



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences biologiques



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Toxicologie

Intitulé

Etude de l'effet de l'oxyde de manganèse sur la viabilité
cellulaire des globules rouges humaines et le rôle de *Globularia*
alypum et *Juniperus oxycedrus*

Présenté par : Fatima Zahra TIGHIOUARET
Kaouther Safia HASSANI

Devant le jury :

Président :	M ^{me} BENRADIA Hamida	MCB
Encadrant:	M ^r MEKHALFI Hamoudi	MCB
Co-encadrant:	M ^r BELLIK Yuva	MCA
Examineur :	M ^r MEZDOUR Hichem	MCB

Année universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les cinq années de maîtrise nous ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis est sans de longues heures de travail.

*En premier lieu, nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là.*

Un merci également à nos familles pour leur courage, les sacrifices qu'ils ont consentis pendant la durée de nos études et pour leur soutien aussi bien moral que financiers.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Mr **Mekhalfi Hamoudi**, et Mr **Bellik Yuva**, des docteurs dans la faculté des sciences et de la nature, pour avoir accepté de nous encadrer, pour leurs précieux conseils et encouragements malgré leurs préoccupations.*

*Nos remerciements vont également à Docteur **Sebti Toufik** directeur du laboratoire d'analyse médical, pour son accueil et son aide.*

Ainsi, nous adressons nos remerciements aux ingénieurs des laboratoires au niveau de l'université, pour leur aide.

Enfin, nous remercions tous les enseignants de la faculté SNV et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Kaouther et Fatima

DEDICACES

Je dédie ce travail :

*A ma chère mère, **ATIA Saida**, source de tendresse et d'amour pour son soutien tout au long de ma vie.*

*A mon cher père, **Djamel Eddine**, qui m'a toujours soutenu et qui a fait tout son possible pour m'aider.*

*A mon adorable frère, **Ayoub** que j'aime tant et sa femme **Asma**.*

*A mes précieuses sœurs, **Hana** et **Ikram**, les mots ne peuvent résumer mon amour à votre égard.*

*A toute la famille **HASSANI** et **ATIA***

*A mes amies, mes sœurs, mesmoitiés que je les aime beaucoup **Imene**, **Bouthaina**, **Roufaida** et **Amira**.*

*A mes adorables amies : **Samira**, **Zahra**, **Soulef**, **Aichouch**, **Hind**, **Madjida**, **Lamis** toute mon amour et amitié.*

*A ma chère amie, mon binôme **Fatima** qui m'a supporté durant ces dernières années et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.*

A tous mes ami(e)s avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

A toute la promo de toxicologie 2019.

Kaouther

DEDICACES

Je dédie ce travail :

*A ma très chère mère **Aoufi Salima** source de ma réussite, de part son amour, son soutien sa présence dans ma vie.*

*A mon très cher Père **Nourddine** qui m'à toujours soutenu et fait tous son possible pour m'aider. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

A mes chers grands parents que dieu les protèges.

*A mes précieux frères **Ahmed** et **Younes** et mes adorables sœur **Khaoula**,
Romaissa et **Manar**.*

*A mes amies, mes moitiées que je les aime et les admire, **Madjida**, **Hind**,
Zahra, **Samira**, **Soulef** et **Aichouche***

*A mes meilleures amies, **Zineb**, **Fatima**, **Hjila** et **Sarah***

*A ma chère amie, et binôme **khaouter safia** qui à était une meilleure camarade de classe que je pourrais avoir, une personne gentille, serviable et attentionnée.*

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'étude.

A tous ceux qui me sont chers

A tous les membres de ma promotion que j'ai omis de citer.

Fatima Zahra

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Partie Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le manganèse

1. Origine de manganèse 3

2. Comportement dans l'environnement3

2.1. Dans l'eau.....3

2.2 .Dans les sols4

3. Applications industrielles.....4

3.1. Les piles.....5

4. Mécanismes d'action du manganèse6

4.1. Perturbation des systèmes de neurotransmetteurs.....6

4.2. Altération des fonctions mitochondriales.....7

4.3. Induction de stress oxydatif.....7

5. Les effets du manganèse et ses dérivés sur la santé humaine.....7

6. Toxicocinétique du manganèse.....8

7. Intoxication aiguës et chroniques au manganèse.....8

8. Traitement de l'intoxication.....9

8.1. Traitement humain9

8.2. Traitement des eaux.....10

Chapitre II : Radicaux libres, stress oxydant et antioxydant

1. Radicaux libres.....12

2. Stress oxydant.....	12
3. Les antioxydants.....	13
3.1. Système de défense	13
3.1.1. Systèmes enzymatiques.....	13
3.1.2. Systèmes non enzymatiques.....	14
4. Modèles d'étude du stress oxydant.....	15
4.1. Les érythrocytes.....	16
4.1.1. Définition.....	16
4.1.2. La membrane érythrocytaire.....	17
4.2. L'hémolyse.....	18
4.3. Les érythrocytes et stress oxydant.....	18

Chapitre III. Matériels et méthodes

1. Matériels.....	19
1.1. Echantillons	19
1.1.1. Oxyde de manganèse.....	19
1.1.2. Matériels végétaux	19
1.1.3. Sang.....	20
1.2. Réactifs et standards	21
2. Méthodes	21
2.1. Extraction de l'oxyde de manganèse.....	21
2.2. Evaluation du taux d'humidité.....	21
2.3. Extraction des plantes.....	22
2.4. Dosage des phénols totaux.....	22
2.5. Etude de l'activité antioxydant et anti-hémolytique des extraits de plantes et oxyde de manganèse.....	23
2.5.1. Préparation du sang isotonique.....	23
2.5.2. Mesure de la turbidité cellulaire.....	23
2.5.3. Dosage de l'hémoglobine libérée.....	24
3. Analyse statistique.....	25

Chapitre IV : Résultats et Discussions

1. Evaluation du taux d'humidité.....	26
2. Rendement d'extraction.....	27

3. Teneur en phénol totaux.....	28
4. Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique de <i>Globularia alypum</i> et <i>Juniperus oxycedrus</i>	29
4.1 Pile déchargée.....	29
4.1.1. Turbidité cellulaire.....	29
4.1.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire.....	30
4.2. Pile neuve.....	31
4.2.1. Turbidité cellulaire.....	31
4.2.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire.....	32
Conclusion générale.....	35

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Listes des abréviations

ANOVA : Analysis of variance

CAT : Catalase

CP : Composés phénoliques

EAG : Equivalent d'acide gallique

EDCH : Eau destiné au consommateur humain

EDTA : L'acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique

ERO : Espèce réactive d'oxygène

GPx : Glutathion peroxydase

GR: Globule rouge

GSH : Glutathion

GSSH : Glutathion disulfite

Hb: Hémoglobine

HSP : Protéine de choc thermique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

KMnO₄ : Permanganate de potassium

MMT : Manganèse tricarbonyle (méthylcyclopentandiényle)

Mn : Manganèse

Mn²⁺ : Manganoux

Mn⁴⁺ : Manganique

MnCO₃ : Carbonate de manganèse

MnCl₂ : Chlorure de manganèse

MnSO₄ : Sulfate de manganèse

Mn₃O₄ : Tétraoxyde de manganèse

MnO₂ : Dioxyde de manganèse

MnO₄⁻ : Permanganate

MnPO₄ : Phosphate de manganèse

MP : Maladie de Parkinson

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

NO : Monoxyde d'azote

OH : Radical hydroxyle

O₃ : Ozone

O₂⁻ : Anion superoxyde

O₂ : Oxygène

PH : Potentiel hydrogène

RBC: Red Blood cell

ROO : Radical peroxyde

ROOH: Peroxyde organique

ROS: reactive oxygen species

SOD : Superoxyde dismutase

ZnCl₂ : Chlorure de zinc

Test T : Test de Student

Listes des tableaux

Tableau	Intitulé	Page
I	Les différents types d'espèces réactives	9
II	Composition de la membrane de l'érythrocyte	13

Listes des figures

Figure	Intitulé	Page
1	Schéma et réactions électrochimiques d'une pile saline (Zn/MnO ₂)	4
2	Structure de base des flavonoïdes	12
3	Structure de la membrane érythrocytaire	14
4	Photo du plante <i>Globularia alypum</i>	18
5	Photo du plante <i>Juniperus oxycedrus</i>	19
6	Echantillons de sang	19
7	Photo représente les deux piles (déchargé et neuve)	20
8	Préparation du sang isotonique	22
9	Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité hémolytique	24
10	Taux d'humidité de deux plantes	25
11	Rendement d'extraction de deux plantes	26
12	Teneur en polyphénols totaux des deux plantes	27
13	Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du manganite (MnOOH). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	29
14	Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du manganite (MnOOH). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	30
15	Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du l'oxyde de manganèse (MnO ₂). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	31
16	Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du l'oxyde de manganèse (MnO ₂). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	32

Introduction Générale

Introduction

L'étude de la toxicité des contaminants environnementaux est un sujet fleurissant en recherche depuis la dernière décennie. Nous sommes de plus en plus sensibilisés aux effets néfastes des contaminants de nature anthropogénique ou de sources naturelles. C'est le cas du manganèse (Mn) un élément essentiel qui se retrouve naturellement dans le sol et les eaux souterraines (**Grandjean & Landrigan, 2014**). Ce métal fait partie des oligoéléments, c'est-à-dire qu'il est nécessaire à certains processus physiologiques des organismes vivants. Il permet notamment le métabolisme normal des acides aminés, des lipides, des protéines, des glucides et est utilisé comme co-facteur enzymatique par certaines enzymes. En effet, le manganèse contribue à la protection des cellules contre le stress oxydatif, cependant, une concentration excessive de cet oligo-élément dans l'organisme entraîne une augmentation du stress oxydatif (**Komatsu et al., 2009**).

Le manganèse est retrouvé dans les fongicides et les engrais, les piles électriques, les additifs de carburant (p. ex. : le méthylcyclo-pentadiényle-tricarbone de manganèse [MMT]), la peinture et dans plusieurs alliages (p. ex. : l'acier, l'aluminium et le bronze). Puisque son usage est multiple et abondant, de nombreux ouvriers travaillant dans les mines ou les usines de formages de métaux sont exposés au Mn, absorbé principalement par voie respiratoire (**ATSDR, 2012**). Dès la dernière décennie, le Mn a rejoint le groupe d'éléments neurotoxiques, s'ajoutant au méthylmercure, à l'arsenic et au plomb, (**Grandjean & Landrigan, 2014**).

Les plantes médicinales ont toujours été utilisées en médecine traditionnelle dans les traitements de diverses pathologies et infections. De nos jours, la communauté scientifique ne cesse de démontrer leurs propriétés biologiques intéressantes, représentées essentiellement par les activités anti-oxydantes et antimicrobiennes, antivirales, cardio-protectrices voire même anticancéreuses dues à leur richesse en composés phénoliques (**Hennebelle et al., 2004**).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à deux plantes locales soit *Juniperus oxycedrus* et *Globularia alypum*, en raison de de leurs usages thérapeutiques multiples. La thématique de recherche, au quelle nous nous sommes amenés à réaliser dans ce mémoire de fin d'étude, revêt un intérêt capital, étant donné que nous sommes impétrants en toxicologie et que nous cherchons à investiguer les effets toxiques du manganèse sur l'être humain mais aussi l'effet protecteur des substances actives des deux plantes à l'égard du manganèse (santé et environnement).

Ainsi nous nous sommes proposés d'étudier, l'effet du matériau cathodique, s'agit-il du bioxyde de manganèse (MnO_2) des piles sèches à l'Etat neuf et, du manganite ($MnOOH$) des piles usagées sur un modèle cellulaire *in vitro*. Cette étude englobe aussi les propriétés antioxydantes de *Juniperus oxycedrus* et *Globularia alypum* et leurs effets sur les globules rouges humaines.

Notre démarche consiste d'une part, en l'extraction des substances actives des deux plantes avec dosage de leurs teneurs en composés phénoliques. D'autre part, l'étude de l'effet de ces substances sur la résistance des hématies au stress hypotonique sous l'action de l'oxyde de manganèse (pile neuve et pile déchargée).

Ce manuscrit est scindé en quatre principaux chapitres : le premier chapitre est consacré à un petit rappel théorique avec un accent sur le manganèse et ses dérivés (origine, comportement, application, mécanisme d'action...). Le deuxième chapitre traite les radicaux libres, le stress oxydant et antioxydants. Le troisième chapitre décrit les matériels et les méthodes (protocoles) utilisées dans cette étude. Dans le quatrième chapitre, sont présentés les résultats de l'étude, leurs traitements et leurs discussions où le lecteur sera bien guidé dans l'analyse et la démonstration.

Une conclusion générale est présentée afin de mettre au diapason les résultats de cette étude.

Partie bibliographique

Chapitre I

Le manganèse Mn constitue environ 0,10 % de la croûte terrestre et représente le 12^e élément le plus abondant (**Francis & Forsyth,1995**). Le plus souvent, on trouve le manganèse sous forme de dioxyde, de carbonate ou de silicate de manganèse. On peut le trouver à l'état d'oxyde à des valences allant de -3 à +7 ; les états d'oxydation dits manganeux (Mn^{2+}) et manganique (Mn^{4+}) sont ceux qui touchent particulièrement les systèmes d'aqueduc. (**CCMRE,1987**).

1. Origine

Le Mn est retrouvé naturellement dans les sols, l'eau des rivières, des lacs et des sources souterraines, dans l'air ambiant de même que dans la nourriture. Chacun d'entre nous est exposé à des traces dans l'air et en consomme par voie orale à travers la nourriture et l'eau (**Cooper 1984 ; US EPA 1985a ; Schroeder et al. 1987 ; Eckel& Langley 1988 ; Rope et al, 1988**). L'apport quotidien à travers la nourriture est de l'ordre de 1 à 10 mg (**ATSDR 2000, WHO 1997**). L'absorption respiratoire est estimée à moins de 2 µg/jour (**WHO,1981**). Le manganèse est considéré comme un élément de trace essentiel pour une bonne santé et c'est le plus fréquemment retrouvé à l'état de valence +2 dans les organismes vivants (**Keen et Leach1988, Stokinger,1981**). Le corps humain contient de petites quantités de Mn et, dans des conditions normales, notre système homéostatique contrôle très bien les quantités présentes. La dose quotidienne recommandée est de 2500 à 5000 µg avec un taux d'absorption gastro-intestinal de l'ordre de 3 à 5% (**ATSDR 2000**).

2. Comportement dans l'environnement

2.1. Dans l'eau

Dans l'eau, la métabolisation du manganèse est favorisée par un potentiel redox faible et/ou un pH acide (**INERIS, 2007**). Le principal anion associé avec le manganèse est le carbonate. La concentration en manganèse est donc limitée par la relativement faible solubilité de $MnCO_3$ (**ATSDR, 2000**).

Les différents dérivés du manganèse, y compris les dérivés organiques comme le manèbe et le mancozèbe, sont le plus transportés sur les matières en suspension dans l'eau et les sédiments (**HSDB, 2007 ; INRIS, 2007**).

2.2. Dans les sols

Le manganèse et ses dérivés sont fortement retenus dans les sols, soit des réactions d'échanges de cations (les ions manganèse réagissent avec les composés chimiques présents à la surface de sol et forment de oxydes, des hydroxydes et des oxyhydroxydes de manganèse), soit par des réactions d'échanges de ligands (le manganèse est alors adsorbé sur d'autres oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes). Quand les eaux des sols se saturent sous forme d'oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes de manganèse, ceux-ci laquelle d'autres substances pourront s'adsorber (**ATSDR, 2000**).

Dans les sols, il existe un équilibre entre les formes divalentes et trivalentes du manganèse : le manganèse divalent est transformé par oxydation biologique en une forme trivalente, elle-même réduite biologiquement en manganèse divalent (**INRIS, 2007**).

3. Applications industrielles

Le Mn et certains de ses composés sont utilisés dans des différents procédés industriels. Les formes les plus courantes sont le Mn métallique, le Mn^{+2} , Mn^{+3} et Mn^{+4} retrouvés principalement sous forme de $MnCl_2$, $MnSO_4$, $MnPO_4$, MnO_2 et Mn_3O_4 . Sous forme d'alliages avec différents métaux, principalement le fer, le Mn confère à ces produits une dureté accrue. Le chlorure de manganèse est utilisé comme catalyseur mais aussi comme supplément alimentaire animal. Le dioxyde de manganèse de même que le chlorure entrent tous deux dans la fabrication des piles sèches. Le dioxyde de Mn trouve aussi plusieurs autres applications : feux d'artifice, allumettes et porcelaine. Le sulfate de Mn sert de fertilisant, dans la céramique, les glaçures et les vernis, comme supplément alimentaire ainsi que comme fongicide (**ACGIH, 2001**). Les composés organiques du Mn ont trois principales utilisations : le MMT comme additif antidétonant dans l'essence, le maneb et le mancozebdeux pesticides, utilisés dans le diagnostic de certaines formes de cancers hépatiques. (**ATSDR, 2000 ; ACGIH, 2001**). Le manganèse est l'élément qui offre le plus de valence, c'est pourquoi il existe sous de nombreuses formes pour diverses applications. Son utilisation dans le domaine de la chimie correspond à près de 10% de sa production.

3.1. Les piles

Une pile est une source d'énergie électrique obtenue par transformation d'énergie chimique. Celle-ci est libérée par le contact d'électrodes (ou de couples électrochimiques) dans un milieu chimique propice (les électrolytes). Selon les matériaux qui constituent l'électrolyte, les piles se différencient entre les piles salines, alcalines, les accumulateurs (ou piles rechargeables) (Sénat, 2008). Les piles peuvent être recyclées de deux manières (Sénat, 2008) :

- ✓ Par hydrométallurgie, méthode qui consiste à séparer les éléments par broyage pour traiter de façon chimique la solution obtenue et pour récupérer les métaux non ferreux contenus dans les piles.
- ✓ Par traitement thermique, où, après préparation par traitement mécanique (broyage...), la matière est chauffée à haute température. Les métaux, qui ont des points d'évaporation différents, sont récupérés grâce à des systèmes de condensation et de lavage de gaz.

La pile saline, nommée aussi pile sèche ou pile Leclanché (conçu en 1866 par l'ingénieur physicien Georges Leclanché), c'est la première génération des piles électriques modernes. Elle tient son appellation de la solution saline, du chlorure d'ammonium, qu'elle utilise de conducteur d'électrons, lors de la réaction d'oxydoréduction déclenchée grâce à deux électrodes, la borne positive et la borne négative. Elle se compose de :

- **L'anode** représente la borne négative, elle est constituée d'un godet en zinc pur.
- **La cathode** sert de borne positive, elle est formée d'une tige de graphite entourée d'un compound de poudre noire d'acétylène et de dioxyde de manganèse, le tout fut plongé dans un électrolyte en gel salin ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{ZnCl}_2$). Les électrons circulent de l'anode à la cathode, créant un courant électrique qui produit l'énergie nécessaire pour alimenter l'appareil.
- **Le séparateur** doit en effet permettre les échanges d'ions entre les deux électrodes, qui se font par l'intermédiaire de l'électrolyte qui l'imbibe, et qui sont nécessaires pour le déroulement des réactions électrochimiques aux électrodes.

La pile saline débite un courant de 1,5 V, s'adaptant aux appareils à intensité réduite et à usage intermittent, comme les lampes de poches, télécommandes, réveils, sonneries, etc...

Ce type de pile s'avère très pratique car il n'exige aucun entretien, il est peu coûteux ou le moins cher sur le marché, par rapport aux autres types de pile (alcaline ou lithium). Ses inconvénients sont reliés à sa faible durée de vie et sa performance limitée. Elle se décharge de manière régulière en à peu près 20 à 25 heures, soit deux fois plus vite qu'une pile alcaline. Par ailleurs, elle n'est pas rechargeable donc elle peut au final se révéler moins économique puisqu'il faut en racheter plus souvent. Enfin, la consommation périodique de cette pile engendre l'accroissement des déchets nocifs pour l'environnement (David Linden, Thomas B.2002 ;H. Mekhalfi, N. Chelali et al, 2015).

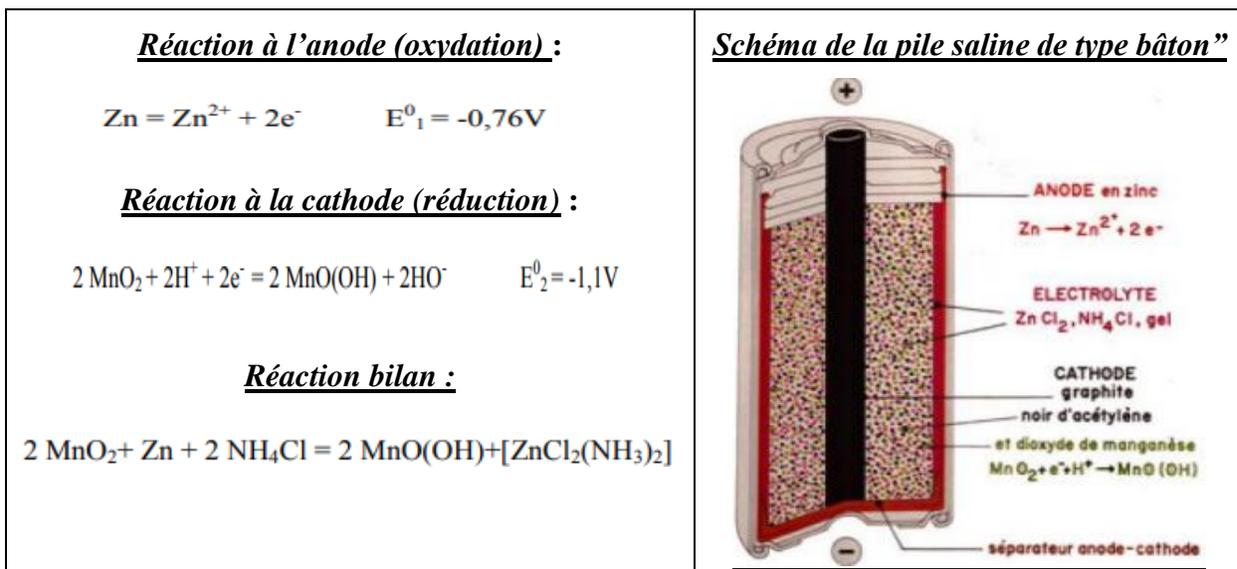


Figure1 : schéma et réactions électrochimiques d'une pile saline (Zn/MnO₂) (H. Mekhalfi, N. Chelali et al, 2015)

4. Mécanismes d'action du manganèse

Le manganèse est un élément essentiel à la vie des humains et des animaux ; il joue un rôle de premier plan dans la constitution d'enzymes et de métalloenzymes. Nous avons souligné son rôle dans le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des stérols et dans la phosphorylation oxydative. (Zidenberg-Cherr, et al. p. 56 ,1987). L'excès de manganèse peut provoquer :

4.1. Perturbation des systèmes de neurotransmetteurs

La majorité des études sur des animaux de laboratoire (rongeurs et primates) montrent que l'exposition au Mn entraîne une perturbation des voies dopaminergiques avec une

diminution du taux de dopamine et de sa liaison à ses récepteurs, et une dégénérescence des terminaisons nerveuses dopaminergiques (**Eriksson et al, 1992 ; Kobayashi et al, 2003**).

4.2. Altération des fonctions mitochondriales

Le Mn se concentre de façon spécifique dans les mitochondries dans lesquelles il serait probablement lié à l'ATP. Les tissus les plus riches en mitochondries présentent ainsi des teneurs en Mn supérieures aux autres tissus. L'excrétion du Mn hors de la mitochondrie suit en outre une cinétique très lente (**Gavin et al, 1990**). L'action cytotoxique du Mn serait alors due à un dysfonctionnement mitochondrial mais également du métabolisme énergétique. En effet, les résultats d'études *in vivo* et *in vitro* indiquent que le Mn serait capable d'inhiber la phosphorylation oxydative, entraînant ainsi un dysfonctionnement mitochondrial. Ce dysfonctionnement serait alors responsable d'anomalies métaboliques, notamment au niveau de la glycolyse et du cycle de Krebs (**Malthankar et al, 2004 ; Zwingmann et al, 2004**).

4.3. Induction de stress oxydatif

L'impact du Mn sur le stress oxydatif est très controversé. En effet, certaines études affirment que l'exposition au Mn entraîne la production de ROS et pourrait altérer les systèmes antioxydants dans des structures comme le striatum et l'hippocampe (**Dobson et al, 2003 ; Erikson et al, 2005**). D'autres suggèrent que le Mn favoriserait le stress oxydatif en entraînant une diminution du glutathion et de la glutathion peroxydase. (**Sidoryk et al, 2013**).

5. Les effets du manganèse et ses dérivés sur la santé humaine

Il est établi qu'une exposition excessive au manganèse altère plusieurs systèmes organiques chez l'être humain, le plus sensible d'entre eux étant le système nerveux central, mais sont aussi touchés les appareils respiratoires, reproducteur et cardiaque. Une exposition chronique à des concentrations très élevées de manganèse (généralement plusieurs mg/m³ par inhalation), quelle que soit la voie d'exposition, peut causer une grave maladie neurologique clinique appelée « manganisme » ou parkinsonisme induit par le manganèse (**Pal et coll, 1999 ; Ostiguy et coll, 2003 ; Olanow, 2004**).

Rappelons que l'on connaît peu la toxicité relative des différents composés de Mn mais le Mn inhalé tend à produire des effets toxiques plus sévères que le Mn ingéré. Ceci est probablement attribuable au taux d'absorption très différent selon la voie d'entrée : 3 à 5% pour

la voie gastro-intestinales (**Davidsson et al. 1988, 1989a et 1989b ; Mena et al, 1969**) et près de 100% pour la voie pulmonaire au niveau des alvéoles.

6. Toxicocinétique du manganèse

L'absorption du manganèse se produit principalement au niveau du système gastro-intestinal après ingestion ou des alvéoles pulmonaires après inhalation. L'absorption par la voie gastrointestinale est de l'ordre de 3 à 5% seulement (**Mena et al.1969 ; Davidsson et al. 1988; Oberdoerster 1988; EPA 1995b et 1995c**).

Le manganèse absorbé par voie gastro-intestinale est séquestré par le foie. La majeure partie est excrétée par voie biliaire et est susceptible de subir un cycle entérohépatique. (**ATSDR 2000**).

Le Mn est un constituant normal de tout tissu et fluide humain et animal. Chez l'homme, la concentration dans la plupart des tissus est de l'ordre de 0,1 à 1 µg Mn/g de poids humide (**Sumino et al. 1975**). Une fois absorbé, le Mn est transporté vers les organes riches en mitochondries où il est rapidement concentré son métabolisme chez l'homme est rigoureusement contrôlé par des mécanismes d'homéostasie qui s'exercent principalement sur l'absorption gastro-intestinale et l'excrétion. (**ATSDR 2000**).

Indépendamment de l'absorption de Mn, le système homéostatique maintient généralement un niveau de concentration stable en régulant l'excrétion (**US EPA 1984a et 1984b**). Une réserve de l'ordre de 20 mg de Mn est normalement conservée dans le foie et l'excès est excrété dans l'intestin via la bile. De petites quantités sont aussi excrétées dans l'urine, les phanères et la transpiration (**EPA 1993**).

7. Intoxications aiguës et chroniques au manganèse

Une exposition aiguë au Mn induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques selon de récentes études (**Bowman et al, 2012**).

L'exposition aiguë au manganèse est responsable de divers syndromes pulmonaires : fièvre des métaux, pneumonie au manganèse. Les manifestations cliniques débutent par une sensation de sécheresse et gout métallique dans la bouche. Puis survient une fièvre, des sueurs, des nausées, une irritation oropharyngée, une toux, des myalgies, des arthralgies, des céphalées. Ces signes se manifestent plusieurs heures après l'exposition. Ces symptômes régressent aux environs de 36 h après l'arrêt de l'exposition (**Lesser et Weiss, 1995**).

La pneumonie au manganèse a été décrite dans l'industrie minière, les usines de fabrication du permanganate de potassium ou de batteries sèches (**Rodier, 1955 ; Davies, 1946**). Il existe une atteinte directe de l'épithélium respiratoire et une action immunodépressive (**Davies, 1946**). La symptomatologie est caractérisée par une dyspnée et une fièvre, rarement accompagnée de toux. La radiographie pulmonaire montre des images de pneumonie ou d'hémorragie pulmonaire.

Trois cas d'intoxication aigue ont été décrits chez des personnes ayant épandu du manège dans des champs ou des jardins (**Koizumi et al., 1979 ; Israeli et al., 1983 ; de Carvalho et al., 1989**).

L'exposition chronique à des doses élevées de Mn cause le « Manganisme » ou Parkinsonisme induit par le Mn. Celui-ci est dû à une neurodégénérescence touchant les ganglions cérébraux notamment le striatum et le globus pallidus. Il se manifeste par des troubles comportementaux avec irritabilité et agressivité, mais aussi par une expression clinique évoquant la maladie de Parkinson (MP) (bradykinésie, rigidité, troubles de l'écriture, troubles de l'élocution...) associée à des troubles de la démarche. L'atteinte est symétrique, il n'existe pas de tremblements de repos et la réponse à la Lévodopa est nulle, ce qui permet de différencier le Manganisme d'une MP à proprement parler. Le Manganisme n'est pas réversible et peut même progresser après l'arrêt de l'exposition au Mn (**Olanow, 2004 ; Santé Canada, 2010**).

L'exposition chronique à de plus faibles doses de Mn semble responsable de manifestations subcliniques telles que troubles moteurs, troubles de la mémoire à court terme et des fonctions cognitives. De nombreuses études rapportent également la présence de symptômes généraux aspécifiques tels qu'asthénie, troubles de l'humeur et troubles du sommeil chez les travailleurs exposés (**Santé Canada, 2010 ; Myers et al, 2003**).

8. Traitement de l'intoxication

8.1. Traitement humain

Le traitement de base actuel de l'intoxication au manganèse est la lévodopa et la chélation par l'EDTA, deux méthodes qui ont - au mieux - une efficacité limitée et transitoire.

- la réponse au traitement diminue au bout de 2 ou 3 ans (**Huang CC et al, 1993**), avec une aggravation des symptômes des mêmes patients observée jusqu'à dix ans après la dernière exposition au manganèse (**Huang CC et al, 1998**).

• L'augmentation de l'excrétion du manganèse initiée par la chélation abaisse le taux sanguin, mais les symptômes demeurent largement inchangés, ce qui pose des questions sur l'efficacité réelle de cette forme de traitement (**Ono K, Komai K et al, 2002**).

8.2. Traitement des eaux

Outre le manganèse présent dans les ressources en eau, des éléments en contenant peuvent être employés pour la production des EDCH. (**Santé Canada, 2016**).

Les traitements permettant de réduire les teneurs en manganèse dans les eaux sont essentiellement des traitements d'oxydation permettant de le faire passer de l'état dissous (divalent) en précipité sous forme tri ou tétravalente. Les précipités formés peuvent être des colloïdes négatifs très stables (quelques mois à pH neutre).

Le traitement doit être étudié en fonction des autres espèces présentes (fer et ion ammonium notamment). :

a. Oxydation suivie de filtration

L'oxydation du Mn II peut thermodynamiquement conduire à la formation de trois oxydes solides différents (Mn_2O_3 , Mn_3O_4 et majoritairement MnO_2), souvent désignés $MnOx(s)$ (**Brandhuber et al, 2013**). Une oxydation par des oxydants très forts (O_3 , HO) peut conduire à la formation de MnO_4^- .

b. Oxydation par l'ozone

L'ozone est un oxydant très puissant qui permet une décomplexation du Mn II complexé à la matière organique d'origine naturelle puis une oxydation très rapide du Mn II en MnO_2 . La stœchiométrie théorique est de 0,87 mg d'ozone par mg de manganèse mais il faut en général des doses de traitement de 3 à 4 fois la stœchiométrie, car l'ozone est aussi consommé par la matière organique. La contribution de l'ozone moléculaire à l'oxydation du Mn II est favorisée à pH plus acide ou lorsque l'alcalinité de l'eau augmente, car ces conditions limitent les réactions radicalaires non sélectives par les radicaux hydroxyles. Un surdosage d'ozone peut entraîner la formation d'ions permanganate. (**Avis de l'Anses Saisine n°2016**).

c. Oxydation par le permanganate de potassium

Le permanganate de potassium est en pratique le réactif oxydant le plus utilisé en démanigantisation physico-chimique. Le pH joue un grand rôle sur la cinétique. La stœchiométrie théorique de la réaction est de 1,92 mg de KMnO_4 par mg de Mn^{2+} . En pratique, elle varie avec le pH et la composition de l'eau. En effet, une partie du permanganate participe à l'oxydation de certaines matières organiques réductrices présentes dans l'eau. L'oxydation est rapide pour des pH supérieurs à 7,3. Si le manganèse est complexé avec des matières organiques, la cinétique de réaction est plus lente et le temps de contact doit être au minimum de 20 min. La dose de KMnO_4 doit être optimisée afin de ne pas générer une coloration rose de l'eau traitée due à un excès de réactif. (**Avis de l'Anses Saisine n°2016**).

Chapitre II

1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre transitoire est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso et al, 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire, elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko et al, 2007).

Tableau I : Les différents types d'espèces réactives (Fontaine, 2007)

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxide	$O_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Acide hypochlorique	HOCl
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Oxygène singulet	1O_2
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Peroxy nitrite	ONOO $^{\cdot}$

2. Stress oxydant

Le stress oxydatif est un état caractérisé par un déséquilibre entre la production d'éléments oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme d'un individu, ou un excès d'espèces réactives mal contrôlé (Betteridge, 2000).

Différentes situations de déséquilibre de cette balance peuvent être observées suite à une situation d'agression intenses et prolongées de l'organisme, dans ce cas, la production d'ERO est supérieure à la capacité anti oxydante, le déséquilibre prolongé conduit à une situation de stress oxydant (Durant et al, 2013). Le stress oxydant est à l'origine de nombreuses pathologies tel que le diabète, l'œdème pulmonaire et l'Alzheimer (Atawodi, 2005).

3. Les antioxydants

Le terme d'antioxydant désigne toutes substances qui présentent à faibles concentration la capacité de retarder ou inhiber significativement l'oxydation d'un substrat (**Sathiya et al, 2015**).

Ils sont produits dans l'organisme(endogène) ou apportés par des aliments(exogènes) (**Park et al, 2001**).

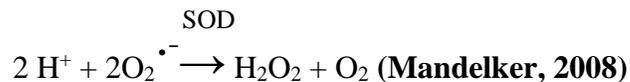
3.1. Système de défense

Pour piéger les ERO, la cellule dispose d'un arsenal de défenses antioxydants, à la fois endogène par le biais des systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase,) et exogène en utilisant des composés alimentaires (vitamine C, vitamine E, flavonoïdes, caroténoïdes, etc.) (**Friguet, 2003**).

3.1.1. Systèmes enzymatiques

Il existe trois principales enzymes qui ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (**Ichai et al, 2011**).

- **La superoxyde dismutase** : La SOD, une métalloprotéine, est la première enzyme de désintoxication qui catalyse la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. (**Ahmad et al, 2008; Gill and Tuteja, 2010; Karuppanapandian et al,2011**).



La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). (**Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001 ; Sturtz et al, 2001**).

- **La catalase** : La catalase est présente dans un grand nombre de tissus mais elle est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Parmi les enzymes connus

c'est l'un des plus efficaces. Elle catabolise les peroxydes d'hydrogènes en molécules d'eau pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Matés et al,1999).



- **La glutathion peroxydase :** La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH respectivement en eau et alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH. En fait la forme réduite du glutathion (GSH) est le régulateur majeur du redox intracellulaire et se trouve en abondance dans les cellules (Meister and Anderson, 1983).

Le glutathion agit comme un capteur direct des radicaux libres, un co-substrat pour l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, co-facteur de plusieurs autres enzymes, et forme des conjugués dans des réactions d'endo- xénobiotiques et de xénobiotiques (Gregus et al, 1996). En réalité 2 molécules de GSH sont nécessaires et formeront la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfite GSSG.



3.1.2. Systèmes non enzymatiques

Il existe différents mécanismes de défense antioxydant non enzymatique qui peuvent être produits par l'organisme (endogène) tel que le glutathion, l'acide urique et la bilirubine ; ou bien apporté par l'alimentation (exogène) comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols (Berger, 2006 ; Karou et al, 2005).

4. Les Composés phénoliques

Les Composés phénoliques (CP) correspondent à une grande variété de substances possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle libre, la grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate

(Ferrazzano et al, 2011). Les composés phénoliques également appelés les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal (Charles, 2013).

Les polyphénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydantes, les plus importants sont les flavonoïdes (Médart, 2009). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène O_2 et le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en le dismutant en H_2O_2 (Chen et al, 2003).

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Guignard, 1996).

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) correspondant à la structure du diphenylpropane (Collin & Crouzet, 2011). Ils sont constitués d'un cycle benzoïque présentant plusieurs groupements hydroxyles et pour cette raison ils sont nommés polyphénols. Ces groupements hydroxyles sont responsables de la fonction antioxydante des polyphénols (Descheemaeker & provoost, 1999).

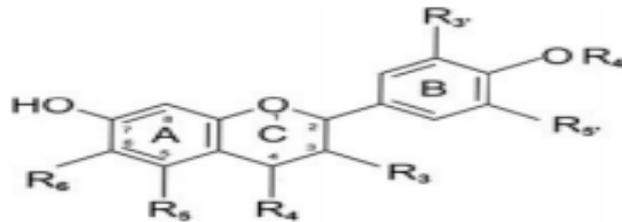


Figure2 : Structure de base des flavonoïdes (Vania et al, 2014).

5. Modèles d'étude du stress oxydant

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension du processus pathologique du stress oxydatif chez l'homme, les scientifiques optent toujours à développer de nouvelles approches expérimentales. Ces différents modèles impliquent en général : des animaux ou des cultures cellulaires, l'utilisation d'organes isolés, d'organes ou de cellules isolées, aussi que l'utilisation de primates et même d'êtres humains dans certaines conditions. Dans notre travail, on souligne un modèle cellulaire unique, à savoir le globule rouge en raison de sa structure membranaire (composée du cytoplasme et de la membrane d'hémoglobine) et de ses caractéristiques fonctionnelles.

5.1. Les érythrocytes

5.1.1. Définition

L'érythrocyte, hématie ou globule rouge (GR) est une cellule anucléée unique, avec un cytoplasme se composant de 95% d'hémoglobine. Cette cellule présente de nombreuses propriétés attribuables aux protéines et aux lipides de la membrane, et hautement spécialisée pour le transport des complexes d'oxygène à partir des poumons au reste du corps (**Girasolet al, 2012 ; Kozlova et al, 2012**). Leur durée de vie est de 120 jours, au cours desquels ils effectuent un déplacement de près de 500 km dans la microcirculation (**Guilaum, 2007**).

TableauII : Composition de la membrane de l'érythrocyte

Domaine lipidique			Cytosquelette
Nature	Composition	Localisation	Le cytosquelette érythrocytaire se compose de plusieurs protéines qui forment un réseau filamenteux sous la bicouche lipidique. Le réseau est composé de spectrine, Ankyrine et actine. Les protéines de cytosquelette interagissent avec les protéines intégrales et les lipides de la bicouche pour maintenir l'intégrité de la membrane (Lux, 1983)
Lipides	Cholestérol	Entre les deux moitiés ou feuillet de bicouche lipidique (Bretscher et al, 1972 ; Gordesky et al, 1973)	
	Phospholipides	Asymétriquement distribuée (Bretscher et al, 1972 ; Gordesky et al, 1973).	
	Glycolipides, Phosphatidylcholine, Sphingomyélines	Dans la moitié externe de la bicouche lipidique (Borochovet al, 1977).	
	Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine	Dans la couche intérieure faisant face au cytoplasme (Borochovet al, 1977).	

<p>Protéines</p>	<p>Récepteurs, Transporteurs et Enzymes.</p>	<p>S'étend depuis l'intérieure de l'érythrocyte vers l'extérieur (Steck et al, 1974).</p>	
-------------------------	--	---	--

5.1.2. La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère un nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous membranaire. Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du globule des déterminants des groupes sanguins, le cytosquelette comprend plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine et l'actine (**Manaargadoo-catin et al, 2016**).

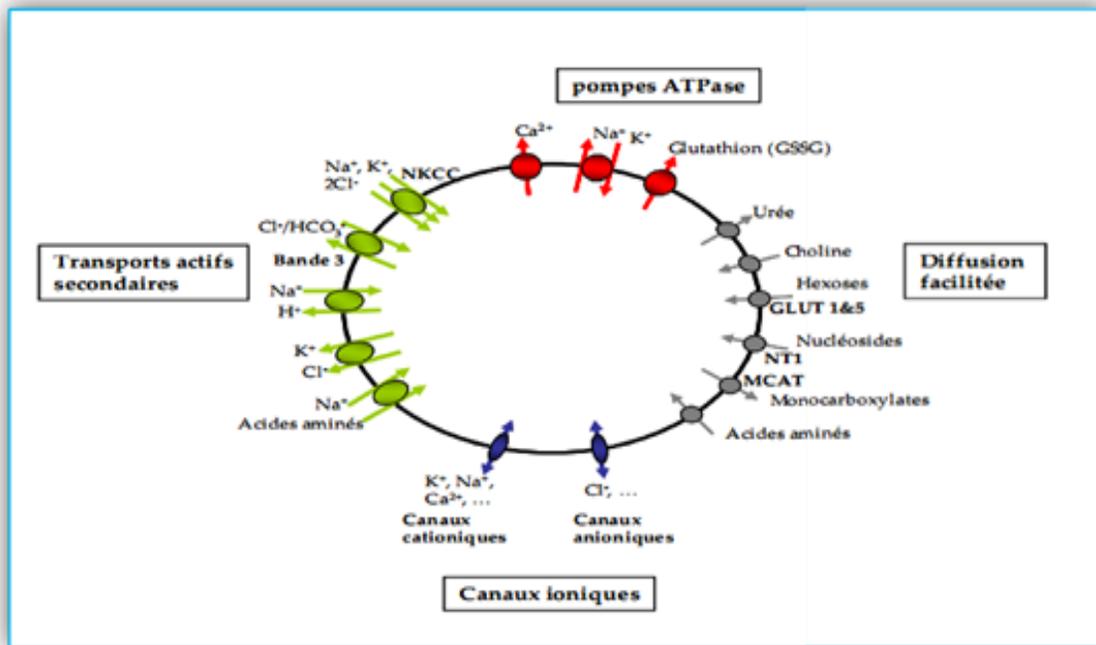


Figure3 : Structure de la membrane érythrocytaire (**Jauréguiberry, 2015**).

5.2. L'hémolyse

Par définition, l'hémolyse désigne le processus visant la destruction de la membrane érythrocytaire provoquant la libération d'hémoglobine (Hb) et d'autres composants associés aux dommages causés par le (RBC) dans le plasma (**Kalaiselvi et Vidhya, 2015**), si elles ne sont pas neutralisées par les mécanismes de protection innés elles ont le potentiel d'activer de multiples voies inflammatoires. Le modèle qui est capable d'activer les voies d'inflammation convergentes telles que la signalisation des récepteurs de péage, la formation de piège extracellulaire des neutrophiles. D'autres molécules puissantes qui peuvent être libérées par le GR lors de sa rupture comprennent les protéines de choc (HSP), l'interleukine-33 et le triphosphate d'adénosine 5' (**Mondonça et Silveira, 2016**).

5.3. Les érythrocytes et stress oxydant

Dans la plupart des cellules, les mitochondries sont la principale source des radicaux libres (**Johnson et al, 2005**). Malgré l'absence de mitochondries dans les globules rouges, les radicaux libres sont produits en continu et cela étant dû à la tension élevée d'O₂ dans le sang artériel, ainsi que sa teneur abondante en fer hémique (**Baynes, 2005**). L'une des principales sources des radicaux libres dans les érythrocytes est l'Hb qui subit une autooxydation pour produire de l'O₂^{•-} et de la méthémoglobine (metHb). Cette protéine devient incapable de lier ou de transporter l'O₂ (**Johnson et al, 2005**). En raison de son rôle de transporteur d'O₂ et de CO₂. Le globule rouge, par sa fonction de transport d'oxygène est soumis à des milieux où le stress oxydant est important (**Portier et al, 2007**).

Bien que le stress oxydatif puisse endommager les globules rouges elles-mêmes, l'effet de masse de grandes quantités des radicaux libres qui quittent les globules ont un énorme potentiel d'endommager d'autres composants de la circulation (**Johnson et al, 2005**). La richesse de la membrane cellulaire en acides gras polyinsaturés la rend cible à l'attaque des radicaux oxydants. Ainsi, l'oxydation enzymatique spécifique de ces acides gras conduit à la formation des composés importants tels que les prostaglandines et les leucotriènes. En revanche, leur oxydation non spécifique peut conduire à une peroxydation lipidique (**Cheesman et Slater, 1993 ; Al-Omar et al, 2004**). Celle-ci entraîne la perte d'intégrité de la membrane et la mort cellulaire (**Baynes, 2005**).

Partie Expérimentale

Chapitre III

1. Matériels

1.1. Echantillons

1.1.1. Oxyde de manganèse

Le manganèse est un élément chimique réactif, présent majoritairement sous forme ionique Mn^{2+} très mobile, ou sous forme oxydée (trivalent et tétravalent, pentavalent, hexavalent et heptavalent). (chalmin, 2003).

1.1.2. Matériels végétaux

Pour le matériel végétal, nous avons utilisé deux plantes médicinales à savoir *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus* :

a. *Globularia alypum*

Globularia alypum est une plante caractéristique des régions méditerranéennes, elle a été récoltée de Mansoura, commune de la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

La plante *Globularia alypum*, autrement appelée Globulaire, est une plante classique appartenant à la famille des Globulariacées comprend deux genres dont *Globularia* et *Poskea* et d'environ trente espèces répartis en Europe et en Afrique du nord (Quezel et Santa, 1963).

Les espèces de *Globularia*, sont des arbustes ayant des rameaux d'environ de 60 cm de hauteur (30-60cm), à feuilles alternes, dont les fleurs groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées (Leporatti et Ghedira, 2009).



Figure 4 : Photo du plante *Globularia alypum* (Inventaire National du Patrimoine Naturel INPN)

b. *Juniperus oxycedrus*

Le genévrier (*juniperus*) est une espèce originaire de la région méditerranéenne elle a été récoltée de Mansoura, commune de la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

Elle appartient à la famille Cuprèssacées genre *juniperus* espèce *Juniperus oxycedrus*. L'espèce de *juniperus* est un arbuste ou un arbrisseau d'un vert glauque pouvant atteindre 14 mètres, mais dont les dimensions sont en général beaucoup plus modestes (1 à 9 mètres, parfois moins). Les fruits sont bruns rouges à maturité, de 6 à 9mm.



Figure 5 : Photo du plante *Juniperus oxycedrus*

1.1.3. Sang

Les expériences ont été réalisées sur du sang humain frais. Les prélèvements sanguins ont été réalisés par un personnel médical de laboratoire Sebti de la Wilaya de Bordj Bou Arreridj.



Figure 6 : Echantillons de sang

1.2. Réactifs et standards

Les produits chimiques utilisés sont les suivants : Folin-Ciocalteu (FC), carbonate de sodium (Na_2CO_3), acide gallique, quercétine, acide ascorbique, chlorure de sodium (NaCl), éthanol, formol, acide sulfurique, NaOH , acétone.

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'oxyde de manganèse

Deux piles de marque ZAIBA R20, l'une d'elles est toute neuve, l'autre a subi une décharge totale (fem=à 0.9V) (**figure7**), en suite elles sont démontées, séchées et broyées. Nous avons mis notre échantillon dans l'agitateur avec de l'eau distillée (pour séparer l'oxyde de manganèse de charbon noir), en ajoutant de l'éthanol + méthanol + acétone ; ensuite nous avons mesuré le pH des solutions.



Figure 7 : Photo représente les deux piles (déchargé et neuve)

Mode opératoire

Dissoudre 5 g de (MnO_2 / MnOOH) dans 50 ml d'acide sulfurique $\text{H}_2\text{SO}_4(0.01\text{N})$. Le mélange est ensuite agité pendant 10min à une température de 30°C puis incubé pendant 30min. Filtrer le mélange et récupérer le précipitant et le sécher ensuite peser le résidu sur une balance de précision puis transvaser tout le volume du filtrat (solution1) dans un Erlenmeyer. Ajouter 100ml d'eau distillée à la (solution1) et mesurer le PH. Ramener le PH de la (solution1) à 6.5 en ajoutant goutte à goutte une solution NaOH (0.1N).

2.2. Evaluation du taux d'humidité

Pour déterminer la teneur en eau de *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus*. Peser 5g de chaque plante dans 3 creusets et sécher à 105°C à l'étuve ; la diminution du poids est suivie par pesée après 3 heures, 5 heures et 24 heures.

Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

H (%) : Taux d'humidité en pourcentage.

P_i : Poids initial de l'échantillon avant mise à l'étuve en gramme.

P_f : Poids final de l'échantillon après mise à l'étuve en gramme.

2.3. Extraction des plantes

Globularia alypum et *juniperus oxycedrus* ont été récoltées au mois de février 2019, la partie aérienne a été séchée, nettoyée, les feuilles finement broyées puis mélangées à 5g en poudre de chaque plante dans 100 ml d'éthanol et 5g dans 100 ml d'eau physiologique (eau distillée + NaCl 0.9g/ 100ml). L'extraction a duré pendant 24 heures puis filtrée les solutions pour récupérer les extraits, ensuite on les amis dans l'étuve pour le séchage à 40°C. L'opération a été répétée trois fois afin de calculer le rendement.

$$\% \text{ de rendement} = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

P_f : le poids final de la solution après séchage dans l'étuve

P_i : Le poids initial de la solution avant séchage dans l'étuve

2.4. Dosage des phénols totaux

Principe de la méthode

La teneur en phénols totaux dans les extraits de *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus* a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu avec quelques modifications (Beretta *et al*, 2005). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀).

L'intensité de la couleur produite, dont l'absorbance maximale est à 765 nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits (Ghazi et Sahraoui, 2005).

Mode opératoire

Un aliquote de 200 μ l de chaque extrait de plante est introduit dans un tube à essai, auquel un volume de 500 μ l du réactif de Folin (à 10%) est ajouté. L'ensemble est soigneusement mélangé et incubé à l'abri de la lumière pendant 5 min à température ambiante. Un volume de 1500 μ l de carbonate de sodium (7.5%) est additionné au mélange.

Le mélange réactionnel est ensuite agité puis incubé pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1mg/ml). Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait en utilisant l'équation de la régression linéaire du droit d'étalonnage du standard ($y=ax+b$).

2.5. Etude de l'activité antioxydant et anti-hémolytique des extraits de *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus*

2.5.1. Préparation du sang isotonique

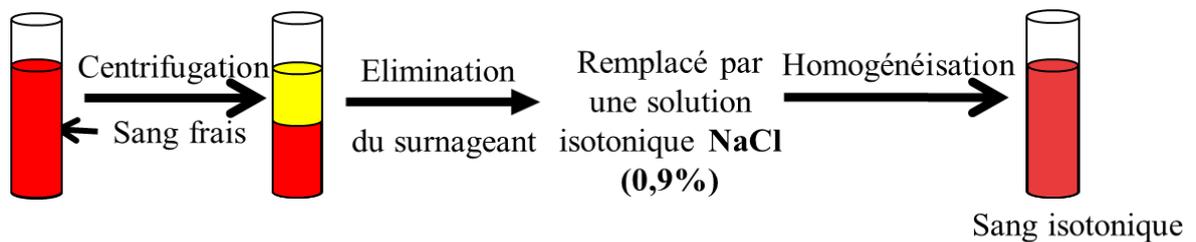


Figure 8 : Préparation du sang isotonique

Le sang recueilli est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min pour éliminer le surnageant (Contenant du plasma, des plaquettes et des leucocytes) puis l'ajout d'une solution isotonique de NaCl à 0,9 % au culot récupérée (**Figure8**).

2.5.2. Mesure de la turbidité cellulaire

Les différents échantillons à analyser sont préparés à partir du sang isotonique (sang Centrifugé et dont le plasma est remplacé par une solution isotonique (NaCl à 0.9%)) (**Figure9**).

- Le tube A contient du sang isotonique et une solution isotonique (Témoin négatif : non oxydé par l' $MnO_2/MnOOH$).

- Le tube B contient 50% de sang isotonique et une solution isotonique (Témoin positif : oxydé par l' $\text{MnO}_2/\text{MnOOH}$).
- Le tube C renferme du sang isotonique et un antioxydant de référence (Quercétine 20mmol/l).
- Le tube D renferme du sang isotonique et un antioxydant de référence (Vit C à 20mmol/l).
- Le tube E contient du sang isotonique et l'extrait du *Globularia alypum* (2 mg/ml).
- Le tube F contient du sang isotonique et l'extrait du *Juniperus oxycedrus* (2 mg/ml).

Les érythrocytes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 30 min. Puis un volume de 800µl d' $\text{MnO}_2/\text{MnOOH}$ à l'exception du témoin négatif auquel on a ajouté une solution isotonique (NaCl à 0.9%) incubé pendant 1 heure. **(Figure9)**.

Mode opératoire

Un volume de 100 µl est prélevé de chaque tube auquel sont ajoutés 200 µl d'une solution hypotonique NaCl (0.7%), après 15 min on ajoute 100 µl de formol (0.4%) pour fixer les hématies, ensuite on prélève 100 µl du mélange qu'on dilue 40 fois pour faire la lecture à 620nm. Chaque échantillon est ensuite centrifugé (2000rpm/3 min) pour récupérer le surnageant et doser son hémoglobine libérée.

2.5.3. Dosage de l'hémoglobine libérée

L'hémoglobine libérée a été dosée par spectrophotométrie à 412 nm (bande de Soret). Le dosage de l'hémoglobine après incubation dans un milieu hypotonique permet de déterminer d'une manière indirecte la proportion d'hématies lysées. Ce procédé simple, rapide et très sensible remplace la méthode lourde, longue et peu sensible de Drabkin (**Mitrofan-Oprea et al, 2007**).

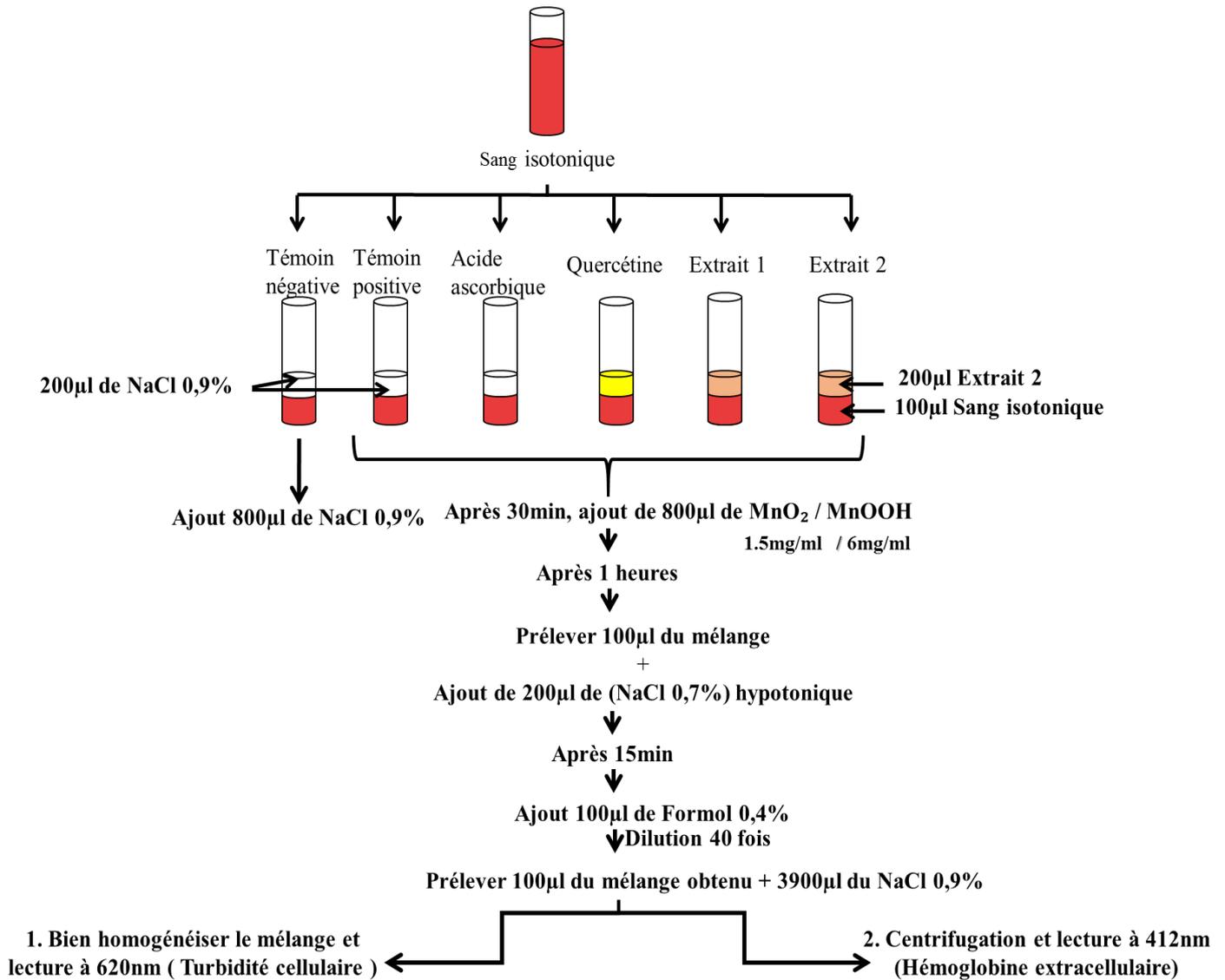


Figure 9 : Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité hémolytique.

3. Analyse statistique

L'étude statistique est faite dans le but de comparer les moyennes des résultats obtenus par l'analyse de la variance (ANOVA, test T) en utilisant le logiciel STATVIEW version 5.5. Le seuil de signification est pris à $P < 0.05$.

Chapitre IV

1. Evaluation du taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité d'une plante est très importante pour prévoir le rendement après séchage.

Les teneurs en eau des deux plantes étudiées à savoir *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus* sont données sur la **figure 10**, elles sont exprimées en pourcentage (%).

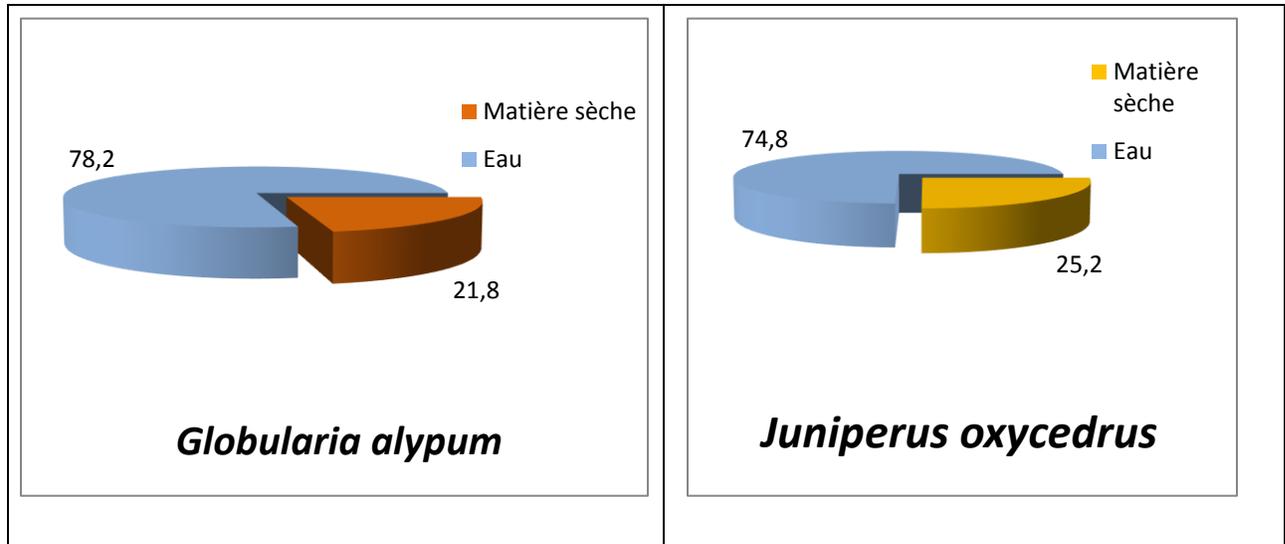


Figure10 : Taux d'humidité de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus*

Il apparaît clairement sur la figure que la teneur en eau de *Globularia alypum* est légèrement supérieure (78.2%) à celle de *Juniperus oxycedrus* (74.8%), ce qui signifie que le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction des extraits est de 21.8% et 25.2%, respectivement.

Bouyahyaoui et ses collaborateurs, (2016), ont étudié la teneur en humidité sur l'espèce *Juniperus*, qui a été récoltée au sud-ouest de l'Algérie et plus précisément dans les montagnes de l'Atlas saharien à Naâma, ils ont trouvé qu'elle est de 41.9%. Nous pouvons remarquer que cette teneur est largement inférieure à ce que nous avons trouvé (74.8%), ceci est probablement dû à la zone géographique, au climat et à la méthode d'extraction.

2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des deux plantes est représenté sur la **Figure 11**. Il est exprimé en pourcentage (%) du rapport (g de d'extrait / ml de solvant d'extraction).

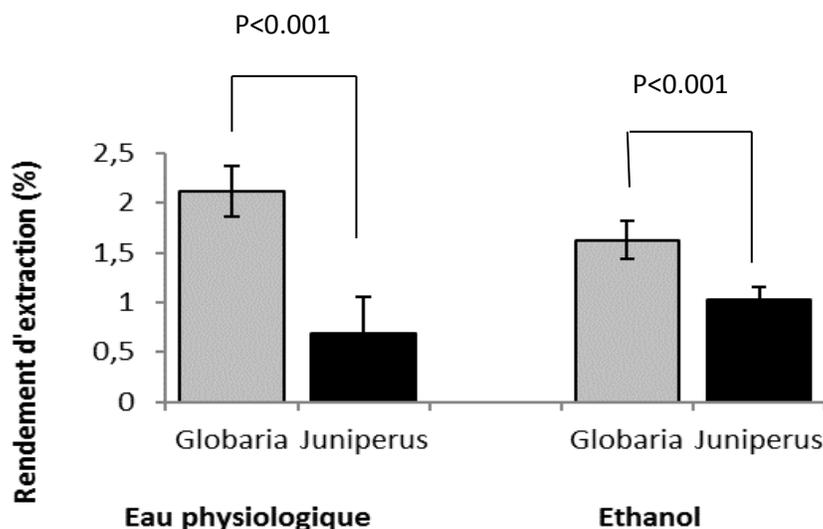


Figure 11 : Rendement d'extraction de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus*

Le rendement d'extraction de *Globularia alypum* (42.4%) est largement supérieur à celui de *Juniperus oxycedrus* (13.46%) lorsqu'on utilise l'eau physiologique comme solvant d'extraction ($P < 0.001$). De même pour le rendement d'extraction éthanolique de *Globularia alypum* (32.53%) qui est supérieur à celui de *Juniperus oxycedrus* (20.6%), ($P < 0.001$).

Ces variations des rendements d'extraction peuvent être attribuées à la différence de solubilité des composés phénoliques dans le solvant d'extraction, à leur degré de polymérisation ou à leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi des complexes insolubles (Cacace et Mazza, 2002).

3. Teneur en phénol totaux

Les teneurs en phénols totaux des deux plantes analysées sont représentées sur la **Figure 12**, elles sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique/g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

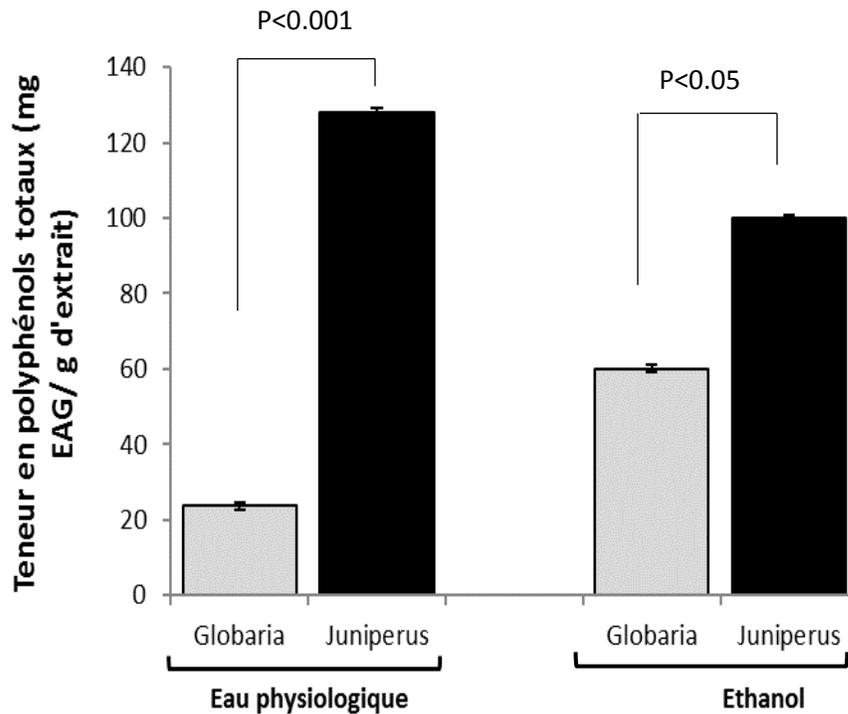


Figure 12 : Teneur en polyphénols totaux de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus*

D'après les résultats de la figure, nous pouvons voir que l'extrait aqueux de *Juniperus oxycedrus* a une teneur très élevée en polyphénols ($128,09 \pm 7,06$ mg EAG/g d'extrait) que celle de *Globularia alypum* ($23,70 \pm 3,43$ mg EAG/g d'extrait), ($P < 0,001$). De même, l'extrait éthanolique de *Juniperus oxycedrus* présente des valeurs supérieures ($99,90 \pm 7,43$ mg EAG/g d'extrait) par rapport à celles de *Globularia alypum* ($60,13 \pm 13,09$ mg EAG/g d'extrait), ($P < 0,05$).

En comparant ces résultats avec les études précédentes, les extraits aqueux et éthanolique de *Globularia alypum* montrent des teneurs inférieures à celles rapportées dans les littératures. Laila Smail et al. (2017) ont trouvé une teneur de $32,50 \pm 0,10$ mg EAG/g d'extrait aqueux. Linda Khantouche et ses collaborateurs (2018) ont trouvé une valeur très importante soit $180,5 \pm 2,1$ mg EAG/g d'extrait éthanolique.

Par contre les teneurs de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique de *Juniperus oxycedrus* sont supérieures à celle ($12,66$ mg EAG/g d'extrait) trouvée dans l'étude réalisée par Djeridane et al 2006.

Il est bien établi que différents paramètres peuvent influencer la teneur en composés phénolique ; soit la période et le lieu de récolte, le climat, les conditions géographiques, la méthode et le temps d'extraction, la solubilité et le type du solvant utilisé (Naczy et Shahidi, 2004).

4. Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus*

Dans la présente partie du travail, nous avons étudié l'effet des extraits de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus* sur les globules rouges en milieu hypotonique sous l'action de l'oxyde de manganèse et le manganite en utilisant uniquement les extraits obtenus par l'eau physiologique pour éviter l'effet toxique de l'éthanol sur les hématies.

4.1. Pile déchargée

4.1.1. Turbidité cellulaire

La **Figure 13** montre la turbidité cellulaire des échantillons témoins (témoin négatif et témoin positif) et les échantillons traités (acide ascorbique, quercétine, *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus*) par MnOOH déchargée.

Les valeurs de concentrations cellulaires du sang du témoin négatif (non oxydé par MnOOH) restent supérieures par rapport à celles du témoin positif, l'acide ascorbique et les extraits ($P < 0.01$).

Par contre les valeurs de concentration cellulaires des suspensions érythrocytaires traitées par la quercétine restent supérieures par rapport aux autres échantillons étudiés ($P < 0.01$). Toutefois, la suspension des globules rouges traitées par les extraits de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus* et en particulier l'extrait de *Globularia alypum* présente des valeurs de concentration plus élevées par rapport à celle de témoin positif ($P < 0.001$).

Les suspensions érythrocytaires non traitées (témoin positif) et celles traitées d'acide ascorbique semblent être les plus sensibles au milieu hypotonique, et à l'action du manganite MnOOH.

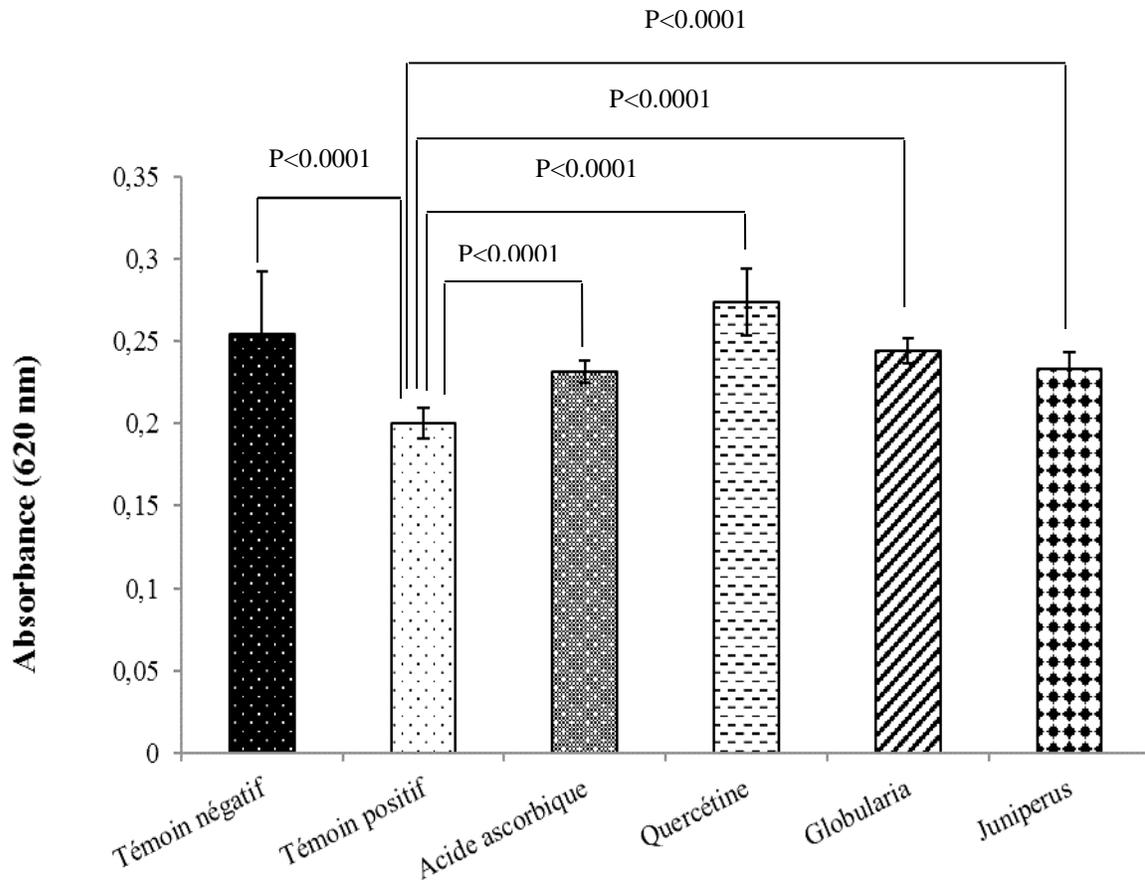


Figure 13 : Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du manganite (MnOOH). Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type.

4.1.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire

Les concentrations de l'hémoglobine (Hb) libérées sont représentées sur la **Figure 14**

Les valeurs de l'hémoglobine libérée vont dans le même sens que celles observées pour la cellule dans les différents échantillons.

Les valeurs de concentrations de l'Hb traité par l'extrait de *Globularia alypum* et l'extrait de *Juniperus oxycedrus*, en particulier, *Juniperus oxycedrus* sont supérieures à celles du témoin positif, l'acide ascorbique et quercétine ($P < 0.001$). Ces résultats suggèrent que les deux plantes ont un effet protecteur sur la composante intracytoplasmique du globule rouge représenté par l'Hb.

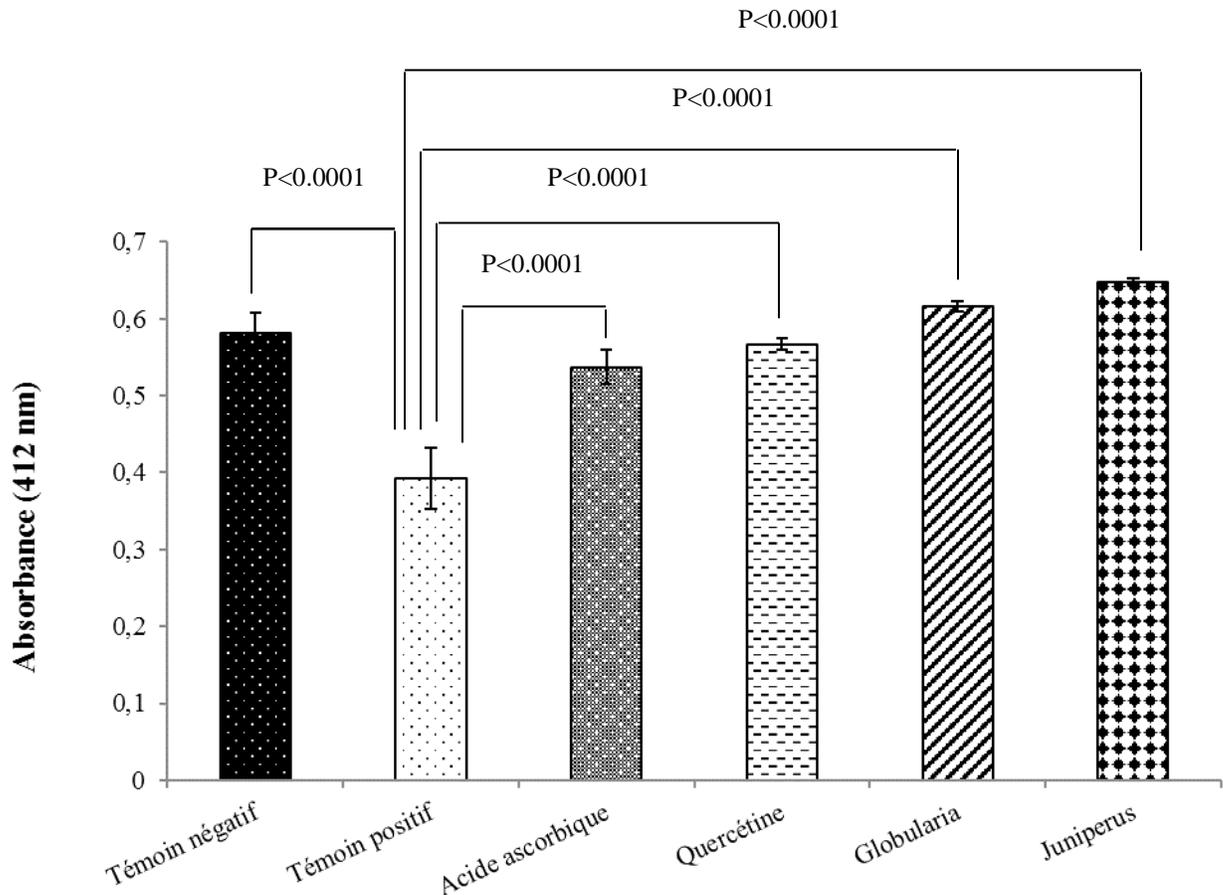


Figure 14 : Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du manganite (MnOOH). Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type.

4.2.Pile neuve

4.2.1. Turbidité cellulaire

La **Figure 15**, montre la turbidité cellulaire des échantillons témoins (témoin négatif et témoin positif) et les échantillons traités (acide ascorbique, quercétine, *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus*) par MnO_2 .

Les valeurs de concentrations cellulaires du sang du témoin négatif (non oxydé par MnO_2) restent supérieures par rapport à celles du témoin positif, l'acide ascorbique ($P < 0.05$).

Là aussi, les valeurs de concentration cellulaires des suspensions érythrocytaires traitées par la quercétine restent supérieures par rapport aux restes des échantillons ($P < 0.05$). Toutefois,

les suspensions des globules rouges traitées par les extraits de *Globularia alypum* et de *Juniperus oxycedrus* et, en particulier, l'extrait de *Globularia alypum* présente les valeurs les plus élevées par rapport à celle de témoin positif ($P < 0.01$).

Les suspensions érythrocytaires non traitées (témoin positif) et celles traitées d'acide ascorbique semblent être les plus sensibles au milieu hypotonique, et à l'action de l'oxyde de manganèse MnO_2 .

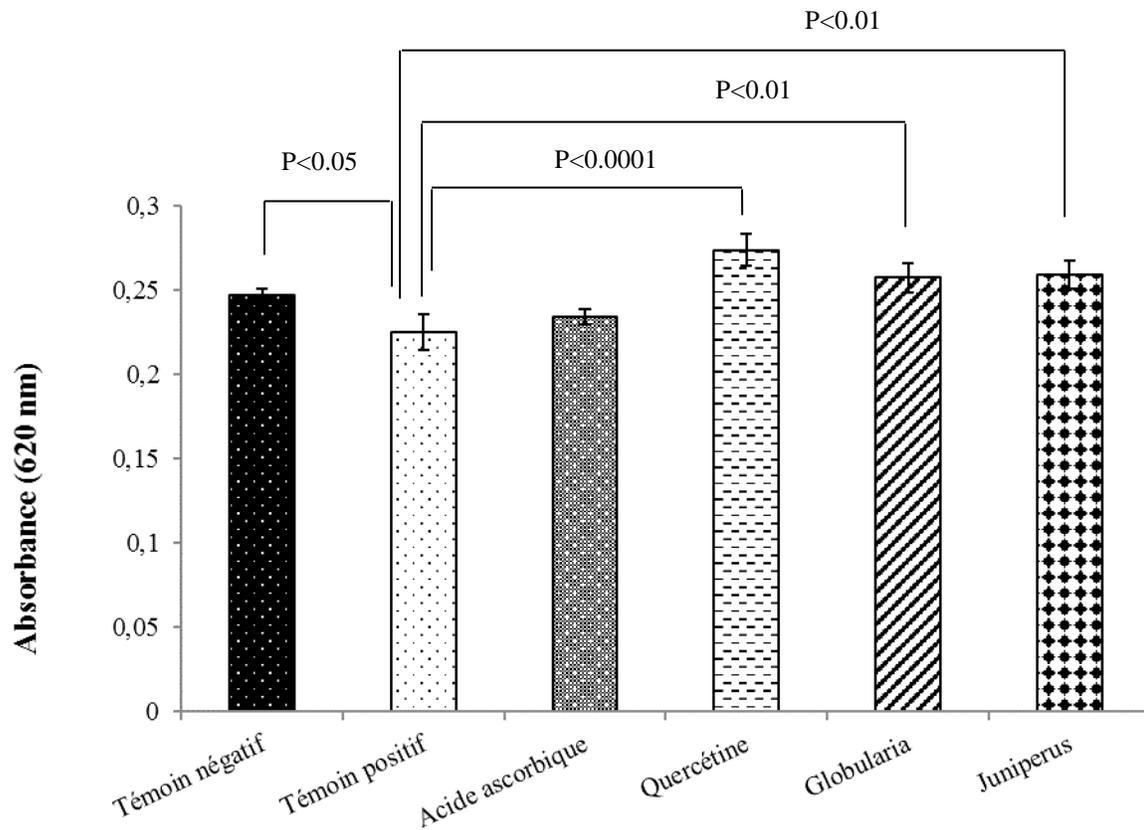


Figure 15 : Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique ($NaCl$ à 0.7%) et sous l'action de l'oxyde de manganèse (MnO_2). Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type.

4.2.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire

Les concentrations de l'hémoglobine (Hb) libérées sont représentées sur la **Figure 16**.

Comme pour le cas du manganite ($MnOOH$) issu de la pile déchargée), les valeurs de l'hémoglobine libérée suite à une oxydation par le MnO_2 (issu de la pile chargée) vont dans le même sens que celles observées pour la cellule dans les différents échantillons.

Les valeurs de concentrations de l'Hb traité par l'extrait de *Globularia alypum* et l'extrait de *Juniperus oxycedrus*, en particulier, *Juniperus oxycedrus* sont supérieures à celles du témoin positif, l'acide ascorbique et quercétine ($P < 0.01$). Ces résultats suggèrent que les deux plantes ont un effet protecteur sur la composante intracytoplasmique du globule rouge représenté par l'Hb. Ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse que les deux plantes ont un effet protecteur sur la composante intracytoplasmique du globule rouge représentée par l'Hb.

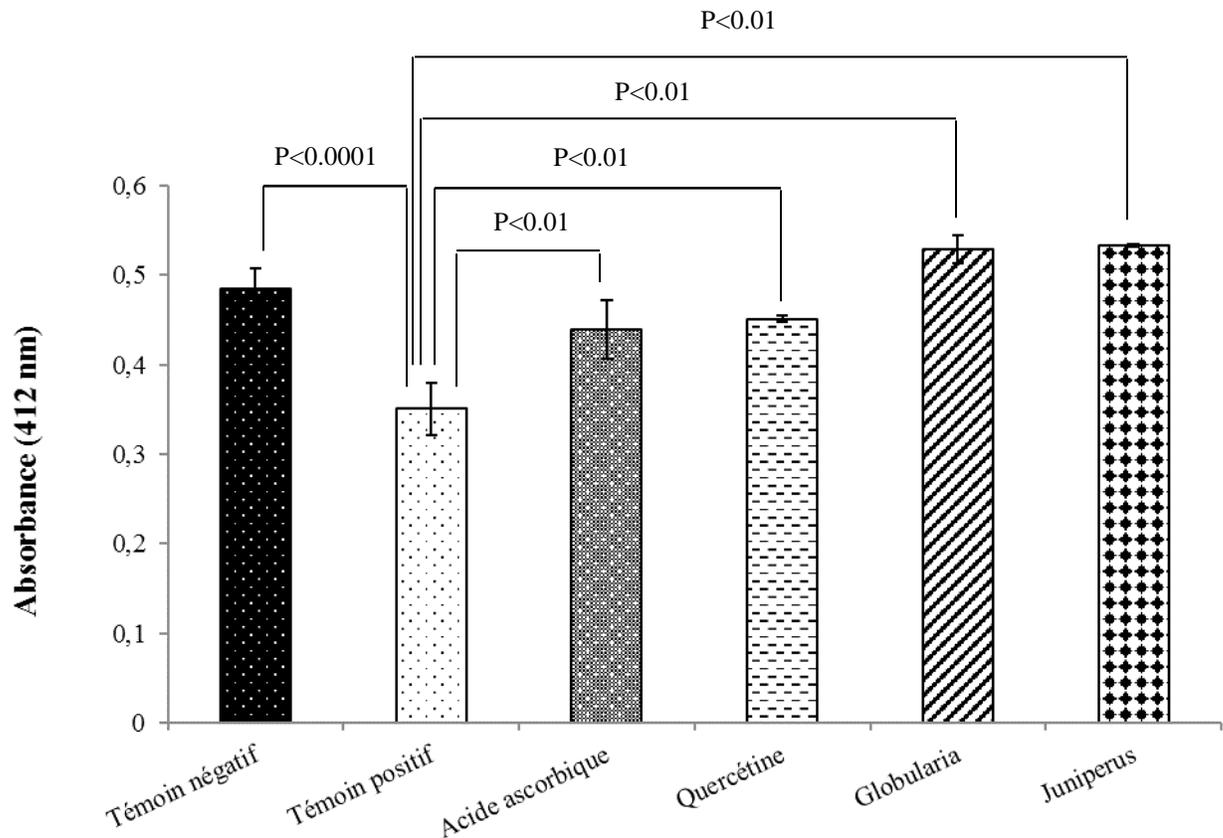


Figure 16 : Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du l'oxyde de manganèse (MnO_2). Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type.

Au cours de cette étude, nous avons constaté que le MnOOH de la pile déchargée a un effet hémolytique plus ou moins supérieur à celui de la pile neuve (MnO₂) ; ce qui signifie que les piles ont presque le même effet.

Le manganèse s'oxyde par diverses réactions dans l'organisme et se transforme en espèce trivalente (MnOOH) toxique en cas d'excès, laquelle provoque des effets néfastes.

Il existe une interaction entre le fer et le manganèse, qui se fixent sur les mêmes transporteurs pour être assimilés ou dans le sang (**EFSA**). Une fois à l'intérieur de l'organisme, le manganèse entraîne des réactions de transformations, quand le fer s'oxyde en Fe⁺³ (méthémoglobiline) les ions trivalents de manganèse (Mn⁺³) peut se fixer sur les récepteurs du fer d'autre part, l'oxydation de l'hémoglobine provoque sa dénaturation. Cette dénaturation de l'hémoglobine s'accompagne par la perte de sa configuration spatiale et du détachement de l'hème des globines (**Mirsky, 1935**).

Nous avons constaté aussi que l'acide ascorbique a une activité prooxydante. Selon Klaassen (2008), la vitamine C permettrait de faciliter le cheminement du manganèse à l'intérieur de la cellule. Par contre la présence de fer limite son absorption car ces éléments utilisent les mêmes voies de transport (**Klaassen, 2008**). En effet plusieurs auteurs ont souligné que le manganèse joue le rôle antagoniste du fer (**Keen et Leach, 1988**).

Les globules rouges traités aux extraits de *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus* ont toujours montré des valeurs élevées aussi bien en turbidité cellulaire qu'en hémoglobine, ce qui pourrait expliquer l'effet protecteur sur l'intégrité des érythrocytes.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Au terme de ce travail, nous pouvons retenir que :

Le manganèse est un oligo-élément essentiel nonobstant une surexposition au manganèse peut conduire à une perturbation de contrôle homéostatique et occasionner de divers problèmes de santé, notamment : atteintes du système nerveux central, problèmes pulmonaires....

L'étude a pour objectif d'examiner l'effet oxydant du bioxyde de manganèse et du manganite, récupérés à partir des piles salines neuves et des piles usagées, sur les globules rouges humaines. En outre il a été étudié le rôle des extraits de deux plantes médicinales ; en l'occurrence *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus*, dans la protection des globules rouges contre l'effet nuisible des oxydes de manganèse.

Au bout du compte, cette étude nous a largement confirmé via une panoplie de résultats finement recueillis que le bioxyde de manganèse et la manganite, des piles usagées et des piles neuves, provoque un effet nocif sur les érythrocytes et l'hémoglobine. L'ensemble des résultats montrent que les extraits des plantes, *Globularia alypum* et *Juniperus oxycedrus*, assurent la protection de la masse d'hémoglobine d'une part et de l'hémolyse des globules rouges d'autre part.

Aux vus des résultats probants obtenus, nous souhaitons, que d'autres personnes intéressées par le fruit de ce travail de booster son application et d'approfondir ses bienfaits dans les domaines de la médecine de travail ; de la biologie et de la protection de l'environnement.

Références bibliographiques

Références:

A

ACGIH. (2001). Manganese and Inorganic Compounds, Documentation of TLV's. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* **74**, 636 – 643.

Ahmad, P., Serwat, M., Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Physiology* **51**, 167-173.

Al-Omar M. A., Beedham C., Alsarra I. A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharm J* **12**, 1-18.

Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African plant. *African journal of biotic* **4(2)**, 128-133.

ATSDR. (2000). Toxicological Profiles for manganese [enligne], Atlanta: U.S departement of health and Human Services, Public health, 504 p.

ATSDR. (2012). Toxicological profile for manganese. Atlanta, GA, United States.: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la détermination d'une valeur sanitaire maximale admissible pour le manganèse dans l'eau destinée à la consommation humaine Avis de l'Anses Saisine n°2016-SA-0203.

B

Baynes J. W. (2005). Oxygen and life. In: Baynes JW, Domoniczak MH, Medical Biochemistry. Philadelphia: Elsevier, 497-506.

Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino RM. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **533**, 185-191.

Berger, M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant. *Etat de connaissance nutrition cliniques et métabolisme* **20**, 48-53.

Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress, *Metabolism* **49**, 3-8.

Borochoy, H., Zahler, P., Wilbrandt, W., Shinitzky, M. (1977). The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochimica Biophysica Acta* **470**, 382-388.

Bouyahyaoui A., Bahri F., Romane A., Höferl M., Wanner J., Schmidt E., Jirovetz L. (2016). Antimicrobial activity and chemical analysis of the essential oil of Algerian *Juniperus phoenicea*. *Natural Product Communications* **11(4)**, 519-522p.

Bowman AB, Kwakye GF, Herrero Hernández E, Aschner M. (2012). Role of manganese in neurodegenerative diseases; *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. **25 (4)**, 191-203.

Brandhuber, P, S. Clark, W. Knocke, et J. Tobiasson. (2013). Guidance for the treatment of manganese. Denver, Colorado: *Water Research Foundation*.

Bretscher., M. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature* **236**, 11-12.

C

Cacace J. E. and Mazza G. (2002). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Institut National de Technologie Agricole. Canada* , 1-16.

Chalmin. (2003). « Cadastration des oxydes de manganèse et usage des pigments noirs au paléolithique supérieur », Thèse de Doctorat, université marne la vallée.

Charles D. J. (2013). Natural Antioxidants. Chapitre 3. Dans: Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. Springer Science, *Business Media*, New York, 39-64.

Cheesman K. H, Slater T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. In: Cheesman KH, Slater TF, Free Radical in Medicine. New York: *Churchill Livingstone*, 93-481.

Chen, L., Yang, X., Jiao, H., & Zhao, B. (2003). Tea catechins protects against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in pc 12 cells. *Chemical Research in Toxicology*, **16 (9)**, 1155 – 1161.

Collin, S., & Crouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC, p 5, 1, 16, 235.

Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement (CCMRE). (1987). Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Préparé par le groupe de travail sur les recommandations pour la qualité de l'eau.

Cooper WC. (1984). The health implications of increased manganese in the environment resulting from the combustion of fuel additives: a review of the literature. *J Toxicol Environ Health* **14**, 23-46.

D

Davidsson L, Cederblad A, Hagebo E et al. (1988). Intrinsic and extrinsic labeling for studies of manganese absorption in humans. *J Nutr* **118**, 1517-1524.

Davidsson L, Cederblad A, Lönnerdal B et al. (1989a). Manganese retention in man: a method for estimating manganese absorption in man. *Am J Clin Nutr* **49**, 170-179.

Davidsson L, Cederblad A, Lönnerdal B et al. (1989b). Manganese absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas in humans. *Am J Dis Child* **143**, 823-827.

Davies T.A.L. (1946). Manganene pneumotitis. *Br J Ind Med*, **3**, 111-135.

Carvalho E., Faria V., Loureiro A. and Miranda V. (1989). Acute renal failure and nephrotic syndrome after maneb exposure. A new case with light and electron microscopic study. *Acta Med Port*, **2, 4-5**, 215-218.

Descheemaeker, K., &Provoost, C. (1999). L'impact de la nutrition sur la santé, développements rcebts-1. Edition. Louvin-Garant, p 95.

Djeridane., Yousfi., M. Nadjemi., B. Boutassouna., D, Stocker., P,Vidal ., N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolics compounds. *Food chemistry*, 654-660

Dobson AW., Weber S., Dorman DC., Lash LK., Erikson KM., Aschner M. (2003). Oxidative stress is induced in the rat brain following repeated inhalation exposure to manganese sulfate; *Biological Trace Element Research*, vol. **93 (1-3)**, 113-126.

Durant, D., Damon, M., Goubert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahier de nutrition et de diététique* **48**, 218-224.

E

Eckel WP et Langley WD. (1988). A background-based ranking technique for assessment of elemental enrichment in soils at hazardous waste sites. In: Superfund '88: Proceedings of the 9th National Conference. Washington, DC, 282-286.

Erikson KM., Dorman DC., Lash LH., Aschner M. (2005). Persistent alterations in biomarkers of oxidative stress resulting from combined in utero and neonatal manganese inhalation; *Biological Trace Element Research*, vol. **104 (2)**, 151-163.

Eriksson H., Gillberg PG., Aquilonius SM., Hedstrom KG., Heilbronn E. (1992). Receptor alterations in manganese intoxicated monkeys; *Archives of Toxicology*, vol. **66 (5)**, 359-364.

European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA Journal* **11(11)**, 3419.

EPA, 1984a. Health assessment document for manganese. Final draft. Cincinnati, OH: U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA-600/8-83-013F.

EPA, 1984b. Health effects assessment for manganese (and compounds). Cincinnati, OH: U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA/540/1-86/057.

EPA. (1985a). Chemical identity—manganese tricarbonyl methylcyclopentadienyl. Cincinnati, OH:U.S. Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances.

EPA, (1993). Drinking water criteria document for manganese. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH.

EPA, (1995b). Proceedings: Workshop on the bioavailability and oral toxicity of manganese. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Research and Development, Office of Science and Technology, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C.

EPA, (1995c). Integrated Risk Information System (IRIS). Health Risk Assessment for Manganese, on line, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH.

F

Ferrazzano, F.G., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Panto, G., Pollio, A. (2011). Plant polyphenol and their anti-cariogenic properties **16**, 1486-1507.

Francis AA et Forsyth C. (1995). Toxicity summary for manganese. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, préparé pour le US Department of Energy, July 1995.

Friguet B. (2003). Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique*, 103-107.

Fontaine E. (2007). Radicaux libres. Dans : *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer-Verlag, France, 251-257.

G

Ghazi F. & Sahraoui S. (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem* **48**, 909-930.

Girasole, M., Dinarelli, S., Boumis, G. (2012). Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale. *Micron* **43(12)**, 1273-1286.

Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE. (1990). Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity; *Biochemical Journal*, vol. **266 (2)**, 329-334.

Gordesky, S.E., Marinetti, G.V. (1973). The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochimica Biophysica Acta* **50**, 1027-1031.

Grandjean, P., & Landrigan, P.J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology* **13(3)**, 330-338.

Gregus, Z., Fekete, T., Halaszi, E., Klaassen, C.D. (1996). Lipoic acid impairs glycine conjugation of benzoic acid and renal excretion of benzoylglycine. *Drug Metab Dispos* **24**, 682-688.

Guignard, J. L. (1996). Abrégé de biochimie végétale. Edition Masson, Paris, p 160

Guillaume, L. (2007). Elasticité de squelette de globules rouge humain-une étude en pince optique. Thèse de doctorat, université de paris 4, p17.

H

Hennebelle.T., Sahpaz. S., et Bailleul.F. (2004). Les polyphénols végétaux, source, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.*Phytothérapie* **1**, 3-6.

HSDB. (2007). Manganese. Hazardous substances Data Bank, National Library of Medicine. [Visité le 21.11.2007].

Huang CC., Chu NS., Lu CS., Chen RS., Calne DB. (1998). Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. *Neurology* **50(3)**, 698-700.

Huang CC, Lu CS, Chu NS, Hochberg F, Lilienfeld D, Olanow W, Calne DB, (1993). Progression after chronic manganese exposure. *Neurology* **43(8)**, 1479-1483.

I

Ichai C., Quintard H., Orban J. C. (2011). Désordres Métaboliques et Réanimation : De La Physiopathologie Au Traitement, Springer-Verlag, France, 427-429.

INERIS. « Manganèse et ses dérivés » [en ligne], Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques,66p.

INPN ;Inventaire National du Patrimoine Naturel https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/100335

Israeli R., Sculsky M. and Tiberin P. (1983). Acute central nervous system changes due to intoxication by Manzidan (a combined dithiocarbamate of Maneb and Zineb).*Arch Toxicol Suppl*, **6**, 238-243.

J

Johnson R. M., Goyette Jr. G, Ravindranath Y., Ho Y.S. (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **39**, 17-1407.

Jaureguiberry, S. (2015). Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisine, Université pierre et marie page 54.

K

Kalaiselvi, V. etVidhya, R. (2015). In vitro membrane stabilizing activity of different extracts of bahiniatomentosa(L) leaves. *World journal of pharmaceutical research* **4(4)**, 1700-1715.

Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J., Traore, A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal Biotechnol* **4**, 823-828.

Karuppanapandian, T., Moon, J.H., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygenspecies in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms, *Australian Journal. Crop Science* **5(6)**, 709-725.

Keen CL et Leach RM. (1988). Manganese, In: Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds, H.G. Seiler and H. Sigel eds., New-York, Marcel Dekker Inc., pp. 405-415.

Khantouche Linda, Abderabba Manef. (2018). *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* (IOSR-JESTFT) e-ISSN: 2319-2402, p- ISSN: 2319-2399. Volume **12**.

Kobayashi, Haruo, Uchida M, Sato I, Suzuki T, Hossain MM, Suzuki K. (1990). Neurotoxicity and Brain Regional Distr Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE; Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity; *Biochemical Journal*, vol. **266 (2)**, 329-334.

Koizumi A., Shiojima S., Omiya M., Nakano S., Sato N. and Ikeda M. (1979). Acute renal failure and maneb (manganous ethylenebis [dithiocarbamate]) exposure. *J Am Med Assoc*, **242, 23**, 2583-2585.

Komatsu, F., Kagawa, Y., Ishiguro, K., Kawabata, T., Purvee, B., Otgon, J., &Chimedregzen, U. (2009). The Association of Very High Hair Manganese Accumulation and High Oxidative Stress in Mongolian People. *Current Aging Science* **2(1)**, 28-42.

Kozlova, E.K., Chernysh, A.M., Moroz, V.V., Kuzovlev, A.N. (2012). Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron* **44**, 218–227.

L

Leila SMAIL, Sihem BERDJA, Saka BOUALEM, Samia NEGGAZI, Saliha BOUMAZA, Ghouti KACIMI, Lynda BOUDARÈNE, Souhila AOUICHAT BOUGUERRA. (2017). Therapeutic effect of aqueous extract of *Globularia alypum* following in vitro insulin induced toxicity on *Rattus norvegicus* cardiomyocytes. *Nutr Santé*; Vol. **06**. N°01:27-35.

Leporatti M, Ghedira k. (2009). Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiotechnomed* 5-31.

Lesser S.H. and Weiss S.J. (1995) . Art hazards. *Am J Emerg Med*, **13**, 451-458.

Lux, S.E. (1983). Disorders of the red cell membrane skeleton: hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed. Stanbury JB. McGraw-Hill, New York, 1573-1605.

M

Malthankar GV., White BK., Bhushan A., Daniels CK., Rodnick KJ., Lai JC. (2004). Differential lowering by manganese treatment of activities of glycolytic and tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes investigated in neuroblastoma and astrocytoma cells is associated with manganese-induced cell death; *Neurochemical Research*, vol. **29(4)**, 709-717.

Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small AnimPract* **38**, 1-30.

Mannargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pognas, J., L.and Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants. *Areview.Advances in colloid and interface science* **228**, 1-16.

Mena I., Horiuchi K., Burke K et al. (1969). Chronic manganese poisoning: individual susceptibility and absorption of iron. *Neurology* **19**, 1000-1006.

Matés J.M., Perez-Gomez C., Nunez De Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.*, vol **32(8)**, p.595-603.

Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative. 2ème édition. Edition de BoeckUniversité, p 51, 52.

Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**, 711-760.

Mendonça, R., Silveira, A.A., Conran, N. (2016). Red cell DAMPs and inflammation **65(9)**, 565-78.

Mirsky, A.E. (1935). The visual cycle and protein denaturation. *Physiology.* **22**,147–149.

Mitrofan-Oprea L., Palii C., Tissier J. P., Heron A., Verpoort T., Behague M., Smagghe E., Schooneman F., Huart J. J., Goudaliez F., Montreuil J., &Bratosin D. (2007). Nouveaux criteres d'évaluation de la viabilite des hematiesdestinees a la transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique* **14**, 393-401.

Myers E., Fourie M., Zogoe HB., Naik I., Theodorou P., Tassel H., Daya A., Thompson ML. (2003). Nervous system effects of occupational manganese exposure on South African man-ganese mineworkers; *Neurotoxicology*, vol. **24 (4-5)**, 649-656.

N

Naczy M., and Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolic in food. *Journal Chromatography* 95-111.

O

Oberdoerster G et Cherian G, (1988). Proceedings, 17th Rochester International. Conf. Environ. Toxicol. Biological Monitoring of Toxic Metals. TW Clarkson éd., New-York, Plenum Press.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* **276**, 38388-38393.

Olanow, C. W.(2004). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci***1012**, 209–23.

Ono K., Komai K., Yamada M. (2002). Myoclonic involuntary movement associated with chronic manganese poisoning. *J. Neurol. Sci* **199(1-2)**, 93-96.

Ostiguy, C., S. Malo et P. Asselin. (2003). "Synthesis of scientific knowledge on the health risks following occupational exposure to manganese. R-349. Institut de recherche Robert Sauvé en santé et en sécurité du travail.

P

Pal, P. K., A. Samii, et D. B. Calne. (1999). Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20, no. 2-3, 227-38.

Park, P. J., Jung, W. K.J., Nam, K.S., Shahidi, F., Kim, S.K. (2001). purification and characterization of ant oxidative peptides from protein hydrolysate of lethin free egg yolk. *Journal of the American oilchemist's society* 78(6), 651-656.

Portier, K., Kirschvink, Fellman, N., oudert, J et Lekeux, P. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire* 151, 101-106.

Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *PhysiolRev* 88, 1243-1276.

Q

Quezel, P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'algerie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique. P :35-40.

R

Rodier J. (1955) . Manganese poisoning in Moroccan miners. *Br J Ind Med*, 12, 21-35.

Rope SK, Arthur WJ, Craig TH et al. (1988). Nutrient and trace elements in soil and desert vegetation of southern Idaho. *Environ Monitor and Assess* 10,1-24.

S

Santé Canada. (2010). Bureau de l'eau, de l'air et des changements climatiques, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs ; Evaluation du risque pour la santé humaine du manganèse inhalé ; Santé Canada publications, 100123.

Sathiya, J., Satitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesho, MandKrishenan. (2015). Enzymatic antioxidants and its role in oral disease, *Journal of pharma bio allied science* 7(2), 331-333

Sénat, Les piles. [Visité le 07.01.2008].

Schroeder WH, Dobson M, Kane DM et al. (1987). Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review. *J Air Pollut Control Assoc* 37, 1267-1285.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M. (2013). Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity; *BMC Pharmacology and Toxicology*, vol.14, 23.

Steck, TL. (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *A review Journal of cell Biology*, **62**, 1-19.

Stokinger, HE. (1981). The Metals, In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Vol 2A, eds. GD Clayton and FE Clayton, New York, John Wiley & Sons, 1749-1769.

Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* **276**, 38084-38089.

Sumino K, Hayakawa K, Shibata T et al., 1975. Heavy metals in normal Japanese tissues: amounts of 15 heavy metals in 30 subjects. *Arch Environ Health* **30**:487-494.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Int j Biochem Cell Biol* **39**, 44 – 84.

Vania M., Nakajima G., Abriela A., Julianaalves M. (2014). Citrus bioactive phenolic: *role in the obesity treatment* **59(2)**, 2.

W

WHO. (1981). Environmental health criteria 17: Manganese. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO. (1997). Manganese. In: Air quality guidelines for Europe, 2nd Edition. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, WHO Regional Publications, European Series.

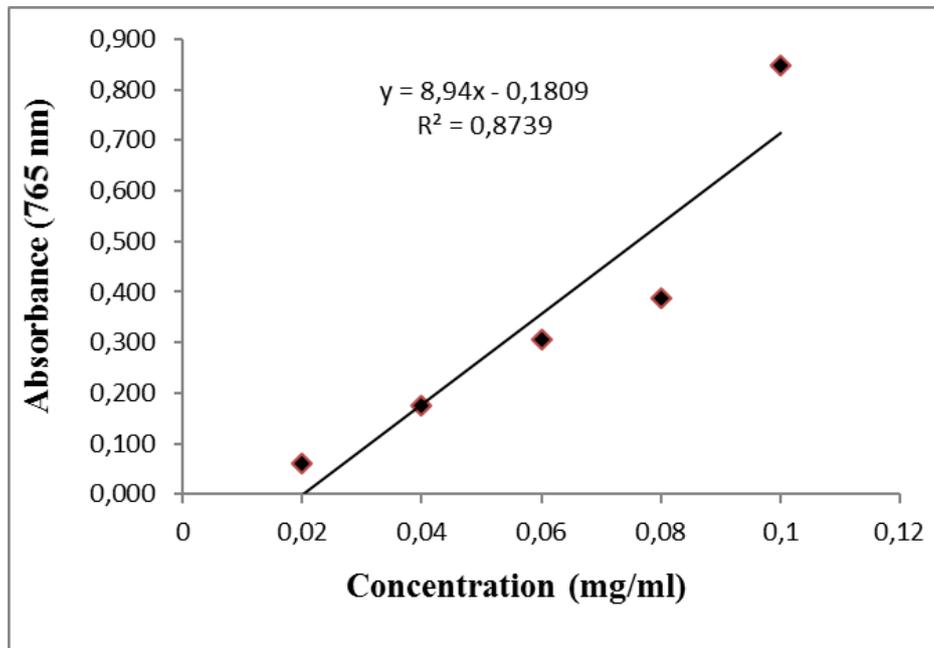
Z

Zidenberg-Cherr, S. et Keen, C.L. (1987). Enhanced tissue lipid peroxidation: mechanism underlying pathologies associated with dietary manganese deficiency. Dans: Nutritional bioavailability of manganese. C. Kies (dir. de publ.). American Chemical Society, Washington, DC. p. 56.

Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. (2004). Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using; *Neurotoxicology*, vol. **25 (4)**, 573-584
Distribution of Manganese in Mice; *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 2003, vol. **22 (4)**, 679-689.

Annexes

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux



Annexe 2 : Représentation du seuil de signification de rendement d'eau physiologique entre les deux types de plantes

Tableau ANOVA pour Rendement

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type plantes	1	3,082	3,082	30,719	,0052	30,719	,983
Résidu	4	,401	,100				

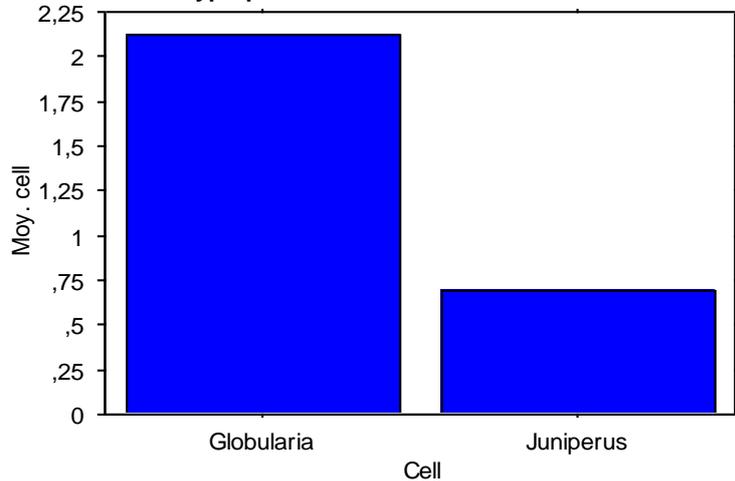
Tableau de moyennes pour Rendement

Effet : Type plantes

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Globularia	3	2,120	,252	,146
Juniperus	3	,687	,370	,214

Graphique des interactions pour Rendement

Effet : Type plantes



Test PLSD de Fisher pour Rendement

Effet : Type plantes

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
Globularia, Juniperus	1,433	,718	,0052

S

Annexe 3 : Représentation du seuil de signification de rendement d'éthanol entre les deux types de plantes

Tableau ANOVA pour Rendement

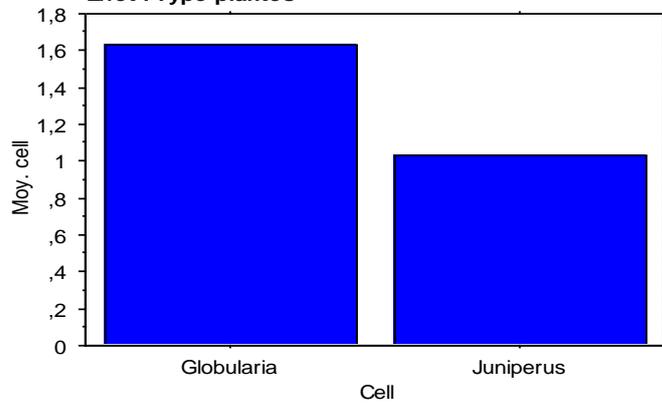
	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type plantes	1	,528	,528	22,018	,0094	22,018	,936
Résidu	4	,096	,024				

Tableau de moyennes pour Rendement

Effet : Type plantes

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Globularia	3	1,627	,186	,107
Juniperus	3	1,033	,116	,067

Graphique des interactions pour Rendement
Effet : Type plantes



Test PLSD de Fisher pour Rendement

Effet : Type plantes

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p
Globularia, Juniperus	,593	,351	,0094

S

Annexe 4 : Représentation du seuil de signification entre les deux types de plantes en composés phénoliques de l'extrait éthanolique

Tableau ANOVA pour TCP

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type Plante	1	2373,299	2373,299	20,935	,0102	20,935	,925
Résidu	4	453,462	113,365				

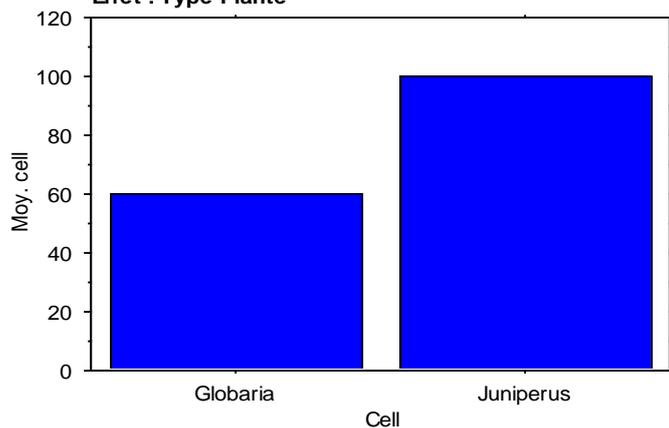
Tableau de moyennes pour TCP

Effet : Type Plante

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Globaria	3	60,130	13,095	7,560
Juniperus	3	99,907	7,433	4,291

Graphique des interactions pour TCP

Effet : Type Plante



Test PLSD de Fisher pour TCP

Effet : Type Plante

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Globaria, Juniperus	-39,777	24,137	,0102	S

Annexe 5 : Représentation du seuil de signification entre les deux types de plantes en composés phénoliques de l'extrait aqueux

Tableau ANOVA pour TCP

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type Plante	1	16345,660	16345,660	530,147	<,0001	530,147	1,000
Résidu	4	123,329	30,832				

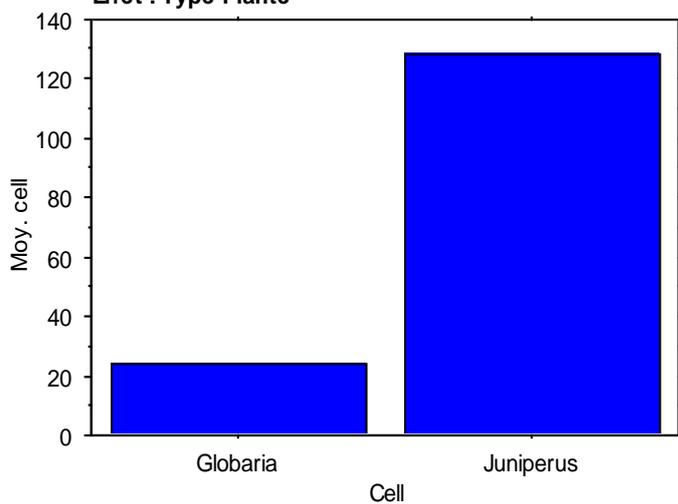
Tableau de moyennes pour TCP

Effet : Type Plante

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Globaria	3	23,704	3,437	1,984
Juniperus	3	128,093	7,061	4,076

Graphique des interactions pour TCP

Effet : Type Plante



Test PLSD de Fisher pour TCP

Effet : Type Plante

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Globaria, Juniperus	-104,389	12,588	<,0001	S

Annexe 6 : Représentation du seuil de signification entre les différents échantillons en globules rouges (pile neuve)

Tableau ANOVA pour RBC

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type échantillon	5	,005	,001	14,440	,0001	72,200	1,000
Résidu	12	,001	6,472E-5				

Tableau de moyennes

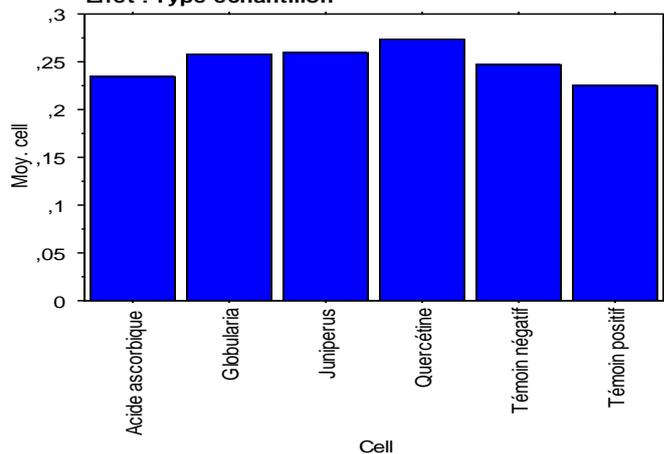
pour RBC

Effet : Type échantillon

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Acide ascorbique	3	,235	,005	,003
Globularia	3	,258	,009	,005
Juniperus	3	,259	,008	,005
Quercétine	3	,274	,010	,006
Témoin négatif	3	,247	,004	,003
Témoin positif	3	,226	,011	,006

Graphique des interactions pour RBC

Effet : Type échantillon



Test PLSD de Fisher pour RBC

Effet : Type échantillon

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Globularia	-,023	,014	,0044	S
Acide ascorbique, Juniperus	-,025	,014	,0027	S
Acide ascorbique, Quercétine	-,039	,014	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,012	,014	,0850	
Acide ascorbique, Témoin positif	,009	,014	,1957	
Globularia, Juniperus	-,002	,014	,8040	
Globularia, Quercétine	-,016	,014	,0286	S
Globularia, Témoin négatif	,011	,014	,1304	
Globularia, Témoin positif	,032	,014	,0004	S
Juniperus, Quercétine	-,015	,014	,0454	S
Juniperus, Témoin négatif	,012	,014	,0850	
Juniperus, Témoin positif	,034	,014	,0003	S
Quercétine, Témoin négatif	,027	,014	,0014	S
Quercétine, Témoin positif	,048	,014	<,0001	S
Témoin négatif, Témoin positif	,021	,014	,0070	S

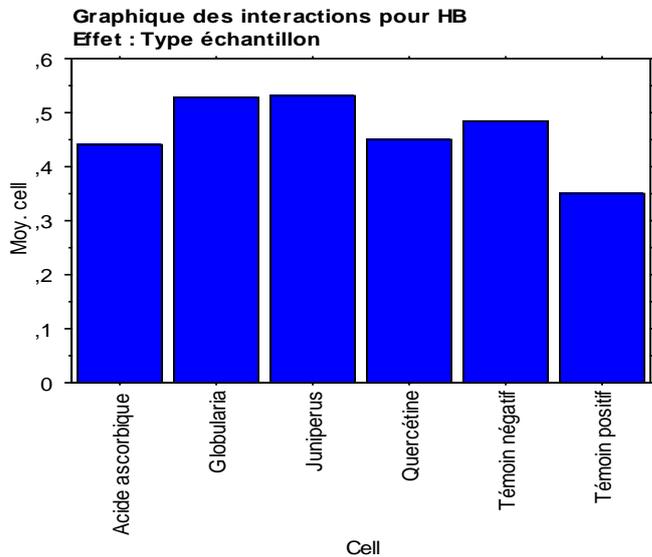
Annexe 7 : Représentation du seuil de signification entre les différents échantillons en Hb (pile neuve)

Tableau ANOVA pour HB

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Type échantillon	5	,069	,014	30,697	<,0001	153,485	1,000
Résidu	12	,005	4,474E-4				

Tableau de moyennes pour HB
Effet : Type échantillon

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Acide ascorbique	3	,439	,032	,019
Globularia	3	,529	,016	,009
Juniperus	3	,533	,002	,001
Quercétine	3	,451	,003	,002
Témoin négatif	3	,484	,023	,013
Témoin positif	3	,351	,029	,017



Test PLSD de Fisher pour HB
Effet : Type échantillon
Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Globularia	-,090	,038	,0002	S
Acide ascorbique, Juniperus	-,093	,038	,0002	S
Acide ascorbique, Quercétine	-,012	,038	,5004	
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,045	,038	,0230	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,088	,038	,0003	S
Globularia, Juniperus	-,004	,038	,8354	
Globularia, Quercétine	,078	,038	,0007	S
Globularia, Témoin négatif	,045	,038	,0238	S
Globularia, Témoin positif	,178	,038	<,0001	S
Juniperus, Quercétine	,081	,038	,0005	S
Juniperus, Témoin négatif	,048	,038	,0161	S
Juniperus, Témoin positif	,182	,038	<,0001	S
Quercétine, Témoin négatif	-,033	,038	,0802	
Quercétine, Témoin positif	,100	,038	<,0001	S
Témoin négatif, Témoin positif	,133	,038	<,0001	S

Annexe 8 : Représentation du seuil de signification entre les différents échantillons en globules rouges (pile déchargée)

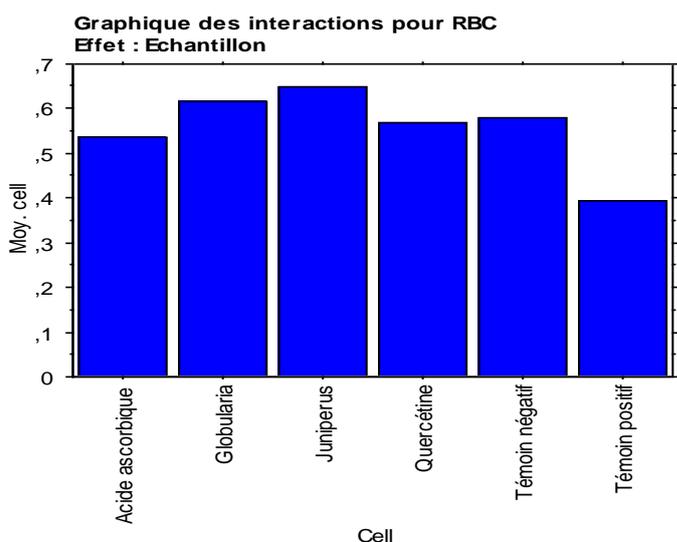
Tableau ANOVA pour RBC

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Echantillon	5	,120	,024	48,326	<,0001	241,630	1,000
Résidu	12	,006	4,974E-4				

Tableau de moyennes pour RBC

Effet : Echantillon

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Acide ascorbique	3	,537	,023	,013
Globularia	3	,616	,007	,004
Juniperus	3	,648	,004	,003
Quercétine	3	,567	,008	,005
Témoin négatif	3	,581	,027	,016
Témoin positif	3	,392	,040	,023



Test PLSD de Fisher pour RBC

Effet : Echantillon

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Globularia	-,079	,040	,0010	S
Acide ascorbique, Juniperus	-,111	,040	<,0001	S
Acide ascorbique, Quercétine	-,030	,040	,1292	
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,044	,040	,0325	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,145	,040	<,0001	S
Globularia, Juniperus	-,032	,040	,1043	
Globularia, Quercétine	,049	,040	,0196	S
Globularia, Témoin négatif	,035	,040	,0812	
Globularia, Témoin positif	,224	,040	<,0001	S
Juniperus, Quercétine	,081	,040	,0008	S
Juniperus, Témoin négatif	,067	,040	,0033	S
Juniperus, Témoin positif	,256	,040	<,0001	S
Quercétine, Témoin négatif	-,014	,040	,4465	
Quercétine, Témoin positif	,175	,040	<,0001	S
Témoin négatif, Témoin positif	,189	,040	<,0001	S

Annexe 9 : Représentation du seuil de signification entre les différents échantillons en Hb (pile déchargée)

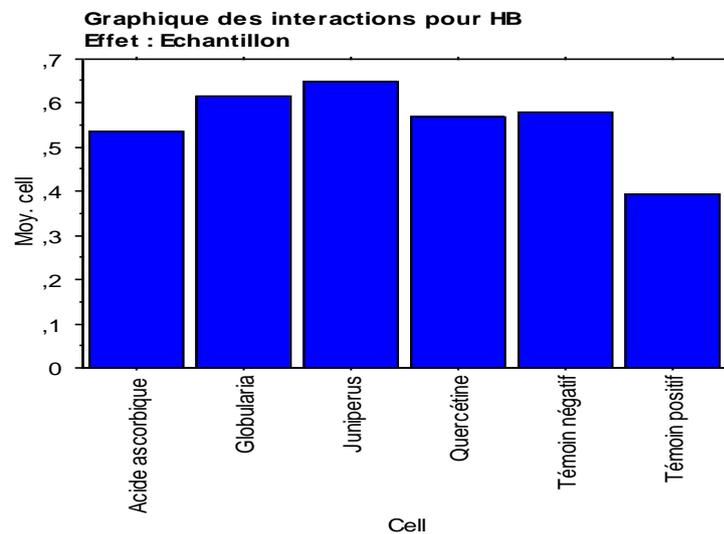
Tableau ANOVA pour HB

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Echantillon	5	,120	,024	48,326	<,0001	241,630	1,000
Résidu	12	,006	4,974E-4				

Tableau de moyennes pour HB

Effet : Echantillon

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
Acide ascorbique	3	,537	,023	,013
Globularia	3	,616	,007	,004
Juniperus	3	,648	,004	,003
Quercétine	3	,567	,008	,005
Témoin négatif	3	,581	,027	,016
Témoin positif	3	,392	,040	,023



Test PLSD de Fisher pour HB

Effet : Echantillon

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Globularia	-,079	,040	,0010	S
Acide ascorbique, Juniperus	-,111	,040	<,0001	S
Acide ascorbique, Quercétine	-,030	,040	,1292	
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,044	,040	,0325	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,145	,040	<,0001	S
Globularia, Juniperus	-,032	,040	,1043	
Globularia, Quercétine	,049	,040	,0196	S
Globularia, Témoin négatif	,035	,040	,0812	
Globularia, Témoin positif	,224	,040	<,0001	S
Juniperus, Quercétine	,081	,040	,0008	S
Juniperus, Témoin négatif	,067	,040	,0033	S
Juniperus, Témoin positif	,256	,040	<,0001	S
Quercétine, Témoin négatif	-,014	,040	,4465	
Quercétine, Témoin positif	,175	,040	<,0001	S
Témoin négatif, Témoin positif	,189	,040	<,0001	S

Résumé

Ce travail est consacré principalement, à l'étude de l'effet oxydatif et hémolytique, du bioxyde de manganèse (MnO_2) et de la Manganite ($MnOOH$), récupérés à partir des piles salines neuves et des piles usagées. Ensuite l'étude a été élargie au potentiel antioxydant et anti-hémolytique, des extraits des feuilles des deux plantes médicinales (*Juniperus oxycedrus* et *Globularia alypum*), et la valorisation de la quantité de leurs composés phénoliques. Par ailleurs, les tests d'anti-hémolytiques ont été opérés et accommodés sur des globules rouges (GR) humaines saines.

La teneur en phénols totaux, de l'extrait aqueux est significativement importante pour *Juniperus oxycedrus* que pour *Globularia alypum* ; avec des valeurs de l'ordre de 23.70 ± 3.43 mg EAG/g et 128.09 ± 7.06 mg EAG/g, respectivement. Pareillement, l'extrait éthanolique du *Juniperus oxycedrus* (99.90 ± 7.43 mg EAG/g) est estimé plus riche en polyphénol que chez *Globularia alypum* (60.13 ± 13.09 mg EAG/g).

L'étude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique a été réalisée, par la mise en contact des globules rouges humaines aux les deux types de plantes, ensuite les GR ont été exposés au bioxyde de manganèse et au manganite et suivi d'un stress hypo-osmotique. Les résultats obtenus ont montré que la manganite, de la pile déchargée, est plus efficace que le bioxyde de manganèse, de la pile neuve, qu'il soit en terme d'abaissement en nombre de globules rouges, de même pour la réduction de la concentration en hémoglobine. Subséquemment, les deux extraits semblent plus efficaces que l'acide ascorbique qui a montré plutôt une activité prooxydante.

Mots clés : MnO_2 , Polyphénols, Activité antioxydant, Globules rouges, *Globularia alypum*, *Juniperus oxycedrus*

المخلص

يكرس هذا البحث العلمي أساسا لدراسة تأثير التأكسدية والانحلالية لكل من ثاني أكسيد المنغنيز (MnO_2) والمانجانيت ($MnOOH$)، المستخرج من البطاريات الجديدة وكذا المستعملة. ثم تم توسيع الدراسة لتشمل امكانية مضادات الأوكسدة والانحلال الهولي للدم لاثنين من النباتات الطبية (جونيبيروس أوكسيديروس وغلوبولاريا ألبوم، وتعزيز كمية المركبات الفينولية الخاصة بهم. وبالإضافة إلى ذلك، أجريت اختبارات الانحلال الدموي خلايا الدم الحمراء البشرية.

إن محتوى الفينول الكلي للمستخلص المائي كان له تركيز أعلى لجونيبيروس أوكسيديروس من غلوبولاريا (128.09 ± 7.06 ملغ مكافئ لحمض الغليك/غرام) و (3.43 ± 23.70 ملغ مكافئ لحمض الغليك/غرام) على التوالي، كذلك بالنسبة لمستخلص الإيثانول من جونيبيروس أوكسيديروس (99.90 ± 7.43 ملغ مكافئ لحمض الغليك/غرام) كان أكثر ثراء في البوليفينول من الغلوبولاريا ألبوم (60.13 ± 13.09 ملغ مكافئ لحمض الغليك/غرام).

لقد تم إجراء دراسة لنشاط مضادات الأوكسدة والانحلال الهولي للدم، عن طريق معالجة خلايا الدم الحمراء البشرية بنوعين من النباتات (جونيبيروس أوكسيديروس وغلوبولاريا ألبوم)، ثم تم تعريض الكريات الحمراء لثاني أكسيد المنغنيز.

أظهرت النتائج أن المانجانيت، من البطارية التي تم تفريغها، هو أكثر فعالية من ثاني أكسيد المنغنيز، من البطارية الجديدة، سواء كان ذلك من حيث خفض عدد خلايا الدم الحمراء، أو من حيث الحد من تركيز الهيموغلوبين. كما أن مستخلصي النباتين كانوا أكثر فعالية من حمض الأسكوربيك، الذي أظهر المزيد من النشاط البروكسيميكي.

الكلمات الرئيسية: MnO_2 ، البوليفينول، النشاط المضاد للأوكسدة، خلايا الدم الحمراء، غلوبولاريا ألبوم، جونيبيروس أوكسيديروس

Abstract

This work is mainly devoted to the study of the oxidative and hemolytic effect, manganese dioxide (MnO_2) and Manganite ($MnOOH$), recovered from new salt cells and used batteries. Then the study was expanded to potential antioxidant and anti-hemolytic, leaf extracts from two medicinal plants (*Juniperus oxycedrus* and *Globularia alypum*), and enhancing the amount of their phenolic compounds. In addition, anti-hemolytic tests were performed and accommodated on healthy human red blood cells.

The total phenol content of water extract is significantly important for *Juniperus oxycedrus* than for *Globularia alypum*, with values of the order of 99.90 ± 7.43 mg EAG/g and 60.13 ± 13.09 mg EAG/g respectively.

The study of antioxidant and anti-hemolytic activity was carried out, by contact of human red blood cells, of two types of plants, then the blood cells were exposed to manganese dioxide and manganite and followed by hypo-osmotic stress.

The results showed that manganite, from the discharged battery, is more effective than manganese dioxide, from the new battery, whether it is in terms of lowering in the number of red blood cells, as well as for the reduction of hemoglobin concentration. Subsequently, both extracts appear to be more effective than ascorbic acid, which showed rather prooxidation activity.

Keywords: MnO_2 , Polyphenols, Antioxidant Activity, Red Blood cells, *Globularia alypum*, *Juniperus oxycedrus*.