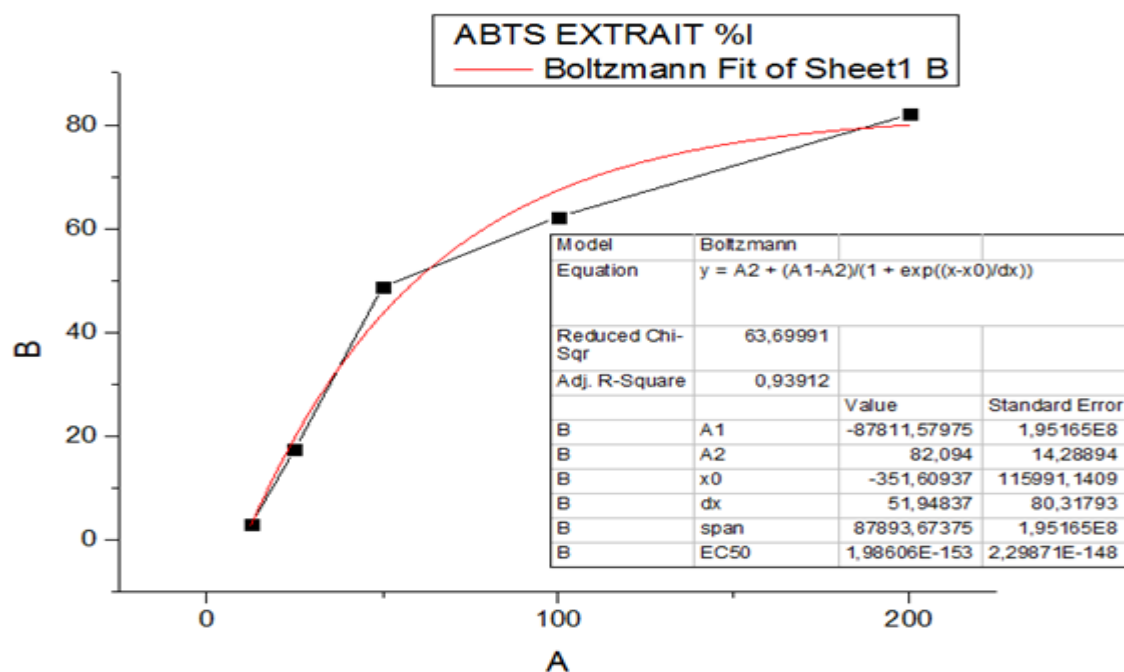
Annexe A6 : Courbe dose -réponse – acide ascorbique (TEST DPPH)

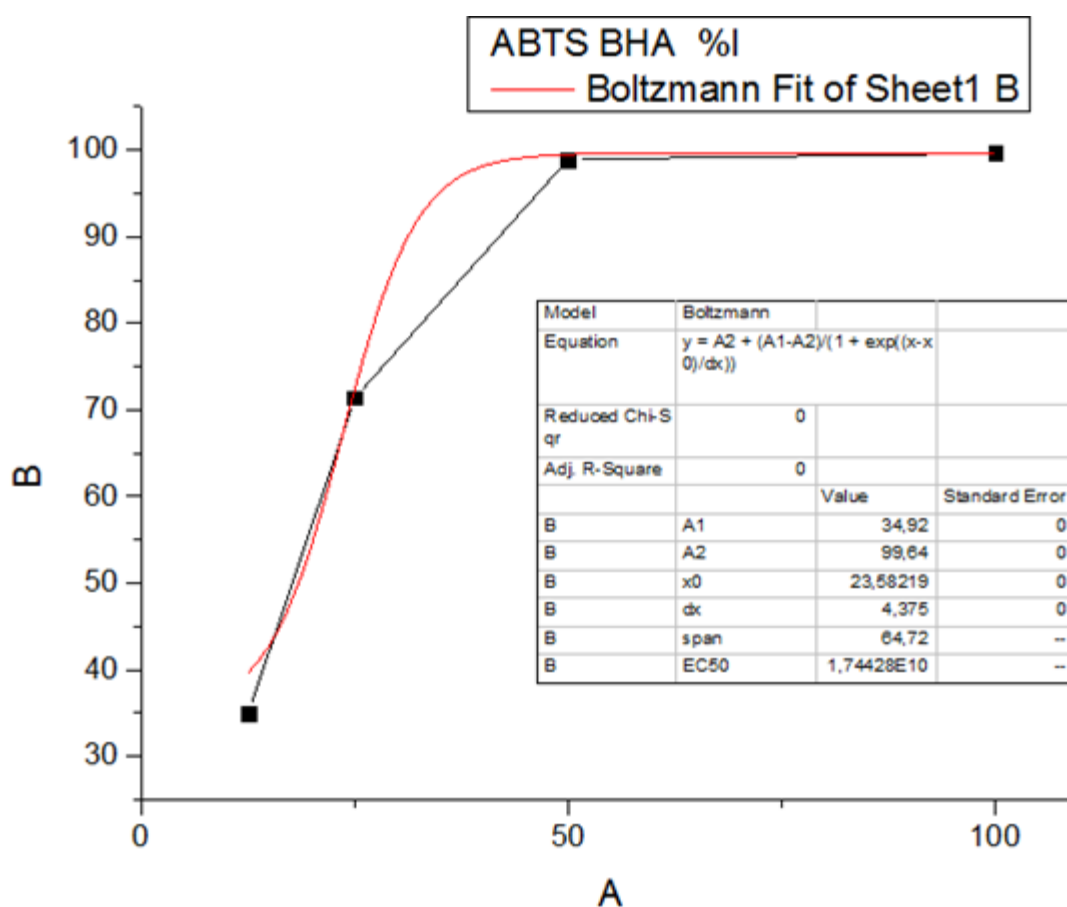
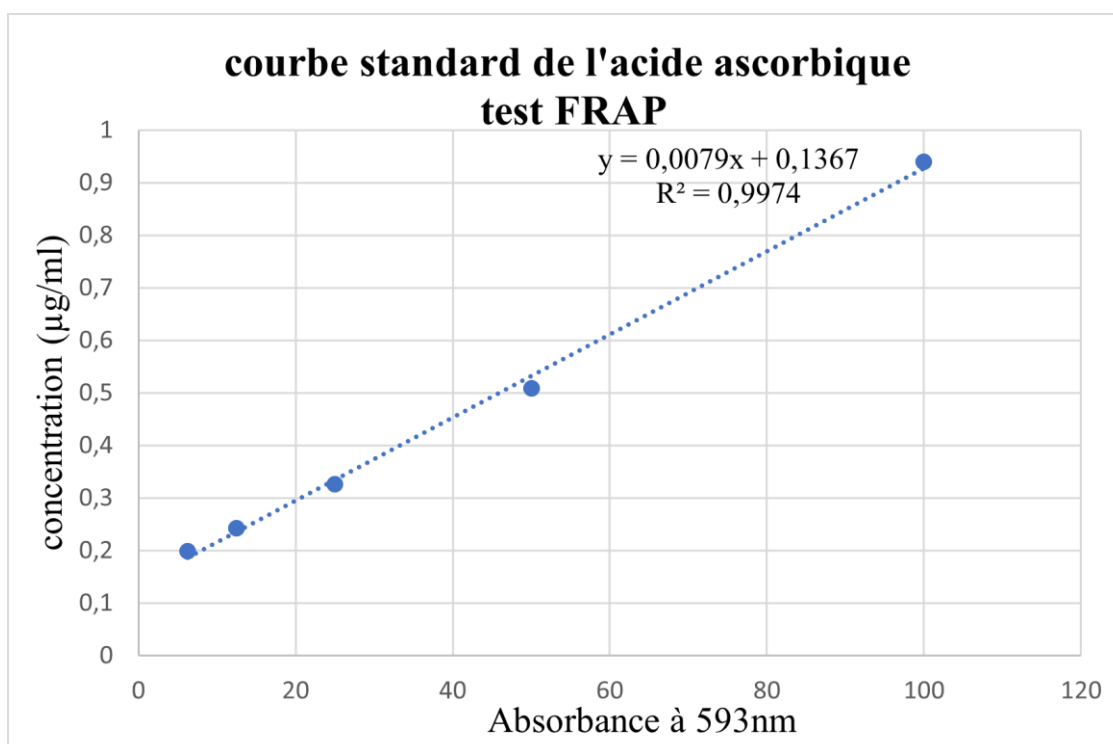


Annexe A7 : Courbe dose -réponse – BHA (TEST DPPH)



Annexe A8 : Courbe dose -réponse – extrait éthanolique (TEST ABTS)



Annexe A9 : Courbe dose- réponse – BHA (TEST ABTS)**Annexe A10: Courbe standard de l'acide ascorbique(TEST FRAP)**

RÉSUMÉ

Ce travail de recherche porte sur l'évaluation des propriétés antioxydantes et antihémolytiques de l'extrait éthanolique d'*Asplenium ceterach*, une fougère médicinale traditionnellement utilisée en Algérie. L'extraction par macération a donné un rendement de 11,12 %. L'analyse phytochimique a révélé une teneur élevée en polyphénols totaux ($193,10 \pm 1,43$ mg EAG/g) et en flavonoïdes ($34,18 \pm 0,52$ mg EQ/g). L'activité antioxydante a été évaluée par les tests DPPH ($IC_{50} = 25,04$ µg/mL), ABTS ($IC_{50} = 59,31$ µg/mL) et FRAP ($1850 \pm 9,7$ mg EAA/g), montrant une activité modérée comparée aux standards (acide ascorbique et BHA). Le test de cytotoxicité sur les érythrocytes humains a montré une hémolyse faible (2 à 11 %) à des concentrations entre 100 et 2000 µg/mL, indiquant une bonne tolérance cellulaire. L'activité antihémolytique a révélé un effet protecteur dose-dépendant contre l'hémolyse induite par le stress hypotonique, avec un taux d'inhibition maximal de $98,73 \pm 1,16$ % à 200 µg/mL, supérieur à celui de l'acide gallique ($78,46 \pm 2,04$ %). Ces effets pourraient être attribués à la richesse en composés phénoliques et flavonoïdes glycosylés. Ainsi, *Asplenium ceterach* apparaît comme une source naturelle prometteuse de molécules bioactives à potentiel antioxydant et cytoprotecteur, justifiant son usage traditionnel et son intérêt pharmacologique.

Mots-clés : *Asplenium ceterach*, Antioxydant, Flavonoïdes, Cytoprotection, Hémolyse

ABSTRACT

This research work focuses on evaluating the antioxidant and anti-hemolytic properties of the ethanolic extract of *Asplenium ceterach*, a medicinal fern traditionally used in Algeria. Ethanolic extraction by maceration yielded 11.12%. Phytochemical analysis revealed high contents of total polyphenols (193.10 ± 1.43 mg GAE/g) and flavonoids (34.18 ± 0.52 mg QE/g). Antioxidant activity was assessed using DPPH, ABTS, and FRAP assays. The extract showed moderate antioxidant potential with IC_{50} values of 25.04 µg/mL (DPPH) and 59.31 µg/mL (ABTS), compared to 7.69 µg/mL and 6.83 µg/mL for BHA and ascorbic acid, respectively. The FRAP test indicated a strong reducing power (1850 ± 9.7 mg AAE/g). Cytotoxicity tests on human erythrocytes revealed low hemolytic activity (2–11%) at concentrations between 100 and 2000 µg/mL, suggesting good cell compatibility. Anti-hemolytic activity against hypotonic stress showed a dose-dependent protective effect, with a maximum inhibition rate of 98.73 ± 1.16 % at 200 µg/mL, exceeding that of the reference compound gallic acid (78.46 ± 2.04 %). These effects may be attributed to the presence of glycosylated flavonoids and phenolic acids known to interact with erythrocyte membranes and reduce permeability. Overall, *Asplenium ceterach* appears to be a promising natural source of bioactive compounds with antioxidant and cytoprotective potential, supporting its traditional use and encouraging further pharmacological investigations.

Keywords: *Asplenium ceterach*, antioxidant, flavonoids, cytoprotection, hemolysis