



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 الأرض 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



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Etude de l'activité antioxydante des extraits de
la plante médicinale *Atriplex halimus*
ssp. *schweinfurthii*.**

Présenté par : BOULAOUAD Anis
BOUHAFS Younes
MAADADI A.raouf

Devant le jury :

Président : M DIAFAT Abdelouahab MCA (Univ. Bordj Bou Arreridj)
Encadrant : M^{lle} DEHIMI Khadidja MAB (Univ. Bordj Bou Arreridj)
Examineur : M^{me} MEZZITI Asma MAA (Univ. Bordj Bou Arreridj)

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier notre Dieu d'avoir nous donné le courage et la force d'aller au bout afin de terminer ce travail.

Nos vifs remerciements

A notre encadreur M^{elle} Dehimi Khadidja, pour ces précieux conseils, ses orientations, pour son aide et pour la confiance qu'elle nous a accordé.

Nous remercions infiniment les membres de jury d'avoir accepté de juger et évaluer notre travail.

Nous tenons à exprimer aussi nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

ملخص

Atriplex halimus ssp. schweinfurthii (القطف) هو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج السكري وأمراض القلب. ينمو هذا النبات في الجزائر بشكل عفوي في المناطق السهبية. تم في هذه الدراسة تقييم النشاط المضاد للأكسدة للنبات المدروس بطرق مختلفة *in vitro*. تم استخلاص المواد الفعالة بواسطة أربع مذيبات ذات قطبية مختلفة، بعد ذلك تم تقدير كمية المركبات الفينولية وذلك لتحديد المحتوى الكلي من عديدات الفينول، الفلافونويدات و الدباغ في كل مستخلص. تم الحصول على أعلى مردود للاستخلاص في المستخلص المائي (19.87 %) ومستخلص الميثانول (10.92 %)، بينما أظهر كل من مستخلصي الأسيون والهكسان مردودا أقل (1.56 % و 0.88 %، على التوالي). وجدت أعلى كمية إجمالية من عديدات الفينول في مستخلصي الأسيون والماء (28.75 و 28.1 ميكرو غ مكافئ حمض الغاليك /مغ مستخلص، على التوالي). بينت النتائج أن مستخلصي الهكسان و الأسيون هما الأغنى بالفلافونويدات (43.96 و 31.94 ميكرو غ مكافئ الكرسنين /مغ مستخلص، على التوالي)، بينما أظهر مستخلص الهكسان أعلى محتوى من الدباغ (76.18 ميكرو غ مكافئ حمض التانيك/مغ مستخلص). أظهر اختبار DPPH أن المستخلصات لا تملك تأثير إزاحي مهم؛ بين مستخلص الهكسان أفضل نشاطية بـ IC_{50} قدرت بـ 7.24 مغ/مل. أظهر مستخلص الأسيون أعلى قدرة إرجاعية لكل التراكيز المختبرة باستعمال طريقة FRAP. في اختبار بيتاكاروتين/ حمض اللينوليك أظهرت جميع المستخلصات نشاطية هامة مضادة للأكسدة، بينما أعطى مستخلص الهكسان أعلى نسبة تثبيط قدرت بـ 92.47 %.

الكلمات المفتاحية : *Atriplex halimus ssp. Schweinfurthii* , مضاد الاكسدة , عديدات الفينول , DPPH , FRAP , بيتاكاروتين.

Résumé

Atriplex halimus ssp. *schweinfurthii* (Guettaf) est une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète et des maladies cardiaques. En Algérie, elle pousse spontanément dans les zones steppiques. Dans cette étude, l'activité antioxydante de la plante étudiée est évaluée par différentes méthodes *in vitro*. L'extraction des substances actives est effectuée par quatre solvants à polarités différentes, ensuite un dosage des composés phénoliques est réalisé afin de déterminer la teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tannins dans chaque extrait. Les rendements d'extraction les plus élevés sont obtenus pour l'extrait aqueux (19.87%) et méthanolique (10.92%), alors que les extraits d'acétone et d'hexane ont montré des rendements plus faibles (1.56% et 0.88%, respectivement). Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux sont trouvées dans les extraits acétonique et aqueux (28.75 et 28.10 µg équivalent d'acide gallique /mg d'extrait, respectivement). Les résultats ont montré que les extraits d'hexane et d'acétone sont les plus riches en flavonoïdes (43.96 et 31.94 µg équivalent de quercétine /mg d'extrait, respectivement), alors que l'extrait d'hexane a montré la teneur la plus élevée en tannins (76.18 µg équivalent d'acide tannique/mg d'extrait). Le test au DPPH a montré que les extraits ne possèdent pas un pouvoir antiradicalaire important ; la meilleure activité est celle de l'extrait d'hexane avec une IC₅₀ de 7.24 mg/ml. Le pouvoir réducteur le plus important est présenté par l'extrait d'acétone pour toutes les concentrations testées par la méthode de FRAP. Dans le test de β-carotène/acide linoléique, tous les extraits ont montré une activité antioxydante importante, alors que le pourcentage d'inhibition le plus élevé est celui de l'extrait d'hexane par 92.47%.

Mots clés : *Atriplex halimus* ssp. *Schweinfurthii*, antioxydant, polyphénols, DPPH, FRAP, β-carotène.

Abstract

Atriplex halimus ssp. *schweinfurthii* (Guettaf) is a medicinal plant widely used in traditional medicine for the treatment of diabetes and heart diseases. In Algeria, it grows spontaneously in steppic areas. In this study, antioxidant activity of the studied plant is evaluated by different methods *in vitro*. Extraction of active substances is carried out by four solvents with different polarities, then, a quantification of phenolic compounds is realized in order to determine the total content of polyphenols, flavonoids and tannins in each extract. The highest extraction yields are obtained for aqueous extract (19.87%) and methanolic extract (10.92%), while acetone and hexane extracts showed lower yields (1.56% and 0.88%, respectively). The highest levels of total polyphenols are found in acetone and aqueous extracts (28.75 and 28.10 μg equivalent of gallic acid / mg of extract, respectively). Hexane and acetone extracts are the richest in flavonoids (43.96 and 31.94 μg equivalent of quercetin / mg of extract, respectively), while hexane extract showed the highest content of tannins (76.18 μg equivalent of tannic Acid / mg of extract). The DPPH test showed that extracts do not possess an important anti-radical power; the best activity is shown by hexane extract with an IC_{50} of 7.24 mg / ml. The most important reducing power is presented by acetone extract for all tested concentrations by the method of FRAP. In the β -carotene / linoleic acid test, all extracts showed an important antioxidant activity, while the highest percentage inhibition is shown by hexane extract with 92.47%.

Key words: *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*, antioxidant, polyphenols, DPPH, FRAP, β -carotene.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique.
AlCl ₃	Trichlorure d'Aluminium.
BHT	Butylated hydroxytoluene.
CAT	Catalase.
CLO ⁻	Hypochlorite.
DMSO	Dimethylsulfoxyde.
DPPH	1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl.
EAG	Equivalent d'acide gallique.
EAT	Equivalent d'acide tannique.
EQ	Equivalent de quercétine.
FeCl ₃	Chlorure de fer.
FRAP antioxydant power).	Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric reducing/
GPX	Glutathion peroxydase.
GSH	Forme réduite de Glutathion.
GSSG	Forme oxydée de Glutathion.
H ₂ O ₂	Peroxyde D'hydrogène.
IC50	Concentration inhibitrice de 50%.
I%	Pourcentage d'inhibition.
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide hydrogéné.
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
NOS	Oxide Nitrique Synthase.
Na ₂ CO ₃	Carbonate de Sodium.
NO	Monoxyde d'azote.
OH [•]	Radical hydroxyle.
OH ⁻	Ion Hydroxyde.
O ⁻	Anion Superoxyde.
ONOO [•]	Peroxynitrite.
¹ O ₂	Oxygène singulet.
RNS	Reactive Nitrogen Species (dérivés réactifs de l'azote).
ROS	Reactive Oxygen Species (dérivés réactifs de l'oxygène).

SOD	Superoxyde Dismutase.
UV-V	Ultraviolet-Visible.
XO	Xanthine oxydase.

Liste des figures

Figure 1 : Structure du noyau phénol	15
Figure 2 : Structure de base des acides phénoliques	16
Figure 3 : Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et d'un gallotanin.	17
Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes	17
Figure 5 : A : La plante <i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i> dans son environnement	20
B : Partie aérienne de la plante	20
Figure 6 : Préparation des extraits organiques de la plante <i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>Schweinfurthii</i>	22
Figure 7 : Procédure d'extraction aqueuse	23
Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	25
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	26
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	27
Figure 11 : Les concentrations des extraits d' <i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i> et de la quercétine inhibitrices de 50 % du radical DPPH (IC ₅₀)	35
Figure 12 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	36
Figure 13 : Pouvoir réducteur des extraits d' <i>Atriplex halimus</i>	37
Figure 14 : Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence des extraits d' <i>Atriplex</i> <i>halimus</i>	38
Figure 15 : Pourcentages d'inhibition des quatre extraits d' <i>Atriplex halimus</i> , du témoin positif (BHT) et des témoins négatifs après 24h d'incubation	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales classes des flavonoïdes	18
Tableau 02 : Rendements des extractions à partir des feuilles et des fleurs d' <i>Atriplex</i> <i>halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i>	31
Tableau 03 : Analyse phytochimique des extraits aqueux et organiques d' <i>A. halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i>	32
Tableau 04 : Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des extraits d' <i>Atriplex</i> <i>halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i>	33

SOMMAIRE

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

I- Revue bibliographique.

1- La plante <i>Atriplex Halimus</i>	03
1.1- La famille de <i>Chenopodiaceae</i>	03
1.1.1- Description botanique	03
1.1.2- Distribution géographique	03
1.2- Le genre <i>Atriplex</i>	03
1.2.1- Description botanique	03
1.2.2- Distribution géographique.....	04
1.2.3- Composition chimique.....	04
1.3- L'espèce <i>Atriplex halimus</i>	04
1.3.1- Description botanique et habitat	04
1.3.2- Classification	05
1.3.3- Noms vernaculaires	05
1.3.4- Utilisations de la plante	06
1.3.4.1- Applications thérapeutiques	06
1.3.4.2- Usages alimentaires	06
1.3.4.3- Autres utilisations	06

2- Les radicaux libres et les antioxydants	07
2.1- Les radicaux libres	07
2.1.1- Définition	07
2.1.2- Les principaux radicaux libres	07
2.1.2.1- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	07
2.1.2.2- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	07
2.1.2.3- Le radical hydroxyle ($HO\bullet$)	08
2.1.2.4- L'oxygène singulet ($^1 O_2$)	08
2.1.2.5- Le monoxyde d'azote (NO)	08
2.1.2.6- Le radical peroxy nitrite ($ONOO^{\bullet}$)	09
2.1.3- Sources des ROS	09
2.1.3.1- Sources internes	09
A- Chaîne mitochondriale de transport d'électrons	09
B- Cellules immunitaires	10
C- La xanthine oxydase	10
2.1.3.2- Sources externes	11
2.1.4- Le stress oxydatif	11
2.1.5- Les maladies liées au stress oxydant	11
2.2- Les antioxydants	12
2.2.1- Définition	12
2.2.2- Types des antioxydants	12
2.2.2.1- Les antioxydants enzymatiques	12
A- La superoxyde dismutase (SOD)	12
B- La catalase.....	12
C- La glutathion peroxydase.....	13
2.2.2.2- Les antioxydants non enzymatiques.....	13
A- Les vitamines (C et E)	13
B- Les oligoéléments	13

C- Les caroténoïdes	14
D- Le glutathion	14
3- Les polyphénols	14
3.1- Définition et structure chimique	14
3.2- Classification des polyphénols	15
3.2.1- Polyphénols simples (Acides phénoliques).....	15
A - Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)	15
B - Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)	15
3.2.2- Polyphénols complexes	16
3.2.2.1- Les tannins.....	16
A - Tannins hydrolysables	16
B - Tannins condensés	16
3.2.2.2- Flavonoïdes	17
3.3- Activités biologiques des polyphénols.....	19

II- Matériel et Méthodes.

1- Matériel	20
1.1- Matériel végétal	20
1.2- Réactifs chimiques	21
2- Méthodes	21
2.1- Préparation des extraits de la plante <i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i>	21
2.1.1- Préparation des extraits organiques	21
2.1.2- Préparation de l'extrait aqueux	23
2.2- Etude phytochimique des extraits	24
2.2.1- Les flavonoïdes.....	24
2.2.2- Les tannins.....	24

2.2.3- Les quinones	24
2.2.4- Les terpénoïdes.....	24
2.2.5- les saponines.....	24
2.3- Dosage de quelques métabolites secondaires.....	25
2.3.1- Dosage des polyphénols totaux	25
2.3.2- Dosage des flavonoïdes	26
2.3.3- Dosage des tannins totaux.....	27
2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits d' <i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i> .	28
2.4.1- Effet piègeur des extraits contre le radical DPPH	28
2.4.2- Test de réduction du fer (FRAP).....	29
2.4.3- Test de β - carotène/acide linoléique	29
2.5- Etude statistique.....	30

III- Résultats et discussion.

1- Extraction	31
2- Screening phytochimique.....	32
3- Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux.....	33
4- Activité antioxydante des extraits d'<i>Atriplex halimus</i> ssp. <i>schweinfurthii</i>	34
4.1- Effet de piégeage du radical DPPH.....	34
4.2- Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).....	36
4.3- Test du β - carotène/acide linoléique.....	38
Conclusion et perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	42

Introduction

Depuis des milliers d'années l'homme a toujours eu recours aux plantes médicinales pour se soigner et lutter contre les maladies, cependant, l'utilisation des plantes médicinales était pratiquée d'une manière empirique, sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Aujourd'hui, avec les avancées scientifiques, il devient facile d'isoler, d'identifier et de quantifier les molécules responsables de l'action pharmacologique de ces plantes (Sekkoum, 2014). Actuellement, environ plus de 30% des médicaments contiennent des principes actifs d'origine naturelle (Odile et Daniel, 2007).

Les polyphénols sont des composés naturels à une distribution très large dans le règne végétal, ils ont une grande importance notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Ces composés sont connus pour leurs activités biologiques diverses à savoir l'activité antioxydante (Koechlin, 2006).

Le stress oxydatif correspond à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la carence en micronutriments antioxydants ou cofacteurs des systèmes enzymatiques antioxydants (Jean Marie, 2002). Toutefois une augmentation du stress oxydant peut entraîner des destructions tissulaires et provoquer des lésions au niveau des structures cellulaires (Pincemail *et al.*, 2002). Les antioxydants naturels présentent alors un rôle important dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif (Vârban *et al.*, 2009).

La sous-espèce *Atriplex halimus ssp. schweinfurthii* connue localement par Guettaf, est une plante qui appartient à la famille des *Chenopodiaceae*, elle se retrouve dans les zones steppiques en Algérie. En médecine traditionnelle, elle est largement connue pour ces propriétés hypoglycémiantes et hypolipémiantes (Yaniv *et al.*, 1987 ; Mirsky et Nitsa, 2001), elle est utilisée aussi pour le traitement des maladies cardiaques (Bellakhdar, 1997 ; Said *et al.*, 2000). A notre connaissance, peu d'études sont effectuées sur les activités biologiques de cette plante.

L'objectif essentiel de notre travail est d'étudier l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des feuilles et des fleurs de la plante médicinale *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*.

Cette étude est une contribution à :

- La préparation des extraits aqueux et organiques à partir de la plante étudiée.
- Le dosage spectrophotométrique des substances bioactives (composés phénoliques).
- L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits de la plante en utilisant trois techniques différentes : le piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur du fer et le test de blanchissement de β -carotène.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1. La plante *Atriplex halimus*

1.1- La famille des *Chenopodiaceae*

1.1.1- Description botanique

Les *Chenopodiaceae* sont des herbes annuelles ou vivaces, sous-arbrisseaux, arbrisseaux ou arbustes. Ces plantes ont des racines profondes et pénétrantes, destinées à absorber la plus grande quantité d'eau possible (Rosas, 1989) ; les feuilles sont ordinairement alternes, non stipulées, rarement opposées, parfois très réduites ; les fleurs sont petites, mâles ou femelles ou unisexuées ; le fruit est presque toujours un akène dont la graine renferme soit un embryon courbé et un péricarpe, soit un embryon spiralé accompagné ou non de péricarpe (René, 1962). Parmi les genres existant en Algérie, on citera : *Oreobliton*, *Chenopodium*, *Anabasis*, *Salicornia*, *Kochia*, *Bassia* et *Atriplex* (Quèzel et Santa, 1962).

1.1.2- Distribution géographique

Les *Chenopodiaceae* sont largement répandues dans les habitats salins tempérés et subtropicaux, en particulier dans les régions littorales de la Mer Méditerranéenne, de la Mer Rouge, dans les steppes arides de l'Asie centrale et orientale, aux marges du désert du Sahara, dans les prairies alcalines des Etats-Unis, dans le Karoo, en Australie, et dans les Pampas Argentines (Rosas, 1989).

1.2- Le genre *Atriplex*

1.2.1- Description botanique

Le genre *Atriplex* appartient à la famille des *Chenopodiaceae*, il est associé aux sols salins ou alcalins et aux milieux arides, désertiques ou semi-désertiques (Rosas, 1989 ; Mulas, 2004).

Les fleurs sont unisexuées, monoïques ou dioïques avec parfois quelques-unes hermaphrodites ; fleurs mâles sans bractées et fleurs femelles avec deux bractées, à ovaire uniloculaire et uniovulé à deux styles filiformes. Le fruit est membraneux, comprimé dans les deux bractées de la fleur femelle ou hermaphrodite (Périanthe fructifère ou valves fructifères). La graine est lenticulaire, noire et disposée verticalement (sauf dans les fleurs hermaphrodites où elle est horizontale) (Quèzel et Santa, 1962).

1.2.2- Distribution géographique

Le genre *Atriplex* comprend près de 420 espèces réparties dans les diverses régions arides et semi arides du monde (le Houerou, 1993). Il est rencontré dans toutes les parties du monde, de Alaska à la Patagonie, de la Bretagne à la Sibérie et de la Norvège à l'Afrique du sud (Franclet et le houerou, 1971), et inclut 48 espèces et sous espèces dans le bassin méditerranéen (Maalem, 2002) où il est spontané dans les étages bioclimatiques, et les plus grandes superficies correspondant aux zones steppiques (Batna, Biskra, M'sila, Djelfa, Saida, Tbessa et Tiaret) (Pouget, 1980). Ce genre renferme plusieurs espèces intéressantes, mais celles qui figurent parmi les plus communes en Algérie sont : *A.littoralis* L, *A.patula* L, *A.rosea* L, *A.hastata* L, *A.halimus* L (Quèzel et Santa, 1963).

1.2.3- Composition chimique

La composition chimique des espèces du genre *Atriplex* montre la présence des phénols, des saponines glycosides, des alcaloïdes, des tannins, des résines, des betaines et des flavonoïdes dont les flavonols constituent la classe chimique majeure chez la plupart de ces espèces (Bylka *et al.*, 2001; Bylka *et al.*, 2004; Erdman *et al.*, 2006; Benhammou *et al.*, 2009).

Parmi les flavonols aglycones identifiés, on cite : le kaempferol, la quercétine, et la spinacétine. Le kaempférol 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside et la quercétine 3-O-sulphate-7-O-arabinopyranoside ont été isolés des feuilles d'*A. Hortensis* (Bylka *et al.* 2001), ainsi que la naringine, la naringenine 7-O-glucoside de l'espèce *A. farinosa* (Al-Jaber *et al.*, 1991).

1.3- L'espèce *Atriplex halimus*

1.3.1- Description botanique et habitat

Atriplex halimus L. est un arbuste très rameux, formant des touffes pouvant atteindre de 1 à 3 m de diamètre, et de 1 à 3 m de haut, à parties herbacées glauques, couvertes de poils. Les racines sont blanchâtres et les tiges sont dressées puis étalées, arrondies, blanchâtres. Les feuilles sont alternes, simples, vert argenté et plus ou moins charnues, assez grandes et font de 2 à 5 cm de longueur et de 0,5 à 1 cm de largeur, avec un court pétiole, ovales arrondies lorsqu'elles sont jeunes, luisantes couvertes de poils vésiculaires très riches en sel (Guittonneau et Huon, 1983 ; Duperat, 1997). Les fleurs sont monoïques, glomérulées, les glomérules femelles à la base et males au sommet. La graine est verticale, lenticulaire, à marge obtuse, mate, lisse, brune-noire ;

embryon annulaire, à radicule ascendante, à extrémité un peu saillante vers le milieu de la graine. Sa floraison a lieu entre le mois de Mai et Décembre (René, 1962 ; Echevin, 1964). Cette espèce est une xero-halophyte très résistante à la sécheresse (Le Houerou, 2000). L'espèce *Atriplex halimus* est spontanée à l'intérieur d'une aire relativement vaste englobant les pays du nord de l'Afrique et de proche et Moyen-Orient depuis les Iles canaries jusqu'à l'Iran. Vers le sud, l'espèce atteint le massif de l'Ahagar. En Europe, l'espèce est présente en plus de la zone méditerranéenne en Bulgarie (le floch, 1989).

1.3.2. Classification

Il existe deux sous-espèces d'*A. Halimus*: *halimus* diploïde, se trouve dans les régions semi-arides moins salées, tandis que la sous-espèce étudiée dans ce travail est dite *schweinfurthii*, elle est tétraploïde et occupe les régions arides salées (Hamdi et Ziani, 2000 ; Maalem, 2002).

La classification de la sous-espèce étudiée est comme suit (René, 1962 ; Singh, 2004) :

Embranchement :	<i>Spermaphyta</i>
Sous-Embr :	<i>Angiospermae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe :	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre :	<i>Caryophyllales</i>
Famille :	<i>Chenopodiaceae</i>
Genre :	<i>Atriplex</i>
Espèce :	<i>halimus L.</i>
Sous espèce :	<i>Atriplex halimus ssp. schweinfurthii</i>

1.3.3- Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de cette plantes sont :

- En français : Arroche sauvage, Pourpier de mer.
- En anglais : Mediterranean saltbush.
- En arabe : Guettaf.

1.3.4- Utilisations de la plante

1.3.4.1- Applications thérapeutiques

Son utilisation dans la médecine traditionnelle est largement connue pour ces propriétés hypoglycémiantes et hypolipidémiantes (Yaniv *et al.*, 1987 ; Mirsky et Nitsa, 2001). On utilise aussi *A. halimus* pour soigner les inflammations des voies urinaires (cystites) et les lithiases urinaires (Belouad, 2001 ; Emam, 2011). Au Sahara occidental, les cendres d'*A. halimus* potentialisent l'effet de l'insuline (Shani *et al.*, 1972 ; Mertz *et al.*, 1973 ; McKell *et al.*, 1994 ; Mirsky et Nitsa., 2001), aussi elles sont utilisées dans le traitement de l'acidité gastrique. Les graines, crues et broyées, sont ingérées comme vomitif (Bellakhdar, 1997). Les racines, découpées en lanières à la manière du siwak, servent pour les soins de la bouche et des dents. Les feuilles sont utilisées pour le traitement des maladies cardiaques et de diabète (Bellakhdar, 1997 ; Said *et al.*, 2000). Les Sahariens attribuent aussi à cette plante la propriété de soigner le debbab qui est une maladie grave du dromadaire causée par un trypanosome dont les vecteurs sont les taons.

1.3.4.2 - Usages alimentaires

Les Touaregs récoltent les graines qui sont broyées et utilisées, cuites à l'eau, pour fabriquer des bouillies ou des galettes. Au Sahara, on consomme aussi les bourgeons et les feuilles de la plante à l'état naturel ou cuits à l'eau puis essorés pour enlever les sels (Bellakhdar, 1997).

1.3.4.3 - Autres utilisations

Comme beaucoup de *Chenopodiaceae* riches en sels alcalins, *A. halimus* L. produit par incinération des cendres soudées, employées pour le dégraissage des vêtements et pour la préparation du savon. Le Pourpier de mer était même, autrefois utilisé pour la fabrication du verre. On les utilisait aussi pour mordantage dans certaines teintures (Bellakhdar, 1997).

2- Les radicaux libres et les antioxydants

2.1- Les radicaux libres

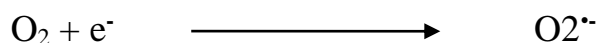
2.1.1- Définition

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et 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). Un radical libre est le plus souvent instable, très réactif donc sa demi-vie est très courte (Tessier et Marconnet, 1995 ; Goudable et Favier, 1997), ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ROS) ou du nitrogène (RNS) (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

2.1.2- Les principaux radicaux libres

2.1.2.1- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

L'anion superoxyde est une espèce réactive oxygénée formée par la capture d'un électron par la molécule d'oxygène (Marquardt *et al.*, 1999).



2.1.2.2- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Il est produit en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction. Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule et utilisé par la myéloperoxydase pour produire de l'hypochlorite qui permet de tuer les micro-organismes pathogènes (Helliwell *et al.*, 1999).

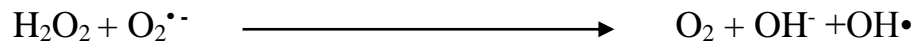


2.1.2.3- Le radical hydroxyle (HO•)

Le radical OH• est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques. C'est le produit de la réduction mono-électronique de H₂O₂, en présence des ions métalliques de basse valence comme le Fe²⁺ ou le Cu⁺ (réaction de Fenton) (Yung-Zhong *et al.*, 2002).

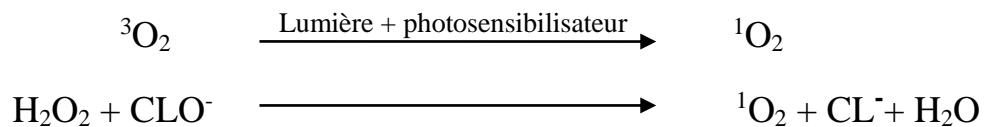


Ou par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction de Haber et Weiss) (Sorg, 2004).



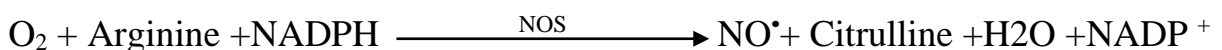
2.1.2.4- L'oxygène singulet (¹O₂)

Bien que l'oxygène singulet ne soit pas un radical libre, c'est une espèce d'oxygène réactive avec de fortes propriétés oxydantes ; cette molécule peut rapidement oxyder les lipides et les convertir en peroxydes lipidiques. Il est généré lors de certaines réactions physiologiques et physiopathologiques (phagocytose et biosynthèse des prostaglandines) par des réactions d'oxydation incluant celles induites par la peroxydase et la lipooxigénase entre différents ROS (Sorg, 2004 ; Chen *et al.*, 2012), ou encore par excitation du ³O₂ en présence de photosensibilisateurs mais aussi par des processus chimiques (comme la réaction de H₂O₂ avec CLO⁻) (Patel *et al.*, 2000).



2.1.2.5- Le monoxyde d'azote (NO)

L'oxyde nitrique est produit par l'oxydation de l'un des atomes N-terminaux dans la L-arginine (Sorg, 2004), Il est synthétisé par les nitrososynthases (NOS) (Coleman, 2001) selon la réaction :



La grande réactivité du monoxyde d'azote vis-à-vis des composés radicalaires comme l'oxygène moléculaire qui est un bi-radical ou l'anion superoxyde est due au fait qu'il est lui-même un composé radicalaire, son spin électronique total vaut 1/2 (Gabbai *et al.*, 1995). C'est un important neurotransmetteur, il franchit facilement les membranes biologiques et passe d'une cellule à l'autre (Crépel et Lemaire, 1995).

2.1.2.6- Le radical peroxydinitrite (ONOO⁻)

Le peroxydinitrite est un ion de formule ONOO⁻, C'est un isomère structural instable de nitrate (NO⁻³). Bien que son acide conjugué soit hautement réactif, le peroxydinitrite est stable dans les solutions basiques (Koppenol, 1998). Le peroxydinitrite est un oxydant et un agent nitrant. En raison de ses propriétés oxydantes, il peut endommager un large éventail de molécules dans les cellules, y compris l'ADN et les protéines. Il résulte de l'union de NO et O₂⁻ (Szabó *et al.*, 2003).



2.1.3- Sources des ROS

La production des radicaux libres peut être d'origine interne ou externe.

2.1.3.1- Sources internes

A- Chaîne mitochondriale de transport d'électrons

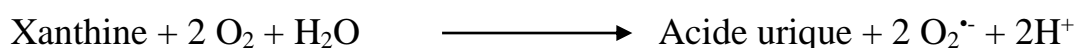
De nombreuses études suggèrent que la mitochondrie est la source principale des ROS endogènes (Kannan *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2002). En effet, environ 80 % de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, soit l'ajout de 4 électrons qui conduit à la production d'eau (Halliwell, 2006). Cette réaction se produit dans le complexe IV de la chaîne de transport mitochondriale, par contre, une faible quantité d'électrons peut s'échapper de la chaîne de transport des électrons et ainsi réduire en partie l'oxygène. On estime qu'environ 2 % de l'oxygène utilisé par la respiration subit une réduction mono-électronique, soit l'ajout d'un électron à une molécule d'oxygène qui conduit à la formation d'un radical O₂⁻ (Halliwell, 2006).

B- Cellules immunitaires

L'inflammation est également considérée comme une source importante des ROS. Il a été montré qu'une grande quantité de ROS est produite par les cellules immunitaires, plus particulièrement les cellules phagocytaires. Ces cellules produisent des $O_2^{\bullet -}$, des OH^{\bullet} et du H_2O_2 pour éliminer les microorganismes pathogènes et les cellules cancéreuses. En effet, certaines cellules phagocytaires sont capables, après activation de la NOS inducible, de produire des dérivés nitrés, tels que le NO^{\bullet} . Ainsi, la production simultanée de NO^{\bullet} et de $O_2^{\bullet -}$ dans le milieu s'avère très nocive puisqu'il y a formation de $ONOO^-$, un produit très réactif et qui est responsable de la majorité des effets dommageables attribués au NO^{\bullet} (Favier, 2006 ; Salganik, 2001).

C- La xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique en réduisant le O_2 en $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 . La production des ROS par la xanthine oxydase est considérée comme la principale source du stress oxydant dans certaines conditions pathologiques telles que l'ischémie/reperfusion (Mckelvey *et al.*, 1988 ; Parks *et al.*, 1988).



Par ailleurs, l'activité de certaines enzymes participe également à la production des radicaux libres, on trouve principalement les familles d'enzymes comme le cytochrome P-450 et le cytochrome b5 (réticulum endoplasmique), les cytochromes oxydases, la glycolate oxydase, la D-amino acide oxydase, l'urate oxydase, la L-hydroxyacide oxydase, l'acyl-CoA oxydase (Peroxisomes), la myéloperoxydase, la lipooxygénase et la cyclooxygénase (Younes, 1999 ; Thannickal *et al.*, 2000).

2.1.3.2-Sources externes

Les ROS sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, les rayonnements (UV, X), la consommation excessive d'alcool, le tabagisme, certains polluants industriels et l'exercice physique intense sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction d'ERO dans notre organisme, (Ribéreau-gayon, 1968 ; Linard *et al.*, 1976 ; Prigent *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2009).

2.1.4- Le stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées et le système de défense antioxydant de l'organisme, en faveur des premiers (Sies, 1985). Lorsque les ROS sont générées en grandes quantités, elles deviennent pathologiques car elles interagissent avec les molécules biologiques (protéines, lipides, ADN) (Pincemail *et al.*, 2002).

2.1.5- Les maladies liées au stress oxydant

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontrée (Favier, 2003).

En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes, allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Pincemail, *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Valko, 2007). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Sohal, 2002).

2.2- Les antioxydants

2.2.1- Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Servais, 2004).

2.2.2- Types des antioxydants

Les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydants classés en antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Loïc, 2011 ; Gardès *et al.*, 2003).

2.2.2.1- Les antioxydants enzymatiques

A- La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est l'une des enzymes cellulaires les plus importantes possédant une fonction antioxydante, elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et en eau oxygénée selon la réaction (Murray *et al.*, 2013):



B- La catalase

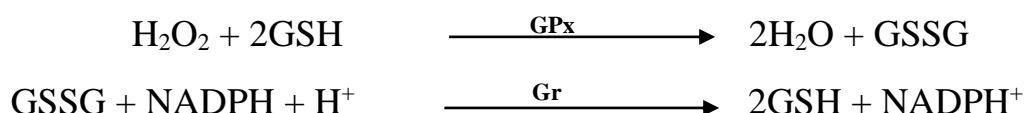
La catalase est une enzyme hémunique qui catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD) en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes (Valko *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2013).



Dans le processus de détoxification, la CAT constitue le premier rempart contre l'effet toxique du peroxyde d'hydrogène (Masaki *et al.*, 1998).

C- La glutathion peroxydase

Le rôle de la (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (Marfak ,2003). Elle joue un rôle essentiel dans le cycle redox car elle permet le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un faible taux de GSSG (Deponce, 2013). Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (Marfak, 2003).



2.2.2.2-Les antioxydants non enzymatiques

A- Les vitamines (C et E)

L'acide ascorbique est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger et neutraliser les espèces réactives de l'oxygène à des concentrations très faibles (Césarini, 2004) ; il est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produits par divers systèmes générateurs des ROS (Gey *et al.*, 1998) ; Il permet aussi la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vitamine E est un antioxydant liposoluble, qui se fixe au sien des membranes lipidiques à proximité des acides gras hautement insaturés, elle empêche les modifications ou déstabilisations des structures membranaires, elle peut donc protéger de façon optimale l'organisme contre les effets nocifs des radicaux libres (Packer *et al.*, 2001). Elle est capable d'arrêter les chaines radicalaires en faisant réagir son groupement phénol avec des radicaux peroxydes lipidiques (L-OO) (Roberfroid, 2002).

B- Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes (Garait, 2006).

C- Les caroténoïdes

Les pigments caroténoïdes sont largement présents dans la nature, ils jouent un rôle important dans la protection cellulaire de l'organisme. La plupart des caroténoïdes et la vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats comme les acides gras poly-insaturés (Jean, 2005), elles agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail *et al.*, 2002 ; koechlin , 2006). Une molécule de bêta carotène semble capable d'inactiver plusieurs centaines de molécules d'oxygène singulet (Urban *et al.*, 1995).

D- Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide naturelle composé de trois acides aminés : la glycine, le glutamate et la cystéine. Il est produit dans différents tissus à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mM chez les mammifères (Lu, 2013). Il joue un rôle de cofacteur de nombreuses enzymes comme les glutatathion – peroxydases et transférases (Pompella *et al.*, 2003), il régénère également les principaux antioxydants hydro et liposolubles, tels que l'ascorbate et l' α -tocopherol. Le cytosol est le principal site cellulaire de la synthèse du GSH, à partir duquel il est distribué aux autres compartiments cellulaires (Valko *et al.* , 2007).

3- Les polyphénols

3.1- Définition et structure chimique

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1993).

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Mompon *et al.*, 1998). Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de tous les végétaux (Middleton *et al.*, 2000).

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Figure 1) (Bruneton ,1999 ; Balasundram *et al.*, 2006).

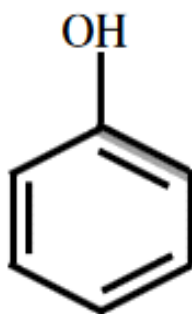


Figure 1 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).

3.2- Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Clifford, 1999 ; D'Archivio *et al.*, 2007).

3.2.1- Polyphénols simples (Acides phénoliques)

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Thompsen *et al.*, et 1984).

A- Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C₆-C₃)

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés (Skerget *et al.*, 2005), et peuvent également être acidifiés ou combinés avec des sucres (O acylglucosides, O arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Figure 2) (Thompsen et Mottola, 1984).

B- Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C₆-C₁)

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (Thompsen *et al.*, 1984 ; Afanas'ev *et al.*, 1989). Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (Figure 2) (Murota *et al.*, 2004).

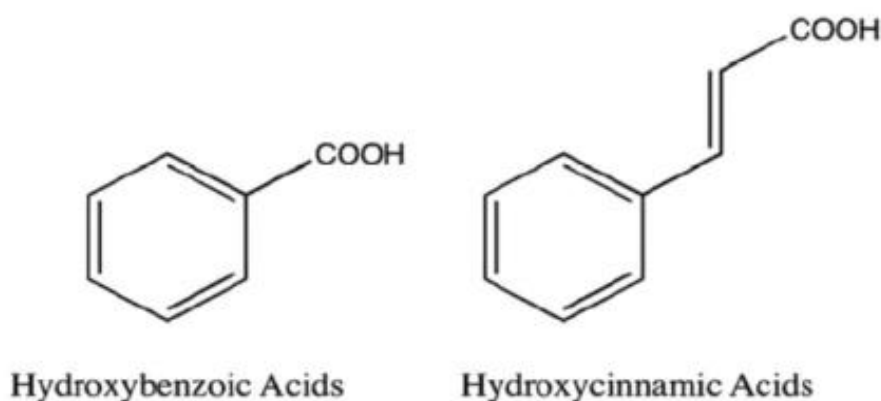


Figure 2 : Structure de base des acides phénoliques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

3.2.2- Polyphénols complexes

3.2.2.1- Les tannins

Les tannins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Aguilera *et al.*, 2008). Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés phénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, d'où leur capacité à tanner la peau (Manach *et al.*, 2004). Sur le plan structural, les tannins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Figure 3) (Monteiro *et al.*, 2007).

A - Tannins hydrolysables

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Cheng *et al.*, 2007 ; Monties *et al.*, 1969). Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (Nagata *et al.*, 1992).

B - Tannins condensés

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Monties *et al.*, 1969 ; Danglettere, 2007).

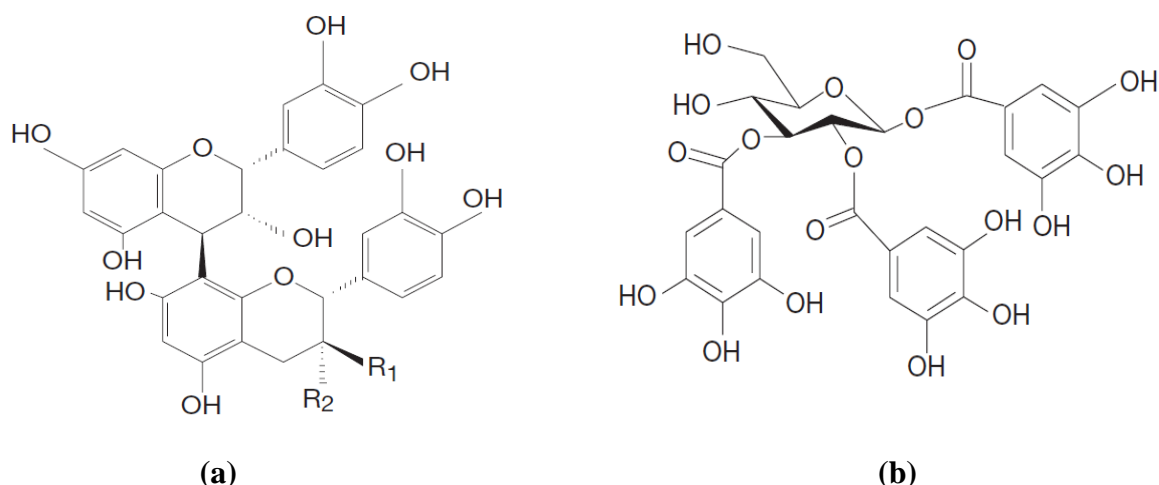


Figure 3 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) (Sikora F.J, 1990).

3.2.2.2-Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C₆-C₃-C₆ (Figure 4) ; ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques (De Souza, De Giovanni. 2004).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes (Tableau 1), La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (Afanas'eva *et al.*, 2001).

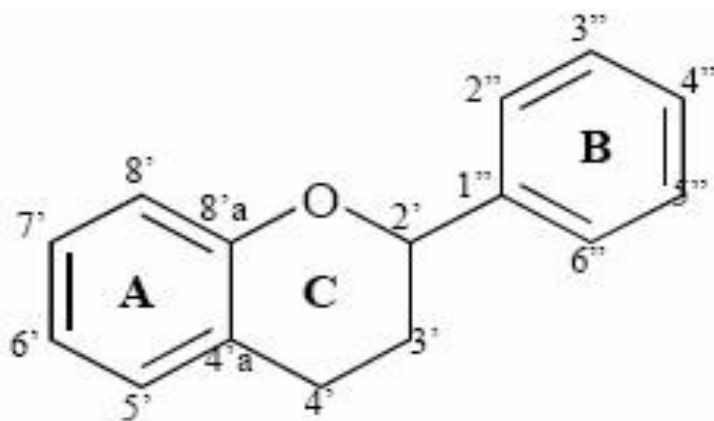
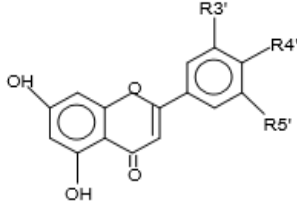
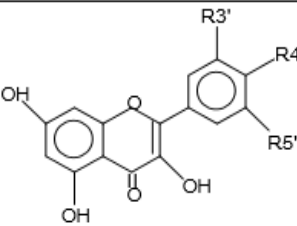
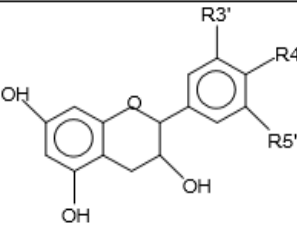
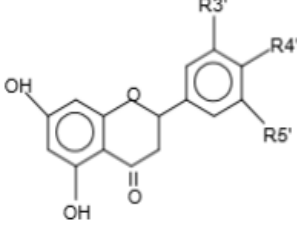
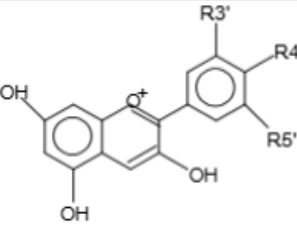
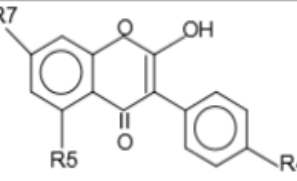


Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes (Korkina et Afanas'ev, 1997).

Tableau 1 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001 ; Erdman *et al.*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

3.3- Activités biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités anti allergique, anti-atherogénique, antivirale, hépatoprotective, antimicrobienne, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes sont utilisés afin de traiter de nombreuses maladies en utilisant leur capacité à inhiber spécifiquement certaines enzymes, pour stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs (Havsteen, 2002). Leur principale propriété est d'être « veino-actifs » c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leurs résistances (Marouf, 2007). En plus, ils sont pourvus de propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcéreuses (Di Carlo *et al.*, 1999). Plusieurs études épidémiologiques et ceux réalisées sur différentes lignes cellulaires ont démontré le potentiel anti-tumoral et anticancéreux des flavonoïdes (Birt *et al.*, 2001). Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry, 1983).

De nombreux composés phénoliques réagissent avec les radicaux libres empêchant ainsi les dégradations liées à leur réactivité intense au niveau des phospholipides membranaires (Halliwell *et al.*, 1993). En plus de l'inhibition de l'oxydase, l'activité antioxydante des polyphénols est due à leur capacité de capter les radicaux libres et/ou de chélater les ions métalliques du fer et du cuivre (Halliwell, 2007). Ces composés pourraient réduire les perturbations oxydatives variées qui aggravent les maladies chroniques et les états physiopathologiques comme par exemple l'infarctus et l'athérosclérose (Kinsella *et al.* 1993).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1- Matériel

1.1- Matériel végétal

La plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* a été récoltée en Décembre 2017 dans la région de Draa El-Hadjja à M'sila (Figure 5). Elle a été identifiée par Dr. Negadi Mohamed (Département des sciences agronomiques, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj).

(A)



(B)



Figure 5 : **A :** La plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* dans son environnement.
B : Partie aérienne de la plante (20/12/2017).

La plante a été nettoyée afin de la débarrasser de la poussière et d'autres impuretés, puis séchée durant trois semaines dans un endroit sec à l'abri de la lumière et de la poussière. Après séchage, les feuilles et les fleurs ont été séparées du reste de la plante, broyées et utilisées pour l'extraction.

1.2- Réactifs chimiques

Tous les produits chimiques utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich, Riedel-de-haën, Fluka, prolabo et Biochem. Les solvants utilisés proviennent de Honeywell, Sigma-Aldrich et AnalaR NORMAPUR.

2- Méthodes

2.1- Préparation des extraits de la plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*

Dans le but de l'extraction des composés actifs de la plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*, une série de quatre macérations a été effectuée par des solvants à différentes polarités (l'hexane, l'acétone, le méthanol, et l'eau distillée).

2.1.1- Préparation des extraits organiques

L'extraction a été réalisée selon la méthode de (Siracusa *et al.*, 2011), avec quelques modifications.

50 g du matériel végétal ont été macérés dans 500 ml d'hexane sous agitation durant 1 h. Le mélange obtenu a été conservé à température ambiante durant 48 h à l'abri de la lumière avec agitation occasionnelle. Cette procédure d'extraction a été répétée en utilisant le résidu de la plante issue de la filtration de la première macération par l'acétone puis par le méthanol. Les filtrats obtenus sont soumis à une évaporation par un rotavapor BÜchi à 45°C. Les extraits obtenus sont ensuite séchés à l'étuve et conservés à 4°C (Figure 6).

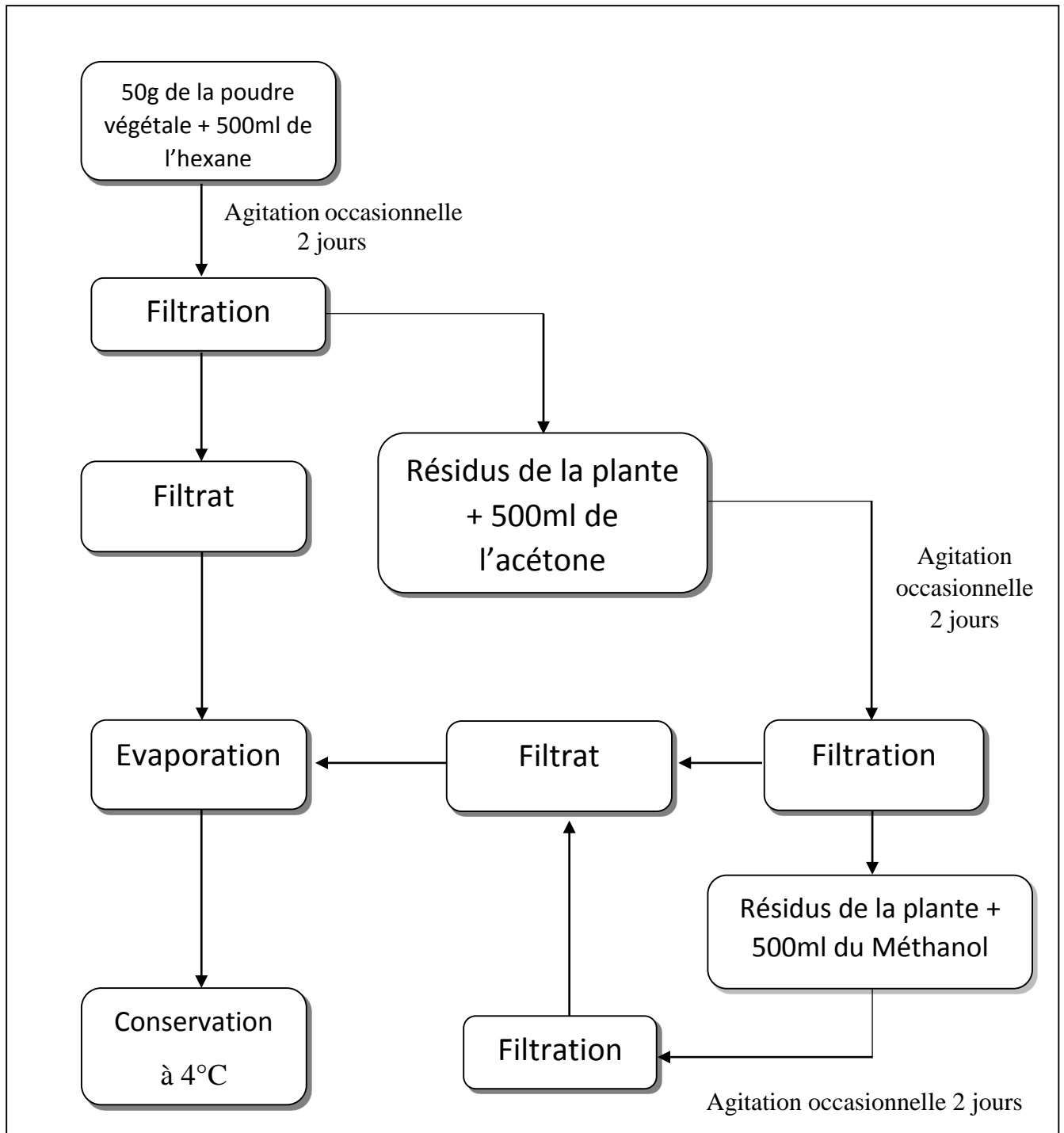


Figure 6 : Préparation des extraits organiques de la plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* (Siracusa et al., 2011).

2.1.2- Préparation de l'extrait aqueux

L'extraction aqueuse a été réalisée selon la méthode de (Gnanaprakash *et al.*, 2010). Suivant cette méthode, 40 g de la plante ont été ajoutés à 400 ml d'eau distillée avec agitation à 70°C dans un bain marie pendant 1 h. Le mélange est laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec agitation occasionnelle durant 48 h. Le mélange a été filtré à l'aide du coton et ensuite par du papier whatman. L'eau est ensuite évaporée et l'extrait est séché puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 7).

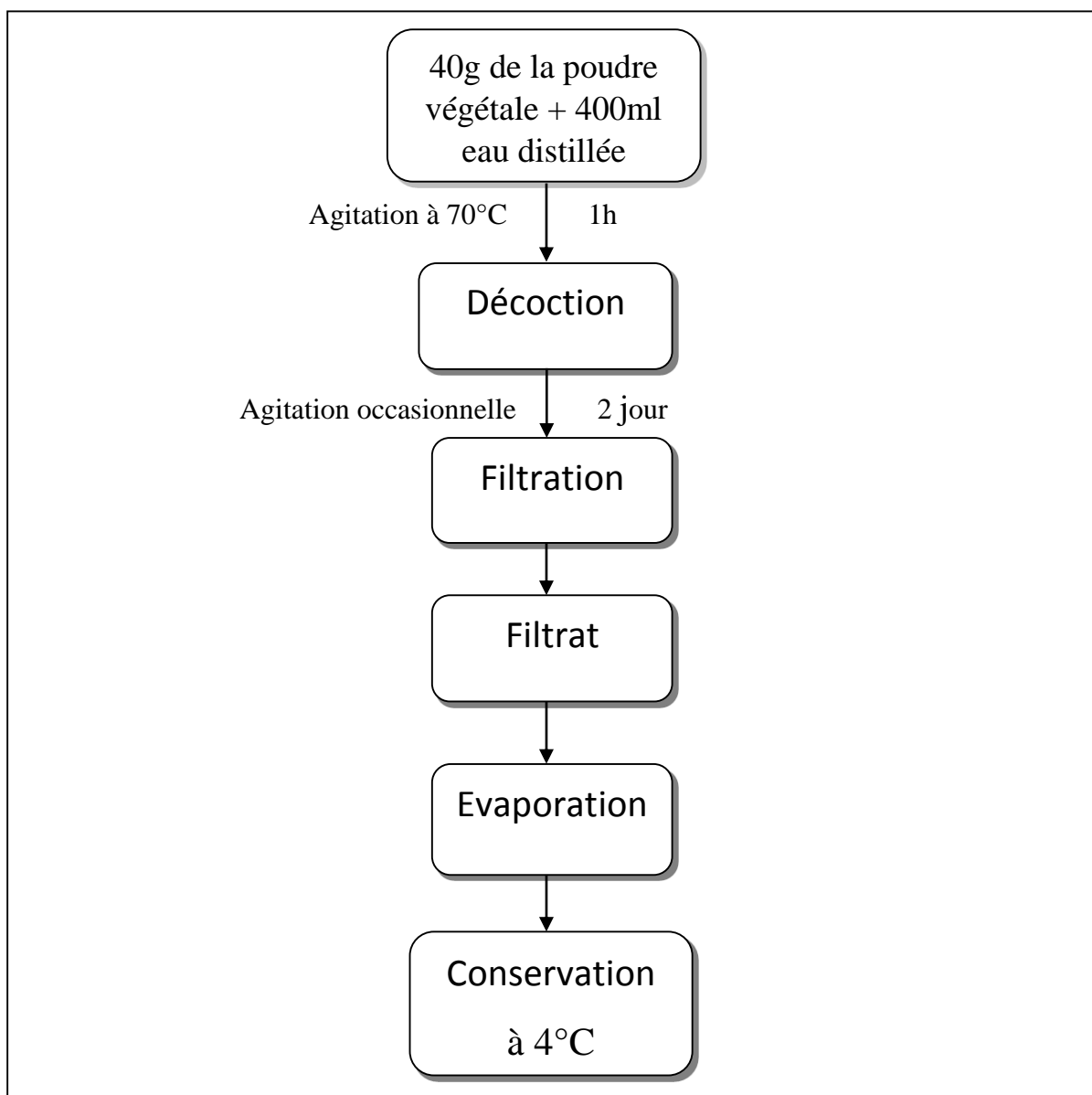


Figure 7 : Procédure d'extraction aqueuse (Gnanaprakash *et al.*, 2010).

2.2- Etude phytochimique des extraits

Des tests phytochimiques sont réalisés pour détecter les principales familles chimiques dans les extraits aqueux et organiques de la plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* (Sunil *et al.*, 2012).

2.2.1- Les flavonoïdes

Quelques gouttes d'hydroxyde de sodium dilué (NaOH) sont ajoutées à 1 ml de chaque extrait (4mg/ml), une couleur jaune intense a été produite dans l'extrait de la plante qui devient incolore lorsqu'on ajoute quelques gouttes d'acide dilué ce qui indique la présence des flavonoïdes.

2.2.2- Les tannins

Quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃) à 0.1% sont ajoutées à 1 ml d'extrait (4mg/ml). La présence des tannins est indiquée par la formation d'un précipité noir bleuté ou noir verdâtre.

2.2.3- Les quinones

0.5 ml d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) est ajouté à 0.5 ml de chaque extrait (4mg/ml). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration rouge.

2.2.4- Les terpénoïdes

0.5 ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de chaque extrait à une concentration de 4 mg/ml, 0.75 ml d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) sont ensuite ajoutés. La formation d'un anneau brun rougeâtre à l'interface indique la présence des terpénoïdes.

2.2.5- les saponines

0.5 ml d'extrait (4mg/ml) sont dilués avec 3 ml d'eau distillée puis agités vigoureusement pendant 15 minutes. La formation d'une mousse persistante confirme la présence des saponines.

2.3- Dosage de quelques métabolites secondaires

2.3.1- Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits de la plante est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin–Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Elle est basée sur la réduction en milieu alcalin d'un mélange de phosphotungstène (WO_4^{2-}) et phosphomolybdène (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un produit de réduction de couleur bleue.

200 μ l de chaque extrait dissout dans le DMSO, à une concentration de 2 mg/ml, sont ajoutées à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu dix fois dilué. Les solutions sont mélangées et incubées pendant 4 minutes. Ensuite, 800 μ l de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g /l) sont ajoutées. Le mélange final est secoué et incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini-1240) à 765 nm.

La courbe d'étalonnage est établie en utilisant l'acide gallique (préparé dans le méthanol) comme standard (20-100 μ g/ml) et les concentrations des polyphénols dans les quatre extraits sont calculées à partir de l'équation de régression et exprimées en μ g d'équivalent d'acide gallique/mg d'extrait sec (μ g EAG/mgE) (Figure 8).

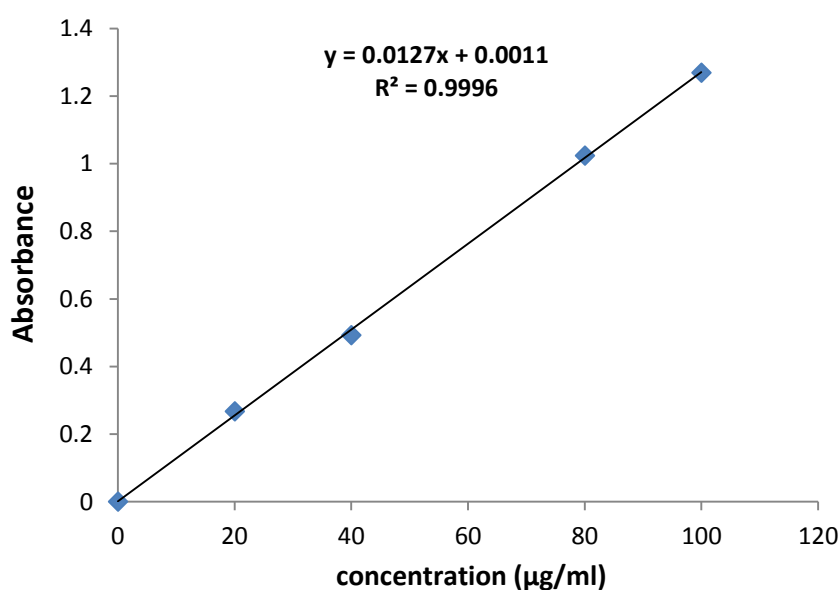


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.2- Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) décrite par (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits étudiés. Elle se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium.

1 ml d'une solution aqueuse d' AlCl_3 (2%) est ajouté à 1 ml de chaque extrait à une concentration de (2 mg/ml), dont les extraits sont dissouts dans le DMSO alors que la quercétine est préparée dans le méthanol. Le blanc utilisé ne contient pas l'extrait mais seulement le solvant (DMSO). Après incubation à l'obscurité durant 10 mn, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (10-50 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en μg d'équivalent de la quercétine/mg d'extrait sec ($\mu\text{g EQ/mgE}$) (Figure 9).

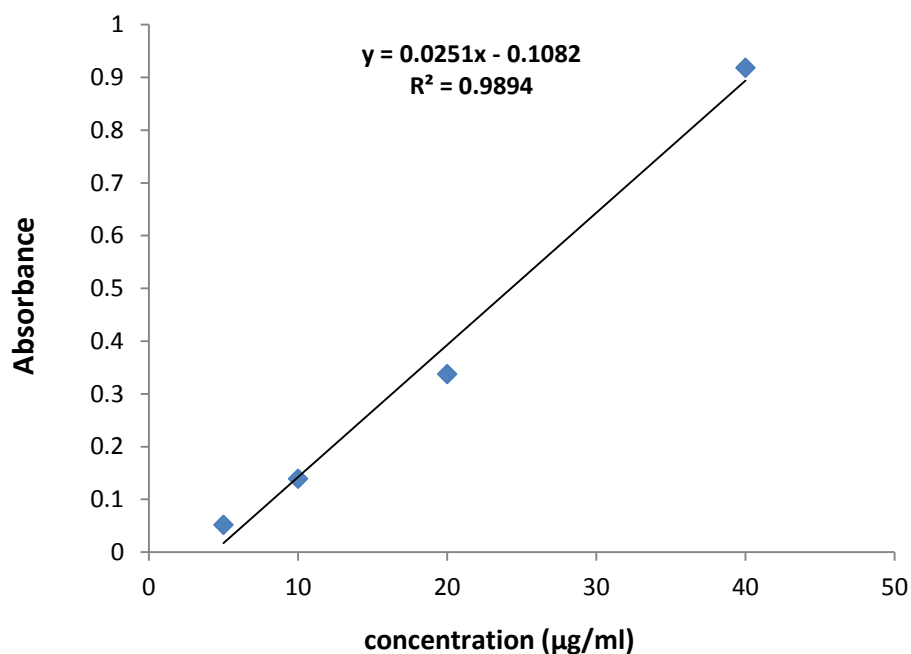


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.3- Dosage des Tannins totaux

La teneur des tannins totaux est estimée en utilisant la méthode décrite par (Rahate *et al.*, 2013).

Brièvement, 350µl de chaque extrait (dissouts dans le DMSO) à une concentration de 3 mg/ml ou d'acide tannique (préparé dans l'eau distillée), sont ajoutés à 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dix fois dilué. Après agitation 1.5 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 7.5 %) sont ajoutés. Le mélange final est incubé pendant 45 min dans un bain marie à 45 C° à l'obscurité. L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 765 nm. Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par 350 µl de DMSO.

La courbe d'étalonnage de l'acide tannique est préparée par des concentrations différentes (37.5- 300µg/ml), et les teneurs des tannins totaux dans les quatre extraits sont calculées à partir de l'équation de régression et exprimées en µg d'équivalent d'acide tannique /mg d'extrait sec (µg EAT/mgE) (Figure 10).

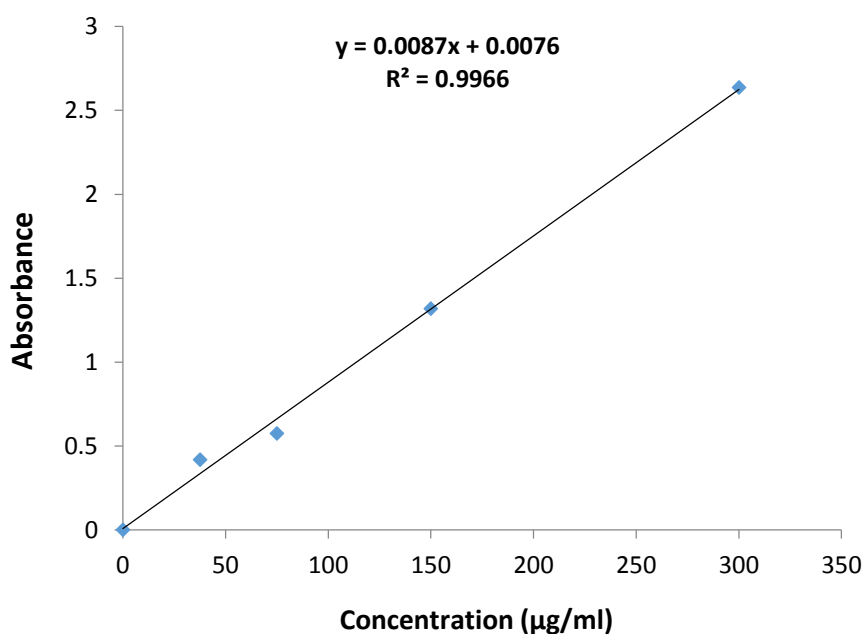


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits d'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*

L'activité antioxydante des extraits étudiés est évaluée par trois méthodes différentes :

2.4.1- Effet piègeur des extraits contre le radical DPPH

Le test au DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) est réalisé selon le protocole décrit par (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le di-phénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans les extraits.

50 µl de chaque solution des extraits (dissouts dans le DMSO) à différentes concentration, ou de standard (Quercétine) sont ajoutés à 1250 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,04mg/ml). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de DMSO avec 1250 µl de la solution méthanolique de DPPH, chaque solution est répétée trois fois.

L'absorbance est mesurée à 517 nm après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé selon la formule suivante:

$$I\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

A témoin : Absorbance du témoin négatif.

A éch : Absorbance de l'échantillon.

2.4.2- Test de réduction du fer (FRAP)

Ce test a été découvert par (Oyaizu, 1986). Il est considéré comme un test direct et rapide pour la mesure du pouvoir réducteur des antioxydants.

En effet, 0.5 ml de chaque extrait (dissouts dans le DMSO) à différentes concentrations sont ajoutés à 1250 μ L de tampon phosphate (0.2 M, pH 6,6) et 1250 μ L de ferricyanure de potassium à 1 %. Le mélange réactionnel est bien agité et ensuite incubé à 50°C pendant 20 minutes dans un bain marie. A la fin de l'incubation, 1250 μ l d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés au mélange et centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Ensuite 1250 μ l du surnageant est mélangé avec 1250 μ l d'eau distillé et 250 μ l de chlorure ferrique à 0,1%. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. Chaque solution est répétée trois fois.

Enfin, la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer.

2.4.3- Test de β - carotène/acide linoléique

Dans ce test la capacité anti-oxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par (Dapkevicius *et al.*, 1998).

L'émulsion de β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont ensuite ajoutés à la solution préparée. Après évaporation du chloroforme à l'aide d'un rotavapeur Büchi, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. Ensuite 2.5 ml de l'émulsion préparée sont ajoutées à 350 μ l de chaque extrait (dissouts dans le DMSO) à une concentration de 3 mg/ml.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (BHT) à une concentration de 3mg/ml, alors que les témoins négatifs sont préparés en remplaçant l'extrait par le DMSO, l'eau distillée ou le méthanol. Chaque solution est répétée trois fois.

Enfin, l'absorbance est mesurée immédiatement à 490 nm, puis après 1h, 2h, 3h, 4h, 24h et 48h d'incubation à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (A_t / A_{t0}) \times 100.$$

A_t : Absorbance au temps (t).

A_{t0} : Absorbance au temps (0).

2.5- Etude statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne de trois répétitions \pm SD. La signification statistique entre le contrôle positif et les échantillons est déterminée par le test de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de 5% ($p < 0.05$).

Les courbes et les histogrammes ont été réalisés à l'aide de programme Microsoft Excel 2010, et les analyses statistiques ont été effectués par le logiciel GraphPad Prism 7.04.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1- Extraction

La préparation des extraits à partir de la plante *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* est effectuée par des solvants à polarité croissante et a permis d'obtenir quatre extraits : l'extrait d'hexane, d'acétone, de méthanol et l'extrait aqueux. Les rendements d'extraction à partir de la plante sont exprimés en pourcentage (%) de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre végétale utilisée dans la macération. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Rendements des extractions à partir des feuilles et des fleurs d'*Atriplex halimus* ssp. *Schweinfurthii*.

Extrait	Rendement (%)
Aqueux	19.87
Méthanol	10.92
Acétone	1.56
Hexane	0.88

Selon le tableau, le rendement le plus élevé est obtenu dans l'extraction aqueuse (19.87 %), suivi par l'extrait méthanolique (10.92 %), puis l'extrait d'acétone (1.56 %) et l'extrait d'hexane qui a donné le rendement le plus faible (0.88 %). On peut noter que le rendement augmente avec la polarité des solvants d'extraction.

La méthode d'extraction adoptée est basée sur la solubilité différentielle des composés végétaux dans les solvants. Les flavonoïdes di-, tri- et tétra-glycosylés et les acides phénoliques très polaires (acides benzoïques et cinnamiques) sont solubles dans l'eau qui est un solvant polaire (Jones et Kingdon, 2006), tandis que les substances moins polaires (dérivés d'acides phénoliques) peuvent être isolées par les solvants organiques moins polaires (Cazes, 2005). Le méthanol peut extraire les flavonoïdes, les aminoacides, les terpènes et les cires (Andersen et Markham, 2006), ainsi que les tannins, les saponines, et les anthocyanines (Cowan, 1999). L'acétone est également un solvant fréquemment utilisé pour préparer des extraits riches en flavonoïdes (Cowan, 1999). L'hexane est généralement utilisé pour extraire les lipides et les flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés (Boussoualim, 2014).

En plus du choix des solvants, les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée, comme la température, l'agitation, le ratio solvant/matériel végétal et le temps d'extraction, affectent à leur tour le rendement d'extraction et le contenu total en composés phénoliques, et par conséquent affectent les activités biologiques relatives à ces métabolites (Lee *et al.*, 2003 ; Azmir *et al.*, 2013). L'extraction aqueuse est effectuée sous forme d'une décoction, c'est la méthode recommandée en médecine traditionnelle, le réchauffement du mélange matériel végétal et d'eau augmente la solubilité de certains composés et assure l'extraction des tanins et des terpénoïdes (King et Bott, 1993).

2- Screening phytochimique

Les tests de détection des différents composés chimiques présents dans les extraits d'*Atriplex halimus ssp. schweinfurthii* ont permis de confirmer la présence des flavonoïdes et des tanins dans tous les extraits de la plante. Les terpénoïdes sont présents dans les extraits d'acétone et d'hexane alors que les quinones sont présents dans tous les extraits sauf l'extrait aqueux. Les saponines sont absents dans tous les extraits de la plante (Tableau 3).

Tableau 3 : Analyse phytochimique des extraits aqueux et organiques d'*A halimus ssp. schweinfurthii*.

Extrait	Flavonoïdes	Terpénoïdes	Quinones	Tanins	saponines
Aqueux	+	-	-	+	-
Méthanol	+	-	+	+	-
Acétone	+	+	+	+	-
Hexane	+	+	+	+	-

Les flavonoïdes et les tanins font partie des polyphénols. Les terpénoïdes sont des composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène. Les triterpénoïdes sont des précurseurs de la synthèse des stéroïdes dans les plantes. Les quinones sont des cycles aromatiques caractérisées par la présence d'un cycle benzénique substitué par deux fonctions cétone connues pour leur activité antimicrobienne (Malecky, 2005).

3- Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Atriplex halimus schweinfurthii* au moyen des dosages Spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur en composés phénoliques. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents d'un standard à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Tableau 4).

Tableau 4 : Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des extraits d'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*.

Extrait	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg E}$)	Tannins totaux ($\mu\text{g EAT/mg E}$)
Aqueux	28.10 \pm 9.66	17.70 \pm 0.65	32.30 \pm 0.97
Méthanol	14.44 \pm 0.82	22.79 \pm 0.32	29.47 \pm 4.59
Acétone	28.75 \pm 10.78	31.94 \pm 0.00	76.18 \pm 19.79
Hexane	13.36 \pm 0.41	43.96 \pm 0.25	19.67 \pm 0.70

Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm SD.

(EAG : Equivalent d'acide gallique, EQ : Equivalent de quercétin, EAT : Equivalent d'acide tannique).

Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols varient considérablement entre les extraits ; l'extrait d'acétone et aqueux sont les plus riches en polyphénols avec des concentrations de 28.75 et 28.10 $\mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement. Les extraits de méthanol et d'hexane ont montré des valeurs proches et inférieures aux extraits précédents (14.44 et 13.36 $\mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement).

Dans le dosage des flavonoïdes, l'extrait d'hexane semble le plus riche en flavonoïdes avec une concentration de 43.96 $\mu\text{g EQ/mg E}$, suivi par l'extrait d'acétone de 31.94 $\mu\text{g EQ/mg E}$, puis l'extrait méthanolique avec 22.79 $\mu\text{g EQ/mg E}$ et enfin l'extrait aqueux de 17.70 $\mu\text{g EQ/mg E}$. On peut noter que la teneur en flavonoïdes est plus élevée dans les extraits préparés par les solvants les moins polaires.

La teneur la plus élevée en tannins est observée dans l'extrait d'acétone avec une concentration de 76.18 µg EAT/mg E, suivi par les extraits aqueux et méthanolique avec des concentrations proches (32.30 et 29.47 µg EAT/mg E, respectivement), alors que l'extrait d'hexane représente la teneur la plus faible (19.67 µg EAT/mg E).

Les résultats trouvés sont proches de ceux indiqués par (Benhammou *et al.*, 2009, 2014), dont la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de la plante est de 10.12 µg EAG/mg E pour l'extrait méthanolique. Une autre étude réalisée par (Belhadj *et al.*, 2017), indique que la fraction butanolique de l'extrait d'*A. Halimus* présente une teneur en phénols totaux égale à 3,64 mg EAG/g E et celle des flavonoïdes égale à 0,12 mg EQ/g E, alors que la teneur des tanins est égale à 1,036 mg EC/g E. La fraction de l'acétate d'éthyle dans la même étude a montré des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins totaux égales à 1,61 mg EAG/g E, 0,05 mg EQ/g E et 0,12 mg EC/g E, respectivement.

4-Activité antioxydante des extraits d'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*

4.1- Effet de piégeage du radical DPPH

Le test de DPPH est l'un des tests les plus utilisés en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité (Nur Alam *et al.*, 2013).

Le (DPPH) est un radical libre qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Popovici *et al.*, 2009), sa réduction par les composés antioxydants est accompagnée par son passage de la couleur violette à la couleur jaune ce qui diminue son absorbance.

L'activité antioxydante a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm, elle est exprimée en concentration d'inhibition IC₅₀, sachant que la IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH• (Figure 11).

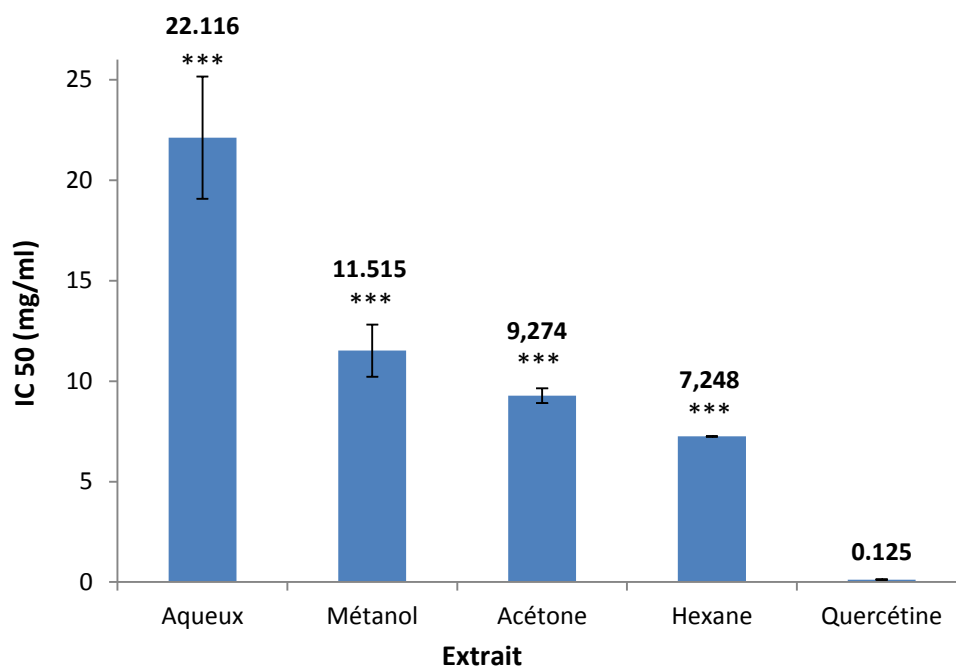


Figure 11 : Les concentrations des extraits d'*Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii* et de la quercétine inhibitrices de 50 % du radical DPPH (IC₅₀). Comparaison par rapport au quercétine, ($p < 0.001$)***. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm SD.

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les quatre extraits étudiés possèdent une activité dose-dépendante et faible avec des valeurs très élevées des IC₅₀. La meilleure activité est observée pour l'extrait d'hexane avec une IC₅₀ de 7.24 mg/ml, suivi par l'extrait d'acétone (IC₅₀ = 9.26 mg/ml), l'extrait méthanolique (IC₅₀ = 11.39 mg/ml) et enfin l'extrait aqueux (IC₅₀ = 21.90 mg/ml). Le standard utilisé (la quercétine) présente une activité antioxydante très élevée par rapport aux extraits avec une IC₅₀ de 0.124 mg/ml.

Les résultats obtenus par (Benhammou *et al.*, 2009, 2014) montrent aussi que l'activité antiradicalaire contre le radical DPPH des extraits méthanoliques préparés à partir des feuilles et des tiges d'*A. halimus* est très faible avec des valeurs élevées des IC₅₀ obtenues (31.83 et 20,58 mg/ml, respectivement).

Dans la présente étude, une corrélation existe entre l'activité anti-radicalaire et la teneur en flavonoïdes, dont les extraits les plus riches en flavonoïdes ont montré la meilleure activité selon l'ordre suivant : E. Hexane > E. acétone > E. méthanol > E. aqueux.

Plusieurs études ont montrés que l'activité antiradicalaire est liée directement à la structure des composés phénoliques et le nombre des groupes hydroxyles disponible (Villano *et al.*, 2007).

La famille des flavonoïdes montre un potentiel redox élevé due à la présence du cycle B de type catéchol ou pyrogallol qui permet aux composés appartenant à ce groupe d'agir comme agents réducteurs puissants (Hayouni *et al.*, 2007), dont le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH•, qui se transforme en une molécule stable DPPHH (Popovici *et al.*, 2009).

4.2- Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

Les antioxydants ont la capacité de réduire les ions ferriques en donnant un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} a la forme Fe^{2+} . Cette réaction se manifeste par le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (Le K *et al.*, 2007).

La capacité réductrice des extraits et de l'acide ascorbique (standard) a été évaluée ; les résultats sont présentés dans les figures 12 et 13.

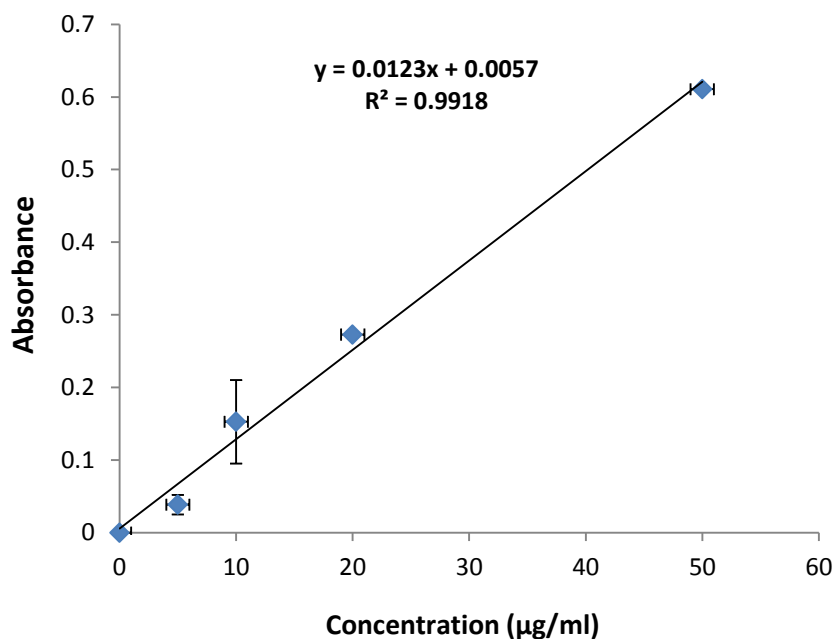


Figure 12 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions \pm SD.

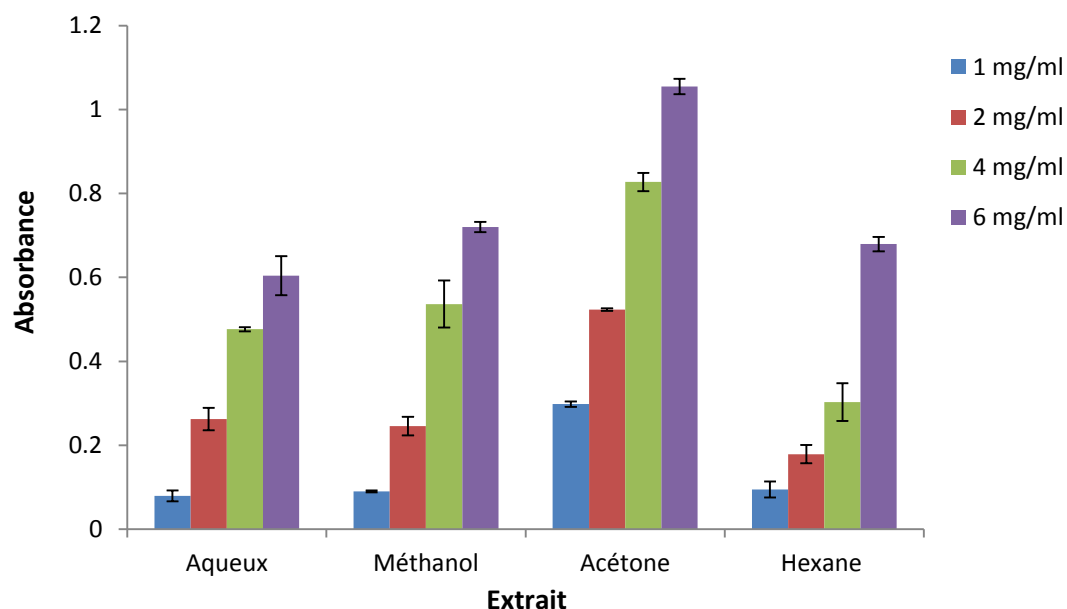


Figure 13 : Pouvoir réducteur des extraits d'*Atriplex halimus*.

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits présentent une capacité réductrice dose-dépendante, cependant, leur activité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique qui a montré à son tour un effet dose-dépendant, dont la valeur d'absorbance la plus élevée (0.61) est obtenue pour la concentration 50 μ g/ml.

Parmi les extraits étudiés, l'extrait d'acétone a montré le potentiel réducteur le plus puissant, dont la valeur maximale de l'absorbance (1.05) est obtenue pour la dose 6 mg/ml, notant que c'est l'extrait qui a montré la teneur la plus élevée en polyphénols et en tannins qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. L'extrait méthanolique présente un pouvoir réducteur avec une absorbance maximal de 0.72 pour la dose de 6 mg/ml. Pour les extraits aqueux et hexane, ce dernier a donné une absorbance plus élevée pour la dose 6 mg/ml, mais l'extrait aqueux a donné une absorbance plus élevée à 4 et 2 mg/ml par rapport à l'extrait d'hexane. La valeur la plus diminuée est montré par l'extrait aqueux à une dose de 1mg/ml.

Le potentiel réducteur des extraits est lié à la présence des molécules capables de donner des électrons (Ferreira *et al.*, 2006). Ces derniers contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+). Les polyphénols, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites.

4.3- Test du β - carotène/acide linoléique

Le test au β -carotène est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des composés bioactifs du fait que le β -carotène est extrêmement susceptible aux radicaux libres, dérivés hydro peroxydes résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Kumazawa *et al.*, 2002). Ces derniers attaquent le chromophore du β -carotène, résultant en une décoloration de l'émulsion réactionnelle qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 490 nm.

La présence d'antioxydants pourrait donc prévenir l'oxydation et par conséquent la décoloration de cette molécule, par neutralisation de ces radicaux. La cinétique de blanchissement du β -carotène a été réalisée en présence des extraits d'*Atriplex halimus* et d'un antioxydant (BHT) utilisé comme contrôle positif. Les pourcentages d'inhibition sont représentés dans les Figures 14 et 15.

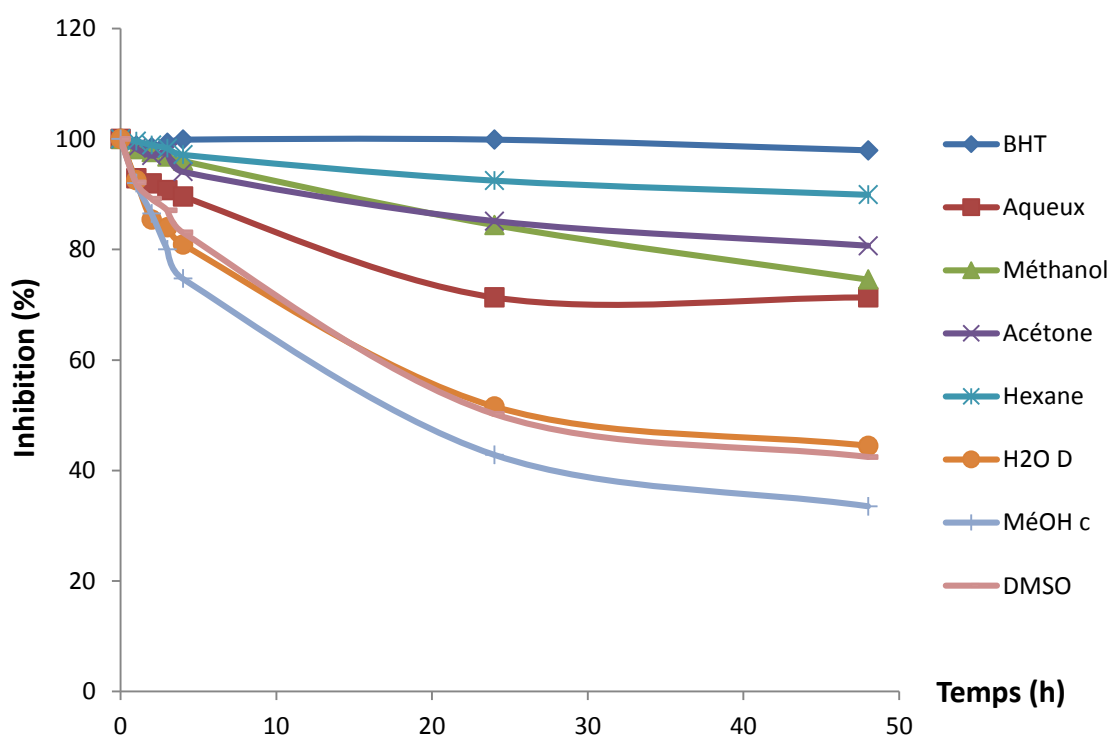


Figure 14 : Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence des extraits d'*Atriplex halimus*, de BHT et des témoins négatifs (eau distillée, méthanol et DMSO) durant 48h.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

(H₂O D : Eau distillé, MéOH c : control méthanol).

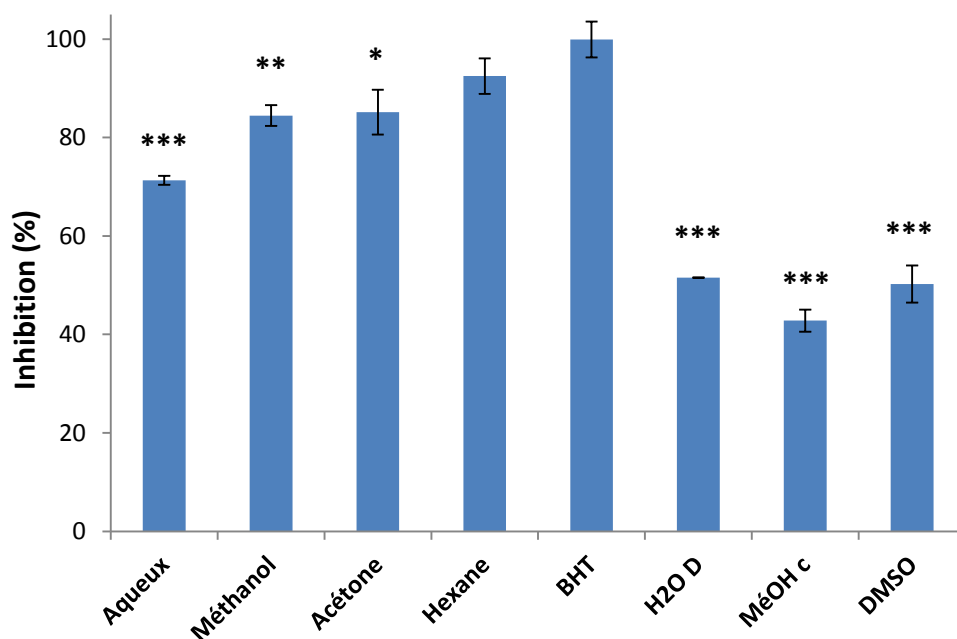


Figure 15 : Pourcentages d'inhibition des quatre extraits d'*Atriplex halimus*, du témoin positif (BHT) et des témoins négatifs (eau distillée, méthanol et DMSO) après 24h d'incubation.

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD. Comparaison par rapport au BHT, ($p < 0.05$)*, ($p < 0.01$)**, ($p < 0.001$)***. (H₂O D : Eau distillé, MéOH c : control méthanol).

Les résultats obtenus montrent que le blanchissement du β -carotène suivi pendant 48 heures, est nettement ralenti en présence des extraits étudiés à une concentration de 3mg/ml par rapport aux témoins négatifs. En effet, l'extrait d'hexane a donné un pourcentage d'inhibition égale à 92.47% après 24h d'incubation ; cette valeur est très proche de celle donnée par le BHT pour la même concentration de 3 mg/ml (99.88 %) (Différence non significative statistiquement). Les extraits d'acétone et de méthanol ont montré un effet inhibiteur avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 85.13% et 84.44%, respectivement. Enfin, l'extrait aqueux a montré une activité antioxydante de 71.32%.

Une corrélation a été bien observée entre l'activité antioxydante des extraits dans ce test et leur polarité, de sorte que l'activité diminue avec l'augmentation de la polarité, ainsi qu'avec la teneur en flavonoïdes.

En effet, le milieu réactionnel dans ce test est une émulsion ; le degré de solubilité des extraits dans l'émulsion est important, les extraits apolaires exposent une capacité antioxydante plus importante car ils sont concentrés au sein de l'interface eau-lipide, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux libres et parallèlement l'oxydation de β -carotène alors que les extraits polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont donc moins efficaces (Frankel et Meyer., 2000).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes montrent une grande capacité de terminer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique par le piégeage du radical peroxyde ROO^{\bullet} (Takahama, 1983).

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales représentent une source fiable et majoritaire des antioxydants naturels, notamment les polyphénols qui sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés à cause de leurs propriétés thérapeutiques.

La présente étude est consacrée à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des feuilles et des fleurs la plante médicinale *Atriplex halimus* ssp. *schweinfurthii*, par différentes méthodes complémentaires.

Les résultats montrent que le rendement d'extraction augmente avec la polarité des solvants utilisés. Une investigation phytochimique a confirmé la présence des flavonoïdes et des tanins dans les extraits étudiés. Les terpénoïdes sont présents dans les extraits d'acétone et d'hexane alors que les quinones sont présents dans tous les extraits à l'exception de l'extrait aqueux. Le dosage des polyphénols totaux a révélé des teneurs qui varient considérablement entre les extraits, dont la teneur la plus élevée est trouvée dans l'extrait d'acétone ; ce dernier représente aussi l'extrait le plus riche en tanins totaux. D'autre part, la teneur la plus élevée en flavonoïdes est observée dans l'extrait d'hexane.

L'évaluation du potentiel antioxydant, par la technique de piégeage du radical DPPH et par le test de blanchissement du β -carotène, a révélé que l'activité antioxydante des extraits est proportionnelle à leurs teneurs en flavonoïdes selon l'ordre suivant : extrait hexanique > acétonique > méthanolique > aqueux. Le pouvoir réducteur évalué par la méthode de FRAP a montré que tous les extraits possèdent une activité dose-dépendante et que l'extrait d'acétone a présenté le pouvoir le plus important.

D'autres études plus avancées sont nécessaires pour la caractérisation des composés chimiques actifs de la plante étudiée par des méthodes de séparation plus performantes (HPLC, CPG...) et qui sont responsables de ses activités antioxydantes.

Références bibliographiques

- Afanas'ev I.B., Dcrozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I., 1989.** Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. **38 (11)**, 1763-1769.
- Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G., 2001.** Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*. **61(6)**, 677-684.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases , rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. **74**, 636–643.
- Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., Aguilar C N., 2008.** Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **78**, 189-199.
- Al-Jaber, N.A.A., Mujahid, T.G., Al-Hazmi, H.M.G., 1991.** Flavonoides from *Atriplex farinose*. *J. King Saud. Univ.* **3**, 163-167.
- Andersen OM., Markham KR., 2006.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. p. 2.
- Azmir J., Zaidul ISM., Rahman MM., Sharif KM., Mohamed A., Sahena F., Jahurul MHA., Ghafoor K., Norulaini NAN., Omar AKM., 2013.** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. **117**, 426-36.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim. Forsch/Drug. Res.* **31**, 1-6.
- Balasundram N., Sundram K et Samman S., 2006.** Phenolic compounds in plants and agri industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. **99**, 191–203.
- Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle .Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. p. 247.
- Belouad A., 2001.** Plantes médicinales d'Algérie, éd. Office des publications universitaires, Alger, 284 P.
- Benhammou, N., AtikBekkara, F., Kadifkova Panovska, T., 2009 ; 2014.** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex xhalimus*. *C. R. Chimie*. **12**, 1259–1266.
- Birt D.F., Hendrich S. ET Wang W., 2001.** Dietary agents in cancer prevention, Flavonoïde and isoflavonoïde. *Pharmacol.* **90(3)**, 157-177.
- Bonnefont –Rousselot D, Raji B ; Wolrand S ; Gardés –Albert M ; Jore D ; Legrand A ; peyenet; Vasson MP., 2003.** An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of met form in towards oxidative stress. *métabolisme*. **52(5)**, 586-9).
- Boussoualim N., 2014.** Activités biologiques de plantes médicinales : *Anchusa azurea L.* et *Globularia alypum L.* Thèse doctorat, université Sétif-1. p. 50.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss-Technol.* **28**, 25–30.
- Bruneton J., 1999.** Phytochimie. Plantes médicinales. Pharmacognosie. 3eme édition, Paris, France. pp : 125-165.
- Bruneton, J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.
- Bylka, W., Stobiecki, M., Frahski, R., 2001.** Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis*. *Acta Physiol. Plant.* **23(3)**, 285-290.
- Bylka, W., 2004.** A new acylated flavonol diglycoside from *Atriplex littoralis*. *Acta Physiol Plant.* **26(4)**, 393-398.
- Cazes D-J., 2005.** Encyclopedia of Chromatography in «Phenolic Acids in Naturel Plants: Analysis by HPLC». P1806.
- Césarini, J.-P., 2004.** Le sélénium : actualités. *John Libbey Eurotext Edition*, p 14. *Chemical Toxicology* **33**, 1061-1080. *Clin. Exp. Metastasis.* **9**, 13-25. *Complementary & Alternative Medicine.* 1-13.
- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., 1983.** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* **(32)**, 995.
- Chen L., HU J.Y. and Wang S.Q., 2012.** The rôle of antioxdants in photoprotection: a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology.* **67(5)**, 1013-1024.
- Cheng J-C., Bo Zhou F-D., Yang L., Liu Z.L., 2007.** Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. *Food Chemistry.* **104**: 132–139.
- Clifford M.N., 1999.** Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC.*
- Coleman, J.W., 2001.** Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397-1406.
- Cowan, M.M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12 (4)**, 564–582.
- Crépel, F., & Lemaire, G., 1995.** Le monoxyde d'azote. ; *Revue MS (médecine/sciences).* **11**, 1639-42.
- Press, Boca Raton Florida.* **41 (5)**, 393-397.
- Daponte, M., 2013.** Glutation catalyses and the reaction menchanisme of glutation dependent enzyme *Biochim Biophys Act.* **1830(5)**, 3217-3266.
- Danglettere L., 2007.** Apport des spectroscopies moléculaires à l'étude des mécanismes de fixation des ions métalliques polluants par les substances humiques. Complexation de Al (III), Pb (II) et Zn (II) par des systèmes modèles. *Thèse de Doctorat.* Lile, p. 316.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H., 1998.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci. Food. Agr.* **77**, 140–146.

- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. **43(4)**, 348-361.
- De Souza R.f., W.F., De Giovanni., 2004.** Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with metal ions. *Redox Report*. **9(2)**, 97-104.
- Di Carlo G., Mascojo N., Izzo a .A. ET Capasso F., 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural products. *Life Sci*. **65**, 337-353.
- Duperat M., 1997.** Le guide des arbres et arbustes de France. Ed., sélection du Reader 's Digest. 255 p.
- D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moya b, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla., 2007.** *Talanta*. **71**, 230–235.
- Echevin R., 1964.** ‘‘Biologie’’. Biologie végétale. Angiosperme I Apétales et Dialytales. Doin, ed., Paris. p. 161.
- Emam, S. S., 2011.** Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products*. **4**, 25–41.
- Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly.,Hollman J. P., L –Keen C., El Abd Rahman, H.H., Mohamed, M.I., Gehad, A.E.A., Awadallah, I.M., 2006.** Ameliorating the Antinutritional factors effect in *Atriplex halimus* on sheep and goats by ensiling or polyethylene glycol supplementation. *Int. J. Agr Biol*. **8(6)**, 766–769.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. **17**, 501-512.
- Favier A., 2006.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* Mémoire d'Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p 64, 390-396.
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, L.M.L., Aranja, M.E.M., 2006.** The *in vitro* screening for acetylcholine esterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**, 31.
- Francllet A. et Le-Houérou H.N., 1971.** Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. *Doct. F.A.O. Rome*. p 249 et p 189.
- Frankel E.N. and Mayer A.S., 2000.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multi-dimensional food and biological antioxidants. *Journal of science and food Agriculture*. **80**, 1925-1941.
- Gabbai, F. B., Garcia, G. E. et al., 1995.** Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology, *AdvNephrol Necker Hosp*. **24**, 3-18.
- Garait, B., 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de Doctorat. Grenoble: Université Joseph- Fourier I.
- Gardés, Albert M ; Bonnefont –Rousselot D ; Abedinzadeh Z ; Gore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique* novembre –décembre, 91-96.
- Gey KF., 1998.** Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*. **7**, 113-174.

- Gey, KF., Brubacher, GB and Stâhelin, HB., 1987.** Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr.* **45**, 1368-1377.
- Ghosh D., Scheepens A., 2009.** Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research.* **53(3)**, 322-331.
- Gnanaprakash, K., MadhusudhanaChetty, C., Ramkanth, S., alagusundaram, M., Tiruvengadarajan, V.S., AngalaParameswari, S., Mohamed Saleem, T.S., 2010.** Aqueous extract of Flacourtiaindica prevents Carbon Tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *International Journal of Biological and Life Sciences.* **6(1)**, 51-55.
- Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* **11**, 115-120.
- Guittonneau G.G. et Huon A., 1983.** Connaître et reconnaître la flore et la végétation Méditerranéennes. Ed., Ouest - France. 331p.
- Halliwell B., Chirico S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition.* **57**, 715S-725S.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999.** Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edn, Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., 2006.** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* **97**, 1634-1658.
- Halliwell B. 2007.** Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health *Cardiovascular Research.* **73**, 341-347.
- Havsteen B-H., 2002.** The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics.* **96**, 67-202.
- Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M., 2007 .**The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts; *Food Chem.* **105**, 1126-1134.
- Jean pelmont., 2005.** Bactéries pour les Technologies de l'environnement. EDP Sciences ;P : 706-726.
- Jean –Marie Reimund., 2002.** Stress oxydant au cours de syndromes inflammatoires chroniques. oxydatives stress in chronic inflammatory syndromes .Nutrition chimique et métaboïsme Ediion scienifique e médicales Elsevier SAS, **16**, 275-287.
- Jones, W.P., Kinghon, D., 2006.** Extraction of plant secondary metabolites in natural products isolation. Eds. Humana Press. Totowa. pp: 334-335.
- Kannan, K. and Jain, S.K., 2000.** Oxidative stress and poptosis. *Pathophysiology.* **7**, 153-163.
- Kar A., 2007.** Pharmacognosy and pharmabiotechnologie 2ndEd: new Age International Publisher; pp.1-30.
- Kinsella J.E., Frankel E., German B., Kanner J., 1993.** Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, Vol. **47**, Issue: 4, pp. 85-89.

- King, M.B., Bott, T.R., 1993.** Extraction of natural products using near-critical solvents. Blackie Academic and professional. p. 141.
- Koehler-Ramonatxo C., 2006.** Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation, another way of nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Et Métab.* **20**, 165-177.
- Koppenol, W. H., 1998.** The chemistry of peroxyxynitrite, a biological toxin, vol. **21**, n.3, pp.326-331.
- Korkina L.G., Afanas'ev I.B., 1997.** Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* **38**, 151-163.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. and Abdely C., 2007.** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry.* **45**, 244-249.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T and Nakayama T., 2002.** Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**, 477782.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y., 2003.** Cocoa Has More Phenolic.
- Le K., Chiu F. N. G. K., 2007.** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry.* **105**, 353-363.
- Le hucher-MICHEL M P., Lesgards J F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. P 30-1076-1081.
- Le Houerou H.N., 1993.** Salt tolerant plant of the arid regions of the Mediterranean isoclimatic zone in: Towards the rational use of high salinity tolerant plant. Leith H. and Almasoom A. Eds., Kluwer academic publishers. Vol. **1**, pp: 403-422.
- Le Houerou H., 2000.** Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semiarid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Research and Rehabilitation.* **14**, 101-135.
- Le Floch E., 1989.** Plantation d'arbustes fourragers. Bilan préliminaire de 30 ans de pastoralisme. Ed: F.A.O. 204 p.
- Linard A., QUEMIN J., PARIS R., 1976.** Plantes Malgaches No XXI sur les flavonoïdes du *Xyris Semfuscata* (xyridacées). *Plantes Rtiédicinales et Phytothérapie Torne X.* **11(4)**, 267-275.
- Liberato M.C., Vasconcelos T. et Caixinhas M L., 2000.** Dicotyledones in some green areas in Lisbon. The Achlamydeous and the Haplochlamydeous. *Portugaliae Acta Biol.* **19**, 387-396.
- Li H, Cheng K.W, Wong C.C, Fan, K.W, Chen, F, Jiang Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry.* **102**, 771-776.
- Loic Lemoire., 2011.** Effet Protecteur des polyphénols de la Verveins odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le Rat .Humanhealth and pathology. Thèse d'université d'Auvergne. Clermont Ferrand I. French.
- L. Siracusa., A. Saija., M. Cristani., F. Cimino., M. D'Arrigo., D. Trombetta., F. Rao., G. Ruberto., 2011.** Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhizaglabra*L.) leaves Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia.* **82(4)**, 546-56.

- Lu, S. C., 2013.** "Glutathione synthesis." *Biochim Biophys Acta*. **1830(5)**, 3143-3153.
- Maalem, S., 2002.** Etude écophysiological de trois espèces halophytes du genre *Atriplex* (*A. canescens*, *A. halimus* et *A. nummularia*) soumises à l'enrichissement phosphaté. Thèse de Magistère en physiologie végétale et applications biotechnologiques. Université Baji Mokhtar, Annaba, Algérie, 76p.
- Maski et al., 1998.** Differential rol of catalase and glutation peroxidase in cultured human fibroblasts un des exposure of H2O2 or ultra violet Blight Arch. Dermatol, Médecine-Sciences. Flammarion. **209(3)**, **113**.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**, 727-747.
- Malecky, M., 2005.** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.
- Marouf A. R. et Reynaud J., 2007.** La botanique : 1962 définitions. Ed Dunod. Paris.
- Marquardt H., Schafer SG., Mcclellan RO., Welsch F., 1999.** Toxicology. Academic Press. p. 112-4.
- Martínez-Cayuela M., 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. **77**, 147-161.
- Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes : Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools, formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp 24-42.
- McKell C.M., 1994.** Salinity in *Atriplex* species: fodder shrubs of arids lands. In: Handbook of plant and crop physiology. Ed. Pessaraki M. and Marcel Dekker.
- McKelvey, T.G., Hollwarth, M.E., Granger, D.N., Engerson, T.D., Landler, U., Jones, H.P., 1988.** Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* **254**, 753-760.
- Mertz W., Rosinski E.E., Gordon W.A., Harrison W.W., Shani J., Sulman F.G., 1973.** In vitro potentiating of insulin by ash from Saltbush (*Atriplex halimus*). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **206(1)**, 121-182.
- Mirsky et Nitsa., 2001.** Naturally extracted and synthetic hypoglycemic or hypolipidemic compositions. Application N°. US 09/842971. [http:// www. freepatentsonline.com](http://www.freepatentsonline.com).
- Middleton, E.J.R., Kandaswami, C., Theoharidesi, T.C., 2000.** The Effects of plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673–751.
- Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C., 2007.** Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. **137**, 2196-2201.
- Monties B., Marine-Font A., Douillard, R., 1969.** Propriétés spectroscopiques des polyphénols. *Ann Physiol Vég.* **11(4)**, 313-339.
- Mompon B., Lemaire P., Mengal et M. Surbled., 1998.** Extraction des polyphénols : Du laboratoire à la production industrielle. Polyphenols. Ed. INRA, Paris.289p.
- Mulas, M., 2004.** Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) Février 2004. 91p.

- Murray; Bender; Bothan; Kennlly; Rodwell; wiel., 2013.** Biochimie de Harper 5 édition. De Boech supérieure s.a Paris ; p : 561.
- Murota K., Mitsukuni Y., Ichikawa M., Tsushida T., Miyamoto S., et Terao J., 2004.** Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52(7)**, 1907-1912.
- Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R., 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. **33**, 2-16.27.
- Nagata T., Hayatsu M., Kosuge N., 1992.** Identification of aluminium forms in tea leaves by Al NMR. *Phytochemistry*. **31(4)**, 1215-1218.
- NurAlam Md., Bristi N. J. and Rafiq uzzaman Md., 2013.** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **21**, 143–152.
- Odile C and Daniel R., 2007.** Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. 3 Edition, *Wolters Kluwer France* 141.
- Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*. **44**, 307-15.
- Parks, D.A., Williams, T.K., Beckman, J.S., 1988.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol*. **254**, 768-774.
- Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo II., Beckman J.S., Darley-USmar V.M., 2000.** Free Radical. *Bio. Med.*, **28**, 1780-1794.
- Packer L, Kraemer, Rimbach G., 2001.** Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complication, *Nutrition*. **17 (10)**, 888-895.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. and Defraigne J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**, 233-239.
- Pompella, A ; Visvikio, A ; Paolicchi, A ; De Tata, V ; and Casini, A.F., 2003.** The changing faces of glutathion, a cellular Protagonist. *Biochem Pharma* vol. **66**, 1499-1503.
- Popovici, C., Ilonka, S., Bartek, T., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de Génie Industriel*. p27-28.
- Pouget M., 1980.** Les relations sol-Végétations dans les Steppes sud-Algéroises Travaux et document de L'O.R.S.T.O.M. N0. 116 p.555.Paris.
- Prigent SVE, Gruppen H, Visser A, van Koningsveld GA, de Jong GAH, Voragen AGJ., 2003.** Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 5088-5095.
- Quezel, P., Santa, S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Ed. Centre national de la recherche scientifique. Pp, 283, 286, 287.
- Rahate KP, Padma R, Parvathy NG, Renjith V., 2013.** Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrical*. *Ind. J Pharm. Edu. Res*. **4**, 73-7.

- René, 1962 René M., 1962.** Flore de l'Afrique du Nord. Paul le chevalier, ed., Paris. Vol. **VIII**. p. 81- 84.
- Ribéreau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
- Rosas, M.R., 1989.** El genero *Atriplex* (*Chenopodiaceae*) en Chile. Gayana Bot. Vol. **46**, n° 1- 2, pp. 3-82
- Roberfroid, M., 2002.** Aliments fonctionnels. Eds. TEC and DOC. Paris. pp: 282- 310.
- Salganik, RI., 2001.** The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J.Am. Coll. Nutr.* **20**, 464S-472S.
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11.
- Said O., Khalil K., Fulder S. et Azaizeh H., 2000.** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*. **83**, 251-265.
- S. Belhadj Tahar., M. Hadj-Mahammed., M. Yousfi., 2017.** Caractérisation structurale de quelques métabolites secondaires issus de quelques plantes de la famille 'Amarantaceae' du Sahara septentrional. Thèse doctorat Université de Ouargla.
- Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., 2014.** New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launaea arborescens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. **4**, pp. 267-271.
- Servais S., 2004.** Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone. Université de Claude Bernard-Lyon 1.
- Shani J., Ahronson Z., Sulman F.G., Mertz W., Frenkel G., Kraicer P.F., 1972.** Insulin potentiating effect of saltbush (*Atriplex halimus*) ashes. *Journal of Medical Sciences*, **8** (6), 757-758.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T., 2002.** Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*. **8**, 192-197.
- Singh G., 2004.** Plant Systematics. An integrated approach. Science Publishers, ed., New Hampshire, USA. p. 447.
- Sikora F.J., McBride M.B., 1990.** Aluminium complexation by protocatechuic and caffeic acids as determined by UV spectrophotometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 78-86.
- Sies H; Schewe T., 2003.** Flavonoids as protect against prooxidant enzymes. *Biologie médicamente*. **34**, 243-253.
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z., 2005.** Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **89**, 191-198.
- Sohal R.S., Mockett R.J. & Orr W.C., 2002.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med*. **33**, 575-586.
- Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. **327**, 649-662.

- Sunil H. Ganatra., Shweta P. Durge., Patil S. U., 2012.** Preliminary Phytochemicals Investigation and TLC Analysis of *Ficusra cernosa* Leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **4(5)**, 2380-2384.
- Szabo, C., 2003.** Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **141**, 105-112.
- Takahama U., 1983.** Redox reactions between kaempferol and illuminated chloroplasts. *Plant Physiol.* **71(3)**, 598-601.
- Tessier F., Marconnet P., 1995.** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*. **10**, 01-13.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000.** Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **279**, 1005-28.
- Thompson J. C., et Mottola H. A., 1984.** Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical Chemistry*. **56(4)**, 755-757.
- Urban Th. et al., 1995.** Oxydants et antioxydants : effets biologiques et perspectives thérapeuthiques- *Ann. Chir.* **49**, n° 5, 427-434.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*. **39**, 44-84.
- Vârban D.I., Duda M., Vârban R., et Muntean S., 2009.** Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis L. Culture*. *Bulletin UASVM Agriculture*. **66 (2)** 225- 229.
- Villano D., Fernandez-Pachon MS., Moya ML., Troncoso AM., Garcia-Parrilla MC., 2007.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. **71**, 230-235.
- W-Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G et al., 2007.** Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.* **137 (3 supp 1)**. 718 s-737 s.
- Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D., 1987.** Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J. ethnopharmacol.* **19(2)**, 145-151.
- Younes, M., 1999.** Free Radicals and Reactive Oxygen Species. Academic Press. pp: 111-125.
- Yung-Zhong Fang, Sheng Yang, Cuoyao Wu., 2002.** Free radicals, antioxidants, and nutrition (Citations: 379) *J. Nutr.*, **18**, 872-87.