

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour

l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par : **AZI Safa**

BARKAT Mohamed

MIHOUBI Sarra

MOUSSAOUI Abdelhadi

Intitulé

**Etude de l'activité antioxydante et
antibactérienne de la plante *Atriplex halimus* L.**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. DRIF Seifeddine

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Président

Dr. RAHALI Abdellah

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Rapporteur

Dr. BENSLAMA Abderrahim

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examineur

Année universitaire : 2022 / 2023

DEDICACE

*Je dédie ce mémoire à **ma chère famille** pour leur amour, leur soutien et leur encouragement et surtout ma mère pour sa patience ,sa encouragement,et d'effection tout au long de mon parcours académique et ma vie .*

*À **mes sœurs et mes frères , mes grands parents et mes amis proches** .*

*Un dédicace spécial à **Mon professeur ASSELI bRahim** pour sa guidance experte, ses conseils judicieux merci pour été une source inestimable d'inspiration et de motivation.*

*À mon encadreur **RAHALI Abdallah***

*À **mes collègues** qui partagent avec moi cette inoubliable expériences .*

AZI Safa

*À **ma famille** bien-aimée,*

En cette période de clôture de mes études, je souhaite vous dédier cette lettre de remerciement spéciale. Votre soutien inconditionnel tout au long de mon parcours a été d'une importance cruciale, et je suis profondément reconnaissant envers chacun de vous.

*À **mes parents**, vous avez été ma source d'inspiration constante. Votre dévouement, votre persévérance et vos encouragements sans relâche m'ont porté jusqu'au bout. Votre foi en moi a été inébranlable, et je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait.*

*À **ma femme**, tu es bien plus qu'une partenaire. Tu es mon roc, ma confidente et ma meilleure amie. Ta patience et ton amour inconditionnel ont été essentiels tout au long de mes études. Je suis profondément reconnaissant de t'avoir à mes côtés.*

*Et à **mes enfants**, vous êtes ma plus grande motivation. Votre amour et votre soutien constants ont illuminé mon chemin. Vous m'avez appris l'importance de l'équilibre entre le travail et la famille, et vous êtes une source de joie inestimable.*

*Cette dédicace est le témoignage de ma gratitude éternelle envers vous, **ma famille** extraordinaire. Votre présence dans ma vie est un cadeau précieux, et je suis honoré de partager cette réussite avec vous.*

*Je tiens à exprimer tout ma gratitude, en particulier à **ASSLI brahim**, **RAHALI Abdallah**.*

BARBAT Mohammed

Je dédie ce mémoire à :
mes chères parents, la lumière de ma vie, de m'avoir donné
le courage et la volonté de terminer et réussir mes études
*mon cher frère **Khalid** et mes chères soeurs **Zeyneb** et **Fatiha***
tous mes proches
tous ceux qui m'aiment
tous ceux que j'aime

mihoubi Sarra

"Je tiens à dédier ce mémoire de master à ma famille, en particulier ma mère 'Aïcha 'et mon père 'Ahmed 'pour leur amour, leur soutien et leur encouragement constants tout au long de ce parcours académique. Votre foi en moi a été ma source de motivation inépuisable.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à mes amis et collègues qui ont partagé cette aventure avec moi

A mon encadreur RAHALI Abdallah

Un remerciement spécial à mon directeur de recherche, [Assli brahim], pour son expertise, ses conseils précieux et sa patience infinie. Votre mentorat m'a guidé tout au long de ce projet et a été essentiel à sa réussite.

Enfin, je suis reconnaissant envers tous les enseignants, les chercheurs et les professionnels qui ont contribué à mon apprentissage et à ma formation tout au long de ce programme. Votre expertise et votre passion pour votre domaine m'ont inspiré et ont élargi mes horizons.

MOUSSAOUI Abdelhadi

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos sincères remerciements et notre gratitude a tous ceux qui sont responsables du succès des travaux pratique .

*A monsieur **rahali abdallah** et **asseli ibrahim** pour leurs conseils précieux et leurs suivis durant tout notre travail ; Mes vifs remerciements vont aux membres de jury pour avoir accepté de juger notre travail.*

***Dr . drif seifeddine** ; membre président*

***Dr. benslama abderahim** ; membre examinateur*

Enfin toute personne qui a participé de près ou de loin a l'accomplissement de ce mémoire.

AZI Safa

BARBAT Mohamed

MIHOUBI Sarra

MOUSSAOUI Abdelhadi

Sommaire

Résumé.....	iii
Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures	v
Listes des tableaux	vi
Listes des équations.....	vii
Introduction	1
Chapitre I. Propriétés biologiques d' <i>Atriplex halimus</i> L.....	2
I.1. Généralités sur <i>Atriplex halimus</i> L.	2
I.2. Systématique.....	2
I.3. Description botanique.....	3
I.4. Répartition géographique d' <i>Atriplex halimus</i> dans le monde entier.....	3
I.5. Composition chimique.....	4
I.6. Propriétés pharmacologiques.....	4
I.7. Applications en thérapie traditionnelle.....	4
Chapitre II. Activité antioxydante	5
II.1. Définitions	5
II.1.1. Activité antioxydante	5
II.1.2. Antioxydant.....	5
II.1.3. Stress oxydatif	5
II.1.4. Radicaux libre	5
II.2. Système de défense contre les radicaux libres.....	5
II.2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	5
II.2.2. Antioxydants non enzymatiques	6
Chapitre III. Activité antibactérienne	8

III.1. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	8
III.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
III.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
III.1.3. <i>Escherichia coli</i>	8
III.2. L'antibiogramme	9
III.3. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	9
Chapitre IV. Matériels et méthodes.....	10
IV.1. Matériel.....	10
IV.1.1. Matériel végétal	10
IV.1.2. Matériel microbiologique	10
IV.2. Appareillages et produits chimiques.....	11
IV.3. Méthodes	12
IV.3.1. Préparation des extraits.....	12
IV.3.2. Quantification des composés phénoliques.....	12
IV.3.3. Dosage des polyphénole	13
IV.3.4. Dosage des flavonoïdes	13
IV.3.5. Dosage des tannins	14
IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	14
IV.4.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH [•]	15
IV.5. Evaluation l'activité antibactérienne	16
IV.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :.....	18
IV.6. Analyse statistique.....	18
Chapitre V. Résultats et discussion	19
V.1. Rendements des extractions.....	19
V.2. Dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins	20
V.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH [•]	22
V.4. Evaluation de l'activité antibactérienne	26

Conclusion.....	28
Références bibliographiques	30
Annexes	33

ملخص

تهدف دراستنا إلى تقدير كمية المركبات الفينولية ودراسة النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للميكروبات لثلاثة مستخلصات من نبات *Atriplex halimus*. وأظهرت النتائج المتحصل عليها أن المستخلص الميثانولي قدم المحصول الأعلى (22.4%). يكشف تقييم محتوى إجمالي الفينولات عن وجود كميات مثيرة للاهتمام من مادة البوليفينول. تم العثور على أعلى محتوى في مستخلص الأسيتون (0.230 ± 2.303 مغ EAG / غ MS). يوضح القياس الكمي لمركبات الفلافونويد أن مستخلص الأسيتون يحتوي على أفضل محتوى (0.001 ± 0.319 غ MS / EQ مغ). وبالمثل ، فإن جرعة العفص دفعتنا إلى استنتاج أن هذا النبات غني بالعفص. النشاط المضاد للأكسدة الذي تم قياسه بواسطة اختبار DPPH • الجذري ، مكننا من ملاحظة أن جميع مستخلصات النبات المدروسة لها نشاط كبير كمضاد للأكسدة. قدم مستخلص الأسيتون نشاطاً مثيراً للاهتمام ($EC_{50} = 0.039 \pm 0.001$ مجم / مل) مقارنة بالمستخلصات الأخرى. يُظهر الأخير نشاطاً مضاداً للأكسدة أعلى من عنصر التحكم الإيجابي (فيتامين C و BHT). يبدو أن تأثيره المضاد للأكسدة مرتبط بثرائه في المركبات الفينولية. علاوة على ذلك ، فإن مستخلصات *Atriplex halimus* المعتمدة في هذه الدراسة لا تحتوي على نشاط مضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: *Atriplex halimus* , فينول , فلافونويد ، دباغ ، النشاط المضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للبكتيريا .

Abstract

Our study aims to estimate the quantity of phenolic compounds and to study the antioxidant activity and the antimicrobial activity of three extracts of the plant *Atriplex halimus* L. The result obtained shows that the methanolic extract presented the yield the most higher (22.4%). The evaluation of the content of total phenols reveals the presence of interesting quantities of polyphenols. The highest content is found in the acetone extract (2.303 ± 0.230 mg EAG/g DM). The quantification of flavonoids shows that the acetone extract has the best content (0.319 ± 0.001 mg EQ/g MS). Similarly, the dosage of tannins led us to conclude that this plant is rich in tannins. the antioxidant activity measured by the DPPH• radical test, enabled us to observe that all the extracts of the plant studied have significant antioxidant activity. The acetone extract presented a very interesting activity ($EC_{50} = 0.039 \pm 0.001$ mg/mL) compared to the other extracts. The latter shows a higher antioxidant activity than that of the positive control (vitamin C and BHT). Its antioxidant effect seems to be linked to its richness in phenolic compounds. Furthermore, the *Atriplex halimus* extracts approved in this study did not contain antibacterial activity.

Keywords: *Atriplex halimus*, phenols, flavonoids, tannins, antioxidant activity, antibacterial activity.

Résumé

Notre étude a pour objectif d'estimer la quantité des composés phénoliques et d'étudier l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de trois extraits de la plante *Atriplex halimus* L. Le résultat obtenu montre que l'extrait méthanolique a présenté le rendement le plus élevé (22,4%). L'évaluation du contenu des phénols totaux révèle la présence des quantités intéressantes en polyphénols. La teneur la plus élevée est constatée dans l'extrait acétonique ($2,303 \pm 0.230$ mg EAG/ g MS). La quantification des flavonoïdes montre que l'extrait acétonique possède la meilleur teneur ($0,319 \pm 0.001$ mg EQ/ g MS). De même, le dosage des tannins nous a mené à conclure que cette plante est riche en tannins. l'activité antioxydante mesurée par le test au radical DPPH•, Nous a permis de constater que tous les extraits de la plante étudiée ont une activité antioxydante importante. L'extrait acétonique a présenté une activité très intéressante ($EC_{50} = 0,039 \pm 0,001$ mg/mL) par rapport aux autres extraits. Ce dernier montre une activité antioxydante supérieure à celui du contrôle positif (vitamine C et BHT). Son effet antioxydant semble être lié à sa richesse en composés phénoliques. Par ailleurs, les extraits d'*Atriplex halimus* approuvés dans cette étude ne contenaient pas d'activité antibactérienne.

Mots clés : *Atriplex halimus*, phénols, flavonoïdes, tannins, activité antioxydante, activité antibactérienne

Liste des abréviations

Abs : Absorption

AOE : Antioxydant enzymatique

ARE : Elément de réponse antioxydant

ATCC : Collection américaine des cultures type

BHT : Butylhydroxytoluene

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EC₅₀ : concentration efficace demi-maximale

GSH : Glutathion réduit

GSHPX : Glutathion peroxydases

GSSG : Glutathion oxydé

IC₅₀ : concentration inhibitrice demi-maximale

SOD : Superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 1: Photo de la plante <i>Atriplex halimus</i> région de de Ouled bedira	3
Figure 2: La carte représente la zone de Ouled Bedira wilaya de M'sila	10
Figure 3: Méthode de filtration par papier filtre	12
Figure 4: Méthode d'évaporation par Rotavapor.....	12
Figure 5: Réaction du radical DPPH [•] avec l'antioxydant	15
Figure 6: Echantillon de test DPPH	16
Figure 7: Préparation du milieu de culture.....	17
Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'Acide gallique.	20
Figure 9: Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	20
Figure 10: Courbe d'étalonnage de la catéchine.	21
Figure 11: Les représentations graphiques du test de DPPH des extraits.	23

Listes des tableaux

Tableau 1: Systématique d' <i>Atriplex halimus</i> .	2
Tableau 2: Les souches bactériennes pour l'antibiogramme	10
Tableau 3: Liste Produits chimiques et réactifs	11
Tableau 4: Les caractéristiques des divers extraits étudiés.	19
Tableau 5: Teneurs en phénol totaux, flavonoïdes et en tannins de différents extraits.	21
Tableau 6: Valeurs des EC ₅₀ des extraits et standards mesurés par le test DPPH*	24
Tableau 7: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits d' <i>Atriples halimus</i> .	27
Tableau 8 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la plante sur mes souches bactériennes	29

Listes des équations

Équation 1: pourcentage de labso r bances.....	15
Équation 2: Rendement d'extraction.....	19

Introduction

Introduction

De nombreuses espèces végétales sont célèbres pour leur excellent potentiel métabolique pour les substances dites secondaires. Ces composés sont synthétisés dans différentes parties de la plante (racines, tiges, feuilles, etc.). Quelles que soient les pièces et les formes qui s'y trouvent elles sont métabolisées, ces substances ont une structure et une composition chimique complexes. Cependant, leur métabolisme produit des milliers de différents ingrédients, dont quelques-uns d'entre eux sont responsables de l'efficacité du traitement (**A. Basli et al., 2012**).

La flore algérienne est riche de plusieurs milliers d'espèces médicinales, parmi ce vaste patrimoine naturel, notre choix s'est porté sur *Atriplex halimus* L., communément appelé "Guettaf" qui est un arbuste originaire d'Afrique du Nord où il est très abondant ; il s'étend également aux zones côtières méditerranéennes d'Europe et aux zones intérieures gypso-salines d'Espagne. En outre, elle est classée parmi les plantes les plus utilisées par les populations steppiques pour traiter l'hyperglycémie. En Algérie, elle est largement utilisée en thérapie, principalement pour le traitement de différents types de kystes "ovariens, utérins et mammaires" (**Ounaissia et al., 2020**).

Les maladies infectieuses et parasitaires sont un problème de santé publique en Algérie et dans les autres pays en développement à cause de leur fréquence et de leur gravité. La situation est plus préoccupante en raison de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et de l'émergence d'infections rares qui mettent en danger les traitements à l'aide des médicaments existants. Il est essentiel de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action afin de faire face aux nombreux défis que présente l'utilisation des antibactériens actuellement disponibles. Une stratégie de recherche consiste à examiner les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle (**A. Basli et al., 2012**).

L'objectif essentiel de notre travail est d'étudier l'activité anti oxydante et l'activité antibactérienne de la plante médicinale *Atriplex halimus*.

Notre travail se compose de trois parties :

La première partie porte sur une revue bibliographique à propos *Atriplex Halimus* et son utilisation ainsi qu'un rappel sur le stress oxydatif, les radicaux libres et les antioxydants.

La deuxième partie traite et est consacrée à la description du protocole expérimental adopté pour l'étude de la activité anti oxydante et l'activité antimicrobienne.

La troisième partie traite les résultats obtenus, et finalement, on termine par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE
Chapitre I
Propriétés biologiques
d'*Atriplex halimus* L.

Chapitre I. Propriétés biologiques d'*Atriplex halimus* L.

I.1. Généralités sur *Atriplex halimus* L.

L'*Atriplex halimus*, est une plante présente dans diverses régions algériennes, Cette dernière est réputée pour sa biodiversité abondante, et parmi les espèces végétales présentes, la plante est traditionnellement utilisée à des fins médicinales. Par exemple, elle est employée pour soigner les affections respiratoires comme la toux et l'asthme, ainsi que les problèmes digestifs tels que les douleurs d'estomac et la diarrhée. De plus, on lui attribue des propriétés cicatrisantes, et elle est appliquée localement sur les coupures et les plaies (**Belkhodja et al., 2012**).

L'*Atriplex halimus* est une espèce qui présente une grande variabilité, avec de multiples formes et variétés adaptées aux diverses conditions environnementales. Il peut se présenter sous la forme d'un arbuste rampant et étalé, ou bien d'un petit arbre pouvant atteindre une hauteur de 6 mètres. Les feuilles, de petite taille, sont épaisses et charnues, souvent revêtues de minuscules cristaux de sel. Les fleurs sont modestes et regroupées en grappes denses le long des tiges (**Maas et Poss, 1989**).

I.2. Systématique

La systématique d'*Atriplex halimus* est présentée dans le **tableau 1** ci-dessous :

Tableau 1:Systématique d'*Atriplex halimus* .

Règne	Plantes
Sous-règne	Phanérogame
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Caryophyllidées
Ordre	Centrospermales
Familles	Chénopodiacées
Genre	<i>Atriplex</i>
Espèce	<i>Atriplex halimus</i> L.
Nom vernaculaire:	El'gtaf (القطف)

I.3. Description botanique

Atriplex halimus est une plante adaptée aux milieux salins présente dans les régions steppiques des hauts plateaux et du littoral. Elle se développe dans des conditions favorables, présentant des polymorphismes en fonction de la salinité. Les feuilles de cette plante sont relativement grandes, mesurant entre 2 et 5 cm de longueur, environ deux fois plus longues que larges. Elles sont épaisses et charnues, de formes ovales, et généralement lisses et non dentelées. Les fleurs de l'*Atriplex halimus* sont monoïques, se regroupant en épis denses et courts (**Ozenda, 2004**). Les tiges de la plante sont dressées, de couleur blanchâtre, ligneuses et présentent une ramification importante (**Figure 1**).



Figure 1: Photo de la plante *Atriplex halimus* région de de Ouled bedira(Willaya de M'sila).

I.4. Répartition géographique d'*Atriplex halimus* dans le monde entier

Les espèces du genre *Atriplex* sont présentes dans des régions caractérisées par un climat tempéré, méditerranéen et subtropical, à des altitudes comprises entre 20 et 50 mètres du nord au sud. *Atriplex halimus* se propage naturellement depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie occidentale, incluant le sud du Portugal, la France, le sud et l'est de l'Espagne (y compris les îles Canaries), l'Italie, la Grèce, Malte, la Turquie, Chypre, la Syrie, le Liban, la Jordanie, la Tunisie, le Maroc, l'Algérie, la Libye, l'Égypte et l'Arabie saoudite. En raison de ses qualités en tant que plante fourragère, elle a été introduite à Oman, en Iran, en Irak, au Pakistan, en Afrique du Sud, au Chili, en Argentine, en Nouvelle-Zélande et aux États-Unis (**Walker et al., 2014**).

I.5. Composition chimique

Atriplex halimus est une plante qui fournit les vitamines A, C et D. Elle renferme des composés tels que les tanins, les flavonoïdes, les saponines, les alcaloïdes, les acides gras, les stérols, les acides aminés et les sucres. Elle contient également des fibres, des sels minéraux (Hadjadj et al., 2015 ; Chikhi et al., 2014; Nedjimi et al., 2013; Abbad et al., 2004).

I.6. Propriétés pharmacologiques

Plusieurs études ont été réalisées sur l'analyse chimique des extraits et des huiles essentielles de l'*Atriplex*. Les travaux menés par Emam et ses collaborateurs (Emam, 2011) ont porté sur les composés bioactifs de l'*Atriplex halimus* en Égypte, tandis que Benhammou et son équipe ont étudié les propriétés antioxydantes des principaux métabolites secondaires présents dans les feuilles et les tiges de l'*Atriplex halimus*. Les résultats de cette dernière étude révèlent que les fractions d'acétate éthylique et de butanol présentent une forte capacité à fournir de l'hydrogène pour réduire le fer (Benhammou et al., 2009).

D'autre part, une étude menée par Aharonson et al. en 1969 a montré que l'extrait aqueux de l'*Atriplex halimus*, ainsi que le jus pressé des feuilles, ont un effet hypoglycémiant chez les rats normaux et diabétiques (Aharonson et al., 1969). De plus, Mertz et al., en 1973 ont démontré que les cendres de l'*Atriplex halimus* potentialisent l'effet de l'insuline (Mertz et al., 2011).

Au Sahara occidental, les cendres d'*Atriplex halimus*, mélangées à de l'eau, sont utilisées pour traiter l'acidité gastrique, tandis que les graines sont utilisées comme vomitif (Belakhdar, 2006). Par ailleurs, les feuilles sont utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'hypertension et même du rhumatisme. Une étude récente indique que l'*Atriplex halimus* possède des propriétés antioxydantes et hypoglycémiantes (Adouane, 2015).

I.7. Applications en thérapie traditionnelle

L'*Atriplex halimus* est utilisé comme fourrage pour le bétail et a de nombreuses applications dans la médecine traditionnelle, notamment dans le traitement du diabète, des troubles cardiaques, des maladies thyroïdiennes et de différents types de kystes (Chikhi et al., 2014; Ounaissia et al., 2020).

Cependant, les formations d'*Atriplex halimus* sont de plus en plus dégradées. Cette espèce se trouve dans des régions où le déséquilibre écologique s'accroît et où la désertification prend des proportions importantes. Elle peut contribuer à la valorisation des sols marginaux et dégradés, ainsi qu'à l'amélioration de la production végétale et animale dans plusieurs régions défavorisées (Houérou, 1992 ; Bouchoukh, 2010).

Chapitre II

Activité antioxydante

Chapitre II. Activité antioxydante

II.1. Définitions

II.1.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont une classe de substances capables de neutraliser les radicaux libres et de prévenir le développement de maladies associées au stress oxydatif. Nous mentionnons l'un des antioxydants naturels les plus connus comme l'atocophérol (vitamine E) ,l'acide ascorbique(vitamine C) ,et les composés phénoliques.(Sarr et *al.*, 2015)

II.1.2. Antioxydant

Un antioxydant peut être défini comme suit : "toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe de manière significative l'action de l'antioxydant (Young et Woodside, 2001).

II.1.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif, conséquence d'un déséquilibre entre les prooxydants et les antioxydants dans l'organisme, est un phénomène clé dans les maladies chroniques (khadidja et *al.*, 2020).

Dans des conditions physiologiques, la production d'AOE est entièrement contrôlée par le système de défense de l'organisme. Antioxydants et pro-oxydants équilibrés. Le stress oxydatif résulte de situations dans lesquelles le corps perd le contrôle de la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Peut être impliqué dans le développement de conditions médicales liées au vieillissement ou à l'âge (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, etc.) (Haleng et *al.*, 2007).

II.1.4. Radicaux libre

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) Contient des électrons non appariés. pas ce déséquilibre est temporaire et sera rempli par l'ajout d'un autre électron Ou en transférant son électron libre à une autre molécule (Afonso et *al.*, 2007).

Les radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont reconnus à des concentrations modérées pour leurs diverses fonctions physiologiques, allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les pathogènes (Bencheikh et *al.*, 2021).

II.2. Système de défense contre les radicaux libres

II.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques peuvent être divisés en deux groupes :

- (i) les enzymes antioxydantes primaires ou à action constitutive (superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion (GSH) peroxydase, et thiorédoxine), qui ont pour fonction de maintenir le tonus dans les cellules et de maintenir l'équilibre redox stable.
- (ii) l'élément de réponse antioxydant (ARE), qui est un élément de réponse à l'oxydation. Enzymes pilotées par l'élément de réponse antioxydant (ARE) **(Daenen et al., 2018)**.

II.2.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

La SOD élimine les radicaux superoxydes par dismutation radicale en H_2O_2 et OH^+ et OH^- (Mn SOD dans les mitochondries CuZn SOD dans les mitochondries cytosol et globules rouges). L'élimination devient possible Les radicaux superoxydes provoquent l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et distance dangereuse. La synthèse de SOD à lieu Rétroaction négative due à une concentration élevée peroxyde d'hydrogène. Les activités de SOD sont Dépend de l'apport alimentaire en cuivre et/ou de l'apport en cuivre Faible teneur en zinc **(Goudable et Favier, 1997)**.

II.2.1.2. Les catalases

Les catalases Réduit le peroxyde d'hydrogène en H_2O_2 . Libère de l'oxygène et de l'eau. Est localisé surtout dans les peroxysomes. Ils n'excluent pas C'est du peroxyde d'hydrogène, mais son rôle surtout en présence d'ions de fer est très important En éliminant l'excès de peroxyde d'hydrogène Développez. La quantité est petite Plus efficace que les systèmes suivants : glutathion peroxydas **(Goudable et Favier, 1997)**.

II.2.1.3. I.2.1.3. Les glutathion peroxydases (GSHPX)

GSHPX réduit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et hydroperoxyde lipidique. Pour eux actifs, ils utilisent du glutathion réduit (GSH), comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) **(Goudable et Favier, 1997)**.

II.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques, ou antioxydants de faible poids moléculaire, se trouvent dans le plasma, les fluides extracellulaires, les fluides intracellulaires, les lipoprotéines et les membranes. Intracellulaires, les lipoprotéines et les membranes. Outre le GSH, ce groupe comprend plusieurs antioxydants alimentaires ainsi que des composés synthétisés dans l'organisme, qui peuvent être divisés en deux en deux sous-groupes : les antioxydants hydrosolubles et les antioxydants liposolubles. Les antioxydants hydrosolubles et les antioxydants liposolubles **(Daenen et al., 2018)**.

II.2.2.1. Vitamine E

Il agit in vivo et in vitro en neutralisant la radicale libre libérée, devenir un non-radical Toxique. La réduction de la vitamine E oxydée est apportée par la vitamine C **(Goudable et Favier, 1997)**.

II.2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)

Il agit en régénérant la vitamine E dans le corps, Très peu in vitro. Reste sous cette forme in vivo Réduit par l'action de la déhydroascorbate réductase Utiliser le glutathion comme cofacteur **(Goudable et Favier, 1997)**.

II.2.2.3. β -carotène

Le bêta-carotène est fourni par l'alimentation doté de plusieurs capacités. il est précurseur de la vitamine A il absorbe l'oxygène singlet lorsque l'oxygène est faible tension d'oxygène, et avec d'autres caroténoïdes, Il a la capacité d'arrêter la réaction en chaîne de peroxydation lipidique. Il protège les structures cellulaires Contre l'attaque oxydative : il s'oppose à la cyto- et a la génotoxicité de nombreux agents **(Goudable et Favier, 1997)**.

.

Chapitre III

Activité antibactérienne

Chapitre III. Activité antibactérienne

De nombreuses maladies chez les hommes sont associées à des infections bactériennes. Pour remédier à cette situation, on a recours aux antibiotiques prescrits par la médecine conventionnelle, mais ils sont difficiles à combattre contre les infections bactériennes. En raison de la résistance croissante des micro-organismes aux antibiotiques, les chercheurs travaillent maintenant à extraire des remèdes naturels efficaces du règne végétal pour le traitement de diverses conditions médicales (Ouattara et al., 2017).

Les bactéries sont des organismes extrêmement minuscules qui ne peuvent être vus qu'au microscope." les bactéries sont courantes dans la nature, elles existent non seulement dans les organismes, l'environnement qui nous entoure, dans l'air, l'eau, le sol. Ils prospèrent lorsqu'ils trouvent conditions de vie favorables (Camille, 2014)

III.1. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

III.1.1. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, se divisant sur de nombreux plans pour former des amas réguliers ou irréguliers comme des grappes de raisin, dits staphylocoques (en grec c'est staphylos), ils sont immobiles et se développent sur des milieux contenant 5 % NaCl et certains jusqu'à 10 et même 15 %. Ils sont soit aérobies, soit anaérobies facultatifs. Les staphylocoques sont des bactéries communes largement distribuées dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils se produisent plus fréquemment et à des concentrations plus élevées sur la surface muqueuse de la peau des mammifères. (Kahlouche-Riachi, 2014).

III.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce genre appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Les bactéries de cette famille sont en forme de bâtonnets, mobiles par des cils polaires, aérobies strictes. *Pseudomonas* se cultive facilement sur des milieux courants, en conditions aérobies, à 30°C, certaines espèces comme *Pseudomonas aeruginosa* sont capables de se cultiver à 41°C et même 43°C ; Ce caractère est utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment est assez fréquente dans le genre (Kahlouche-Riachi, 2014).

III.1.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, de forme non sporulée et de type anaérobie facultatif. Il a une longueur de 2 à 6 µm et une largeur de 1,1 à 1,5 µm. La majorité de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux est constituée de bactéries *E. coli*. Certaines souches sont virulentes et peuvent provoquer des infections spontanées

des voies digestives ou urinaires chez l'homme ou chez certaines espèces animales, ainsi que des méningites néonatales. D'autres souches de la flore commensale peuvent causer une variété d'infections opportunistes, surtout chez les personnes dont les défenses immunitaires sont affaiblies (**Bensaadi et Guemmouda, 2017**).

III.2. L'antibiogramme

L'antibiogramme est un test particulier en biologie clinique car il s'adresse aux organismes vivant infectieux mais pas pour le corps humain. Il constitue un outil de mesure de la résistance bactérienne. Sa pratique et son interprétation nécessitent beaucoup de connaissances cliniques, pharmaceutiques, bactériologiques, biochimiques et génétiques (**Marcel, 2005**).

III.3. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques influencent la formation de la paroi bactérienne, qui est composée de mucopeptide. Les antibiotiques bloquent la transpeptidase, qui est responsable de la synthèse de la paroi des cellules-filles, ce qui entraîne la formation de paroi incomplète, ce qui entraîne l'éclatement de la bactérie. Les β lactamines, la bacitracine et la vancomycine en sont des exemples (**Kahlouche-Riachi, 2014**).

PARTIE
EXPERIMENTALE
Chapitre IV
MATERIEL ET METHODES

Chapitre IV. Matériels et méthodes

IV.1. Matériel

IV.1.1. Matériel végétal

La plante a été récoltée dans la région de de Ouled bedira wilaya de M'sila (**Figure2**) au mois de février 2023. La plante investiguée est séchée à l'abri de la lumière pendant 1 mois, et à température ambiante, Après le séchage, le matériel végétal est finement broyé et conservé dans des sacs en papier jusqu'à leur extraction.

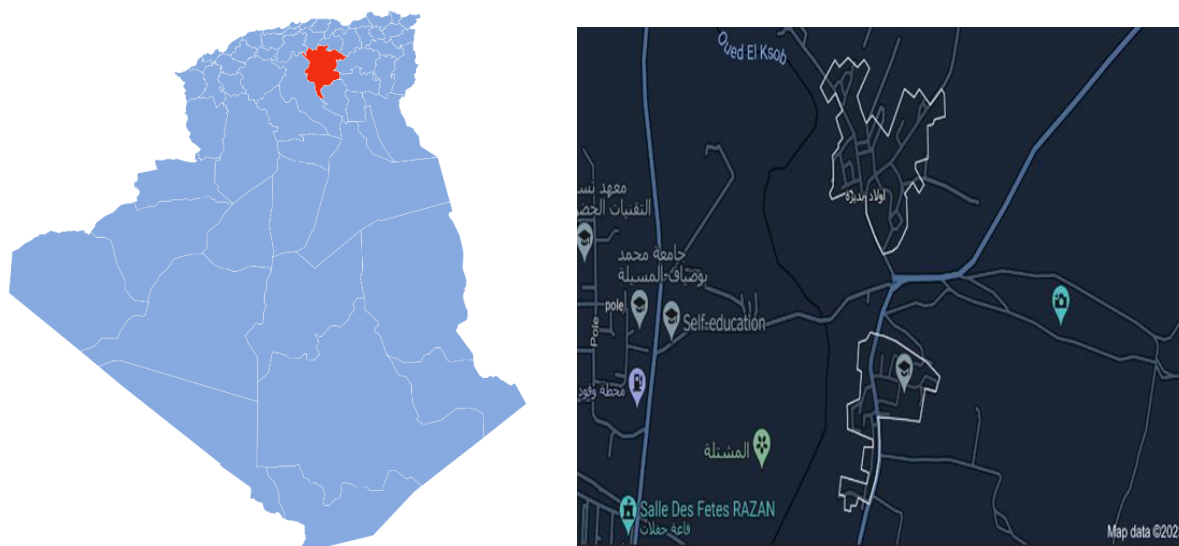


Figure 2: La carte représente la zone de Ouled Bedira wilaya de M'sila

IV.1.2. Matériel microbiologique

Les souches bactériennes :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'*Atriplex halimus* a été faite sur trois souches bactériennes sensibles, (voir **le tableau** ci-dessous)

Tableau 2: Les souches bactériennes pour l'antibiogramme

Les souches bactériennes	Gram des bactéries
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23922	négative
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	négative

IV.2. Appareillages et produits chimiques

La liste des produits chimiques et réactifs, de la verrerie, de l'appareillage et d'autres équipements sont recensés dans le **tableau 3** tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé.

Tableau 3: Liste Produits chimiques et réactifs

Appareillages et d'autres équipements	Produits chimiques et réactifs
- Agitateur, barreau magnétique - Ance de platine, bec bunsen - Bain marie - Balance analytique, Spatule, Verre de montre - Béchers - Boîtes de pétri de 90mm de diamètre - Broyeur - Cuvette en quartz - Ecouvillons stériles, pipettes de pasteurs - Eprouvette graduée de classe A (5ml) - Fioles jaugées classe A et B (5, 10, 25, 100, 250, 500, 1000 ml) - Incubateur bactériologique 37°C - Micropipette (10-100µl, 100-1000µl) - Papier filtre - Porte tube à essai, Tube à essai (5 - 6 ml) - Rotavapeur, spectrophotomètre UV/Visible	- 2,2-diphényl1-picrylhydrazyl (DPPH) - Acétone - Acide chlorhydrique (HCl, 37%) (CARLO ERBA) - Acide gallique - Butylhydroxytoluène (BHT) - Carbonates de sodium (Na₂CO₃) - Catéchine (C₁₅H₁₄O₆) - Chlorure d'aluminium (AlCl₃) - Dimethylsulfoxyde (DMSO) - Ethanol(SPECILAB) - Hexane(EMPLURA) - Méthanol(HONEYWELL) - Quercétine hydraté (C₁₅H₁₀O₇•H₂O) - Réactif Folin-Ciocalteu - Vanilline (C₈H₈O₃). - Vitamine C (Acide ascorbique)

IV.3. Méthodes

IV.3.1. Préparation des extraits

La Préparation des extraits a été accomplie selon le protocole rapporté par **Hertog et Hollman (1992)** , Après avoir broyé finement de la plante une masse d'environ 25g du marc épuisé ont été macéré dans 3 systèmes de solvants de polarité croissante : Hexane (100%) ; acétone (100%), méthanol (100%), pour une durée de 48 heures et à température ambiante. Ensuite, chaque mélange est filtré sur du papier filtre (papier Wattman N°4) (**Figure 3**). Après chaque extraction, le solvant utilisé est évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapeur. (**Figure 4**) Ensuite, le résidu récupéré est pesé puis solubilisé dans des volumes différents de solvant DMSO. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière pour être utilisés pour les différentes analyses. Dont nous avons obtenu alors 03 extraits différant : extrait hexanique, extrait acétonique et extrait méthanolique, Ces extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière pour être utilisés pour les différentes analyses.



Figure 3: Méthode de filtration par papier filtre **Figure 4:** Méthode d'évaporation par Rotavapor

IV.3.2. Quantification des composés phénoliques

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité antioxydante des plantes (**Li et al., 2007**). Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antiallergiques, antithrombotiques et vasodilatatrice qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (**Gulcin et al., 2010**). C'est la raison pour laquelle, les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins d'*Atriplex halimus* ont été effectués dans cette étude.

IV.3.3. Dosage des polyphénole

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al 1999**). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (**Boizot et al., 2006**). 100 µl de chaque extrait ont été introduits dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après incubation pendant 2 minutes, 2 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 2% ont été ajoutées, puis les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g de MS).

IV.3.4. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement carbonyle CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) capte deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau- Gayon et al., 1972**). La teneur en flavonoïdes des extraits obtenus est déterminée par la méthode de **Lamaison et Carnet (1990)**. Le dosage des flavonoïdes nécessite aussi l'établissement d'une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde standard (la quercétine).

Brièvement, 1ml d'extrait (chaque extrait est dilué dans son solvant d'origine), est ajouté à 1ml de la solution de chlorure d'aluminium 2% (AlCl_3) (Solution méthanolique). On laisse incubé pendant 20 min à température ambiante. La lecture est effectuée à 430 nm par un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc. La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de la quercétine et exprimée en milligrammes d'équivalent en quercétine par gramme de la matière sèche (mg EC/g de MS).

IV.3.5. Dosage des tannins

Le test de taninns était basé sur une version modifiée de (**Price, et al., 1978**). Les quantités des tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto., 1985**). Les tanins sont des polymères caractérisés par la présence d'un nombre suffisant de groupe hydroxyphénoliques permettant des combinaisons plus stables avec les protéines et alcaloïdes. Ces composés sont généralement amorphes, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Quettier-Deleu et al., 2000**). Pour 400µl de l'échantillon ou du standard, on ajoute 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol (m/v)), et 1,5ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 20 min. l'absorbance est mesurée à 500 nm par spectrophotomètre UV-visible. Contre un blanc. La catéchine est utilisée comme standard. La teneur en tannins de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de la catéchine et exprimée en milligrammes d'équivalent en catéchine par gramme de la matière sèche (mg E Cat/g de MS).

IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

La propriété antioxydante a attiré l'attention de nombreux laboratoires et chercheurs dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels utilisés dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques d'une part et d'autre part pour valoriser l'effet préventif de ces métabolites contre les différentes pathologies liées au stress oxydatif. En effet, Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres. Ainsi, ces différentes méthodes donnent des résultats assez distincts et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires. De ce fait, dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer les capacités totales antioxydantes des extraits par la mesure *in vitro* de leur pouvoir de piégeage du radical libre DPPH[•].

Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution à différentes dilutions nous ont permis d'exprimer le pouvoir antioxydant par la concentration efficace médiane EC₅₀ qui représente la concentration de l'antioxydant nécessaire pour neutraliser 50% de radicaux libre totaux initialement introduits (test de DPPH[•]).

Les valeurs des EC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des extraits testées. Nous avons également, testé la vitamine C et le BHT pris comme antioxydants de référence.

IV.4.1. Test de l'effet scavenger du radical DPPH[•]

Le DPPH[•] fut l'un des premiers radicaux libres (**Figure 5**) utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Popovici et al., 2009**). Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Le radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié d'azote et, après réaction avec l'atome d'oxygène d'un piègeur de radicaux de la réduction de DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazin) est formé, qui est jaune pâle (**Villaño, et al., 2007**). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration de ce radical à 515-520 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (**Sanchez-Moreno C., 2002**).

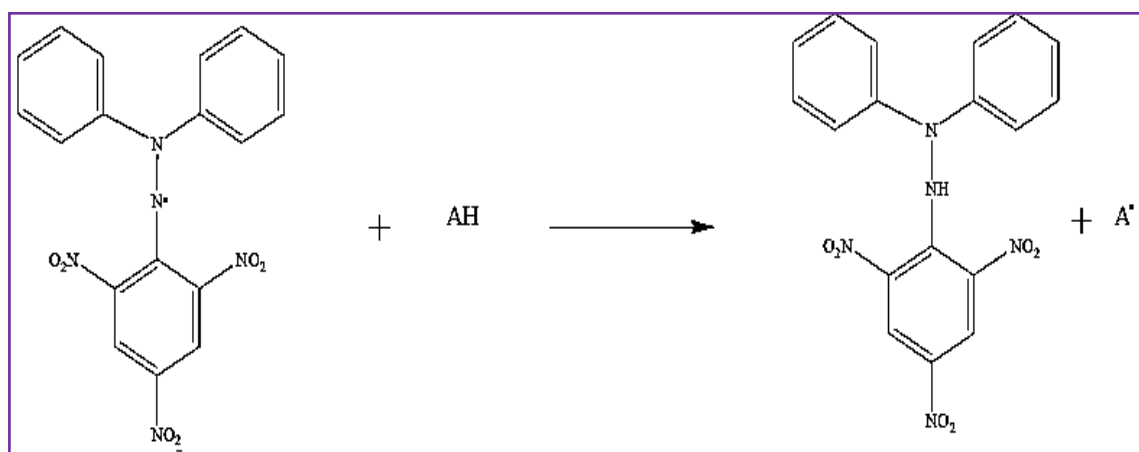


Figure 5: Réaction du radical DPPH[•] avec l'antioxydant (AH) (**Villaño, et al., 2007**).

Brièvement, 500 µl des solutions d'extraits ou standards (vitamine C, BHT) des différentes concentrations sont ajoutés à 500 µl de DPPH (60µM), Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, où le contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH[•]. Le pouvoir antiradicalaire (PAR %) du radical DPPH[•] par les extraits ou standards est estimé selon l'équation ci-dessous :

Équation 1 : pourcentage de laborbances

$$\text{PAR\%} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{Ech}}}{\text{Abs}_{\text{CN}}} \right) \times 100$$

Où ;

Abs_{CN} : Absorbance en absence d'antioxydant (contrôle négatif).

Abs_{Ech} : Absorbance en présence d'antioxydant (extrait ou standard, **Figure 6**).



Figure 6: Echantillon de test DPPH

IV.5. Evaluation l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide qui permet de déterminer la sensibilité des bactéries. cette technique employée est décrite par **Berghe et Vlietinck (1991)**.

Le milieu gélose Mueller Hinton est versé dans une boîte à pétri d'une épaisseur de 8 mm. Après avoir été inoculé par écouvillonnage pour diluer le microorganisme à tester, des puits de 6 mm de diamètre sont créés de manière concentrique sur les milieux. Ensuite, après une pré-diffusion de 45 minutes à température ambiante, les souches sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

➤ Préparation du milieu de culture

pour cette étude le milieu Muller-Hinton préparé est approprié : 38 grammes de gélose Muller-Hinton doivent être dissous dans un litre d'eau distillée.

Il faut homogénéiser bien, Faire bouillir en agitant jusqu'à ce qu'il soit complètement dissous, puis autoclave pendant 15 minutes à 121°C et verser le milieu dans les boîtes de Pétri, (**Figure 7**).



Figure 8: Préparation du milieu de culture

➤ **Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les embouts jaunes (6 mm de diamètre) enrobés de papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Préparation de l'inoculum**

À l'aide d'une anse de platine, on racle quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées pendant 24 heures à 37°C. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland ou à une DO de 0,08 à 0,1 à 625 nm.

➤ **Ensemencement**

Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne et pressé fermement sur la paroi interne du tube pour effectuer l'ensemencement. L'écouvillon est frotté sur toute la surface gélosée, de haut en bas. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne et pressé fermement sur la paroi interne du tube pour effectuer l'ensemencement. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60 degrés.

De même Les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques appropriés et prêts à l'emploi ont également été comparés aux résultats des extraits testés et des puits contenant le DMSO (témoin négatif).

Les boîtes de Pétri sont finalement incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

IV.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Principe : La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de la molécule à tester qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18 heures d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. (Carryn., 2013).

Les valeurs CMI et CMB peuvent être déterminées à l'aide de la méthode de dilution. Il est possible d'utiliser ces techniques pour la gélose et le bouillon. La concentration minimale inhibitrice (CMI) sera la concentration la plus faible de chaque composant ne montrant aucune croissance. La recherche sur le CMB l'a confirmé. La CMB est la concentration antimicrobienne la plus faible qui détruit 99,9 % de la concentration cellulaire finale. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique est utilisée pour évaluer la sensibilité des bactéries. L'Organisation mondiale de la santé a suggéré cette méthode de référence. Il existe différentes méthodes pour mesurer la CMI d'une bactérie spécifique. (CLSI-M7-A7 , 2006).

IV.6. Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel EXCEL. Les résultats des tests effectués in vitro sont exprimés en moyenne $\pm$ SD (déviation standard) (SD) en trois essais (n=3). Les valeurs de EC_{50} sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Chapitre V

RESULTATS ET
DISCUSSION

Chapitre V. Résultats et discussion

V.1. Rendements des extractions

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il est dépendu de la composition de l'échantillon.

La préparation des extraits de la plante étudiée est réalisée par l'utilisation d'une série de solvants à polarité croissante : hexane, acétone, méthanol permettant ainsi la séparation des composés selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction. Ces procédés d'extraction ont permis d'obtenir trois extraits : l'extrait hexanique, acétonique et méthanolique.

Après les extractions, et la récupération des extraits, leurs rendement est été déterminé par rapport à 25 g pour les trois solvants hexane, acétone et méthanol et exprimé en pourcentage. Les rendements d'extraction (R%) ont été déterminés par la formule suivant :

Équation 2: Rendement d'extraction

$$R\% = \frac{\text{masse de résidus d'extrait}}{\text{masse de la poudre végétale}} \times 100$$

La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait sont représentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Les caractéristiques des divers extraits étudiés.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Extrait hexanique	Poudre	Vert	1,2
Extrait acétonique	Poudre	Vert foncé	4,64
Extrait méthanolique	Poudre	Vert	22,4

On constate que les extraits hexanique, acétonique et méthanolique ayant un aspect de poudre. Ainsi, nous constatons que les rendements de l'extraction varient considérablement. Le rendement le plus élevé a été enregistré chez l'extrait méthanolique avec une valeur de 22,4%, suivi par l'extrait acétonique avec un rendement de 4,64 %, alors que la valeur la plus faible est de 1,2% pour l'extrait hexanique. Ceci pourrait être expliqué par la capacité importante de méthanolique et du acétonique d'extraire des composés polaires vis-à-vis celle de l'hexane. D'ailleurs, Le rendement d'extraction est tributaire de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, et le temps d'extraction.

V.2. Dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins de chaque extrait de la plante sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage de l'acide gallique, de la quercétine et de la catéchine respectivement (**Figures 8, 9 et 10**). Ces valeurs représentent la moyenne de trois répétitions $\pm$ écart type. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 4**.

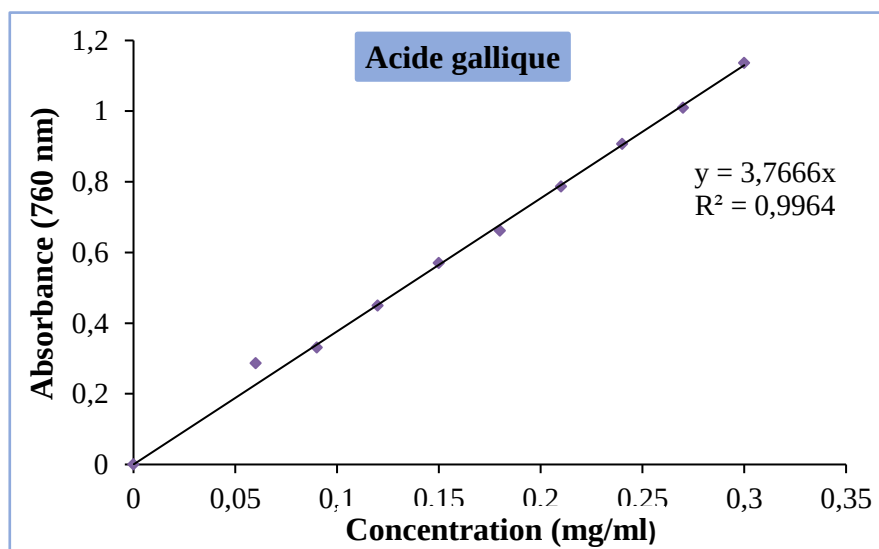


Figure 9: Courbe d'étalonnage de l'Acide gallique.

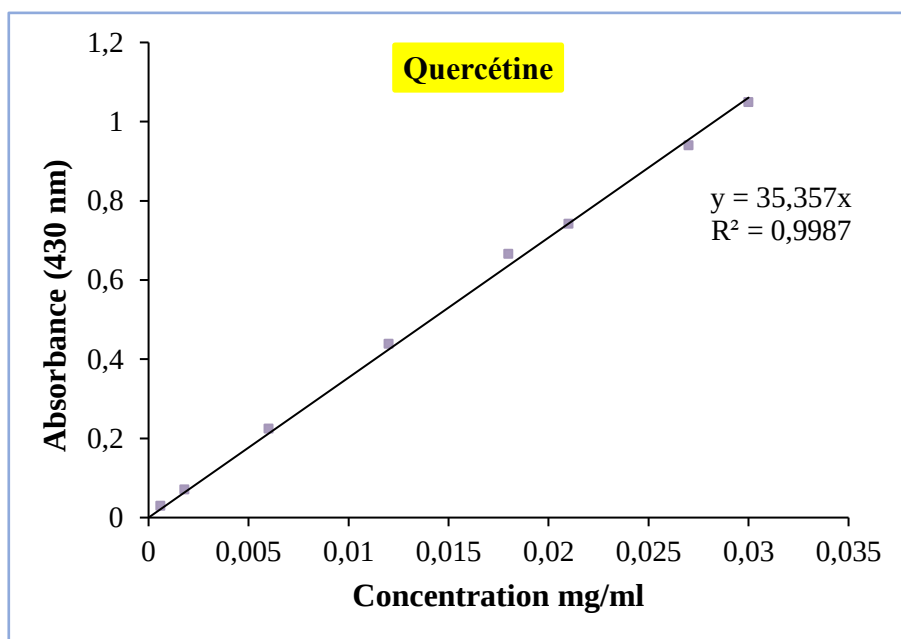


Figure 10: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

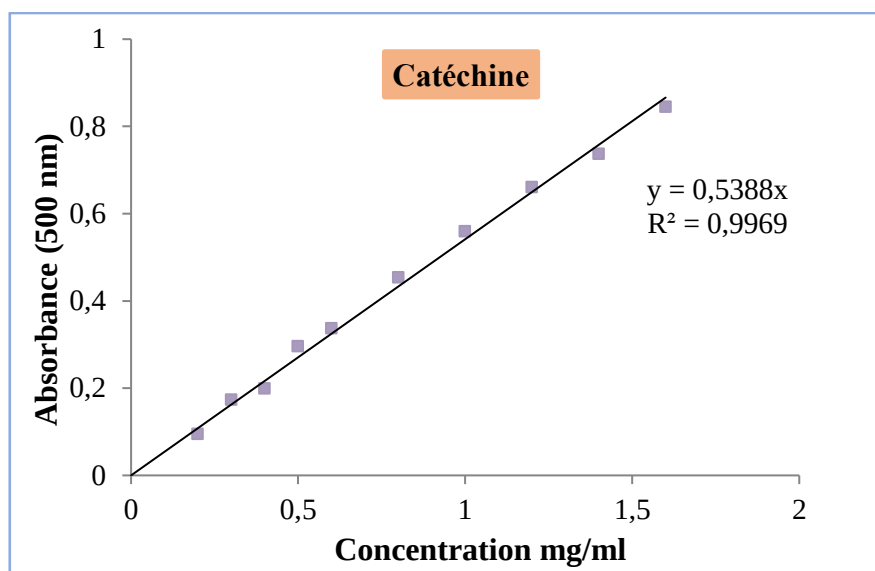


Figure 11: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Tableau 5: Teneurs en phénol totaux, flavonoïdes et en tannins de différents extraits.

Solvant d'extraction	Tannins (mg/g)	Flavonoïdes (mg/g)	Phénols totaux (mg/g)
Hexane	0,331±0,011	0,015±0,002	4,402±0.229
Acétone	2,303±0.230	0,319±0.001	47,273±1.840
Méthanol	1,344±0,115	0,2158±0.025	20,289±1.109

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes (**Djeridane et al, 2010 ; Singleton et al, 1999**), car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (760 nm) utilisée (**Huang et al., 2005**). Selon les résultats mentionnés dans le **tableau 5**, les teneurs en phénols totaux varient dans les extraits de 0,331±0,011 à 2,303±0.230 mg EAG/g de la matière sèche. L'extrait acétonique montre une forte teneur en phénols totaux (2,303±0.230 mg EAG/g MS) suivi par l'extrait méthanolique (1,344±0,115 mg EAG/g MS). Tandis que, les teneurs les plus faibles sont remarquées pour l'extrait hexanique (0,331±0,011 mg EAG/g MS).

Nous constatons d'après ses résultats, que le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques est Acétone, tandis que l'hexane représente le mauvais solvant d'extraction des composés phénoliques. Cependant, ces résultats sont nettement supérieurs au résultat trouvé par **Bensafieddine et al, (2019)**, ont trouvé une teneur de 0,380±0,071 mg EAG/ g MS de l'extrait méthanolique et 1,962±0,038 mg EAG/ g MS de l'extrait acétonique.

Pour le dosage des flavonoïdes, une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits d'*Atriplex halimus* l'addition de la solution de chlorure d'Aluminium (AlCl_3), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés. On remarque d'après les résultats du **tableau 4** que la quantité des flavonoïdes varie entre $0,015 \pm 0,002$ et $0,319 \pm 0,001$ mg EQ/g MS. Le taux des flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait acétonique ($0,319 \pm 0,001$ mg EQ/g MS), suivi par l'extrait méthanolique ($0,2158 \pm 0,025$ mg EQ/g MV). Par la suite viennent l'extrait hexanique avec le teneur ($0,015 \pm 0,002$ mg EQ/g MS).

Le dosage des tannins révèle que la fraction acétonique renferme une importante teneur en tanins condensés, avec une valeur de $47,273 \pm 1.840$ mg EC/g de la matière sèche. En revanche, les fractions méthanolique et hexanique ont enregistré les teneurs $20,289 \pm 1.109$ et $4,402 \pm 0.229$ mg EC/g MS respectivement. Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction des tanins condensés, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires.

V.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant. Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par quatre mécanismes : par transfert d'électron, par transfert d'atome d'hydrogène, par chélation des métaux ou par inhibition des enzymes oxydatives

De ce fait, l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits et standards a été évaluée par le test de DPPH. Les résultats obtenus à partir de ces trois tests sont exprimés par le paramètre EC_{50} . Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant. Alors, l'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant, développant une gamme de concentrations qui donne des taux d'inhibition (**Figures 9**). Le **tableau 5** résume les différents résultats des EC_{50} de l'activité antiradicalaire déterminée à l'aide du test DPPH.

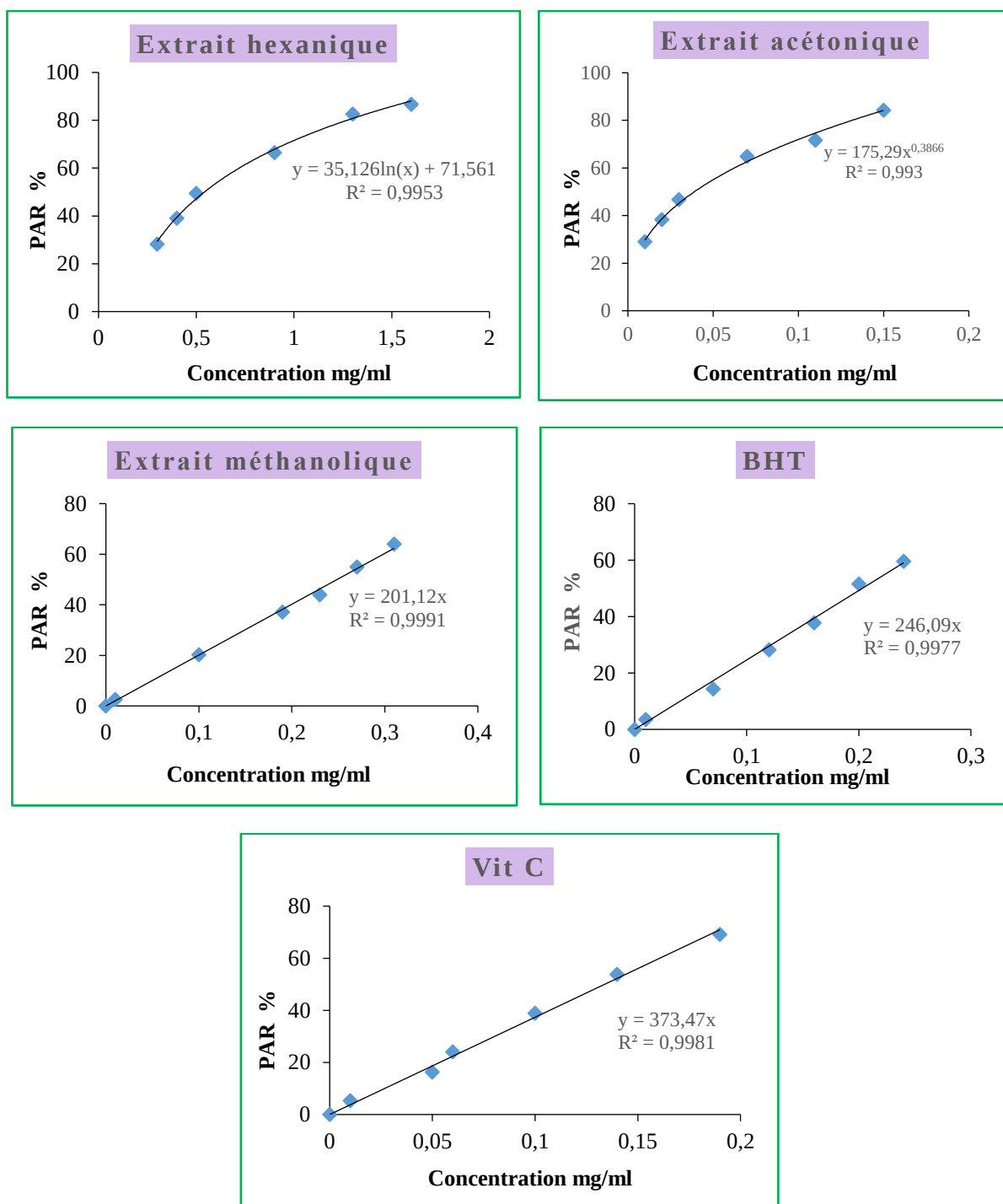


Figure 12: Les représentations graphiques ($\text{par}\% = f(C)$) du test de DPPH des extraits étudiés et de la vitamine C et du BHT.

Le paramètre EC_{50} a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de l'activité antioxydante. Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité. L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante n'est élevée, plus la valeur d' EC_{50} est inférieure. Les valeurs des EC_{50} obtenus à travers ce screening antioxydant représentent la moyenne de trois essais réalisés en parallèle $\pm$ l'écart-type. Comme il n'existe pas

de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence.

Le paramètre EC_{50} a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de l'activité antioxydante (autrement appelé la valeur IC_{50}). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité. Ce paramètre a été présenté par BrandWilliams et ses collaborateurs (**Brand-Williams W., 1995 ; Bondet V., 1997**). Il a été employé plus tard par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (**Jian T., 2007**). L'inconvénient de ce paramètre est que plus l'activité antioxydante est élevée, plus la valeur d' EC_{50} est inférieure. Les valeurs des EC_{50} obtenus à travers ce screening antioxydant représentent la moyenne de trois essais réalisés en parallèle $\pm$ l'écart-type, (**Tableau 6** ci-dessous).

Tableau 6: Valeurs des EC_{50} des extraits et standards mesurés par le test DPPH*

Extraits et standards	EC_{50} (mg/ml)
Extrait hexanique	0,541 $\pm$ 0,009
Extrait acétonique	0,039 $\pm$ 0,001
Extrait méthanolique	0,248 $\pm$ 0,002
BHT	0,203 $\pm$ 0,003
Vitamine C	0,133 $\pm$ 0,002

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence. A cet effet, nous avons utilisé l'acide ascorbique, et le BHT comme contrôles positifs doués des activités antioxydantes très importantes. Ces antioxydants sont utilisés comme des agents conservateurs dans les industries agroalimentaires.

Dans le test du DPPH, ce radical est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin B., 2008**). A température ambiante, le radical DPPH* présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. On peut donc détecter la diminution de l'intensité

de la coloration par spectrophotométrie. Cette réduction rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées.

Le **tableau 6** représente les résultats d'activité antiradicalaire obtenus par le test de l'effet scavenger du radical DPPH[•] pour tous les extraits ainsi que les antioxydants de référence. Les valeurs d'EC₅₀ varient entre 0,039±0,001 et 0,541± 0,009 mg/mL, L'extrait acétonique s'est avéré le plus actif avec une valeur d'EC₅₀ de 0,039±0,001 mg/mL, tandis que le plus faible pouvoir antioxydant est observée pour l'extrait hexanique avec une valeur EC₅₀ = 0,541± 0,009 mg/mL. Ces résultats montrent clairement que l'extrait acétonique a montré une meilleure activité antiradicalaire par rapport à tous les extraits (méthanolique et hexanique) et les antioxydants de référence Vitamine C (EC₅₀ = 0,133± 0,002 mg/ml) et BHT (EC₅₀ = 0,203± 0,003 mg/ml). Cette bonne activité antiradicalaire de cet extrait peut être expliquée par la nature des composés peu polaires qui exercent des capacités donatrices de proton très remarquables.

En revanche, Ces résultats montrent que les antioxydants de référence Vitamine C et BHT, ont exhibé des activités antiradicalaires supérieures à celle d'extraits méthanolique et hexanique avec des EC₅₀ de 0,248± 0,002 mg/ml et 0,541± 0,009 mg/ml respectivement.

Les résultats obtenus lors de la présente étude confirment l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire, en effet l'extrait hexanique a exposé une teneur faible en polyphénols totaux et a été également enregistré comme l'extrait qui possèdent la plus faible activité réductrice de DPPH, les mêmes résultats ont été mis en évidence dans un grand nombre des travaux similaires (**Djeridane et al., 2015; Khacheba et al., 2014**). Ainsi, la seule explication de cette indépendance activité anti- DPPH[•]-teneurs phénoliques est que la composition des extraits en polyphénols est différente. Ainsi, l'existence de certaines molécules individuelles responsables de cette activité peut influencer sur le pouvoir antiradicalaire.

Selon la littérature, les métabolites secondaires en particulier les polyphénols sont connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres. On peut déduire que l'effet antiradicalaire important de l'extrait acétonique d'*Atriplex halimus* est probablement lié à sa richesse en tanins, en flavonoïdes et alcaloïdes. Ces composés sont dotés d'activité antioxydante en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle ou bien par leurs propriétés chélatrices des ions métalliques.

Cela suggère que les activités antioxydantes des extraits étudiés sont liées à leur rendement d'extraction. En outre, ces résultats montrent que nos extraits fournissent des activités antioxydantes assez importantes qui peuvent être liées à la présence de certaines molécules bioactives. Alors, la future recherche sera consacrée pour déterminer la teneur de différents phénols et de leur partie relative dans le potentiel antioxydant. Ainsi, le pouvoir antioxydant des extraits pourra être encore soutenue par la teneur en composés phénoliques et de leurs types de molécules individuellement actives.

Nous pouvons conclure que plant d'*Atriplex halimus* étudié peut être considérée donc comme une source potentielle d'antioxydants naturels, dont elle peut être utilisée en thérapeutique ou dans les différents domaines d'agroalimentaires comme additifs.

V.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats expérimentaux obtenus indiquent qu'il n'y a pas d'effet antibactérienne observé pour les extraits étudiés. Cependant, cela ne signifie pas que les autres extraits, obtenus à partir de différentes méthodes d'extraction de l'*Atriplex halimus* L, ne pourraient pas avoir un effet antibactérienne ; À l'avenir, d'autres extraits de cette plante étudiée pourraient être exploités en combinaison avec divers types de microbes, qui pourraient démontrer les résultats souhaités de manière positive.

Comme le montre le **tableau 7**, il n'y a aucune zone d'inhibition autour les puits qui contiennent l'extrait sauf le contrôle positif

Cela signifie que toutes les bactéries testées ne sont pas sensibles aux deux extraits testées par conséquent ces extraits n'ont aucun effet et activité antibactérien contre les bactéries.

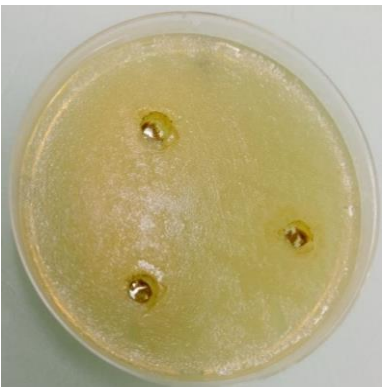
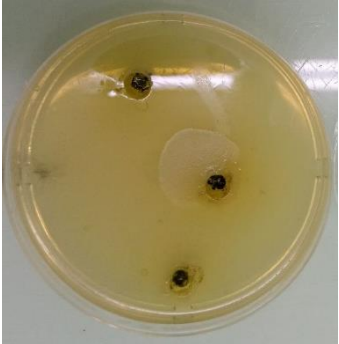
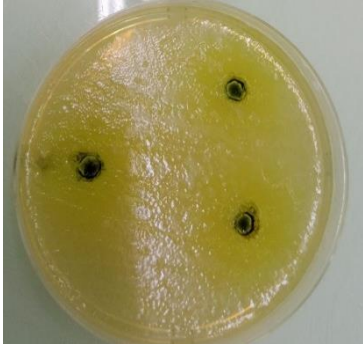
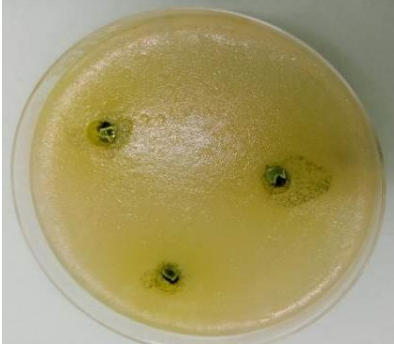
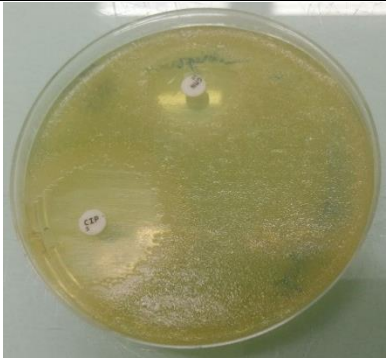
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Dmso			
EH			
EM			
GM + CIP + AM			

Tableau 7: Résultats de l'activité antibactérienne des extraits d'*Atriples halimus*.

EHE=Extrait hexanique

EME= Extrait méthanolique

EAC = extrait acétonique.

GM= Gentamicin (antibiotique utilisé pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes et utilisé ici comme contrôle positif pour la comparaison).

AM=amoxicillin (antibiotique utilisé pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes et utilisé ici comme contrôle positif pour la comparaison).

CIP= ciprofloxacine (antibiotique utilisé pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes et utilisé ici comme contrôle positif pour la comparaison).

(+) = Présence de la zone

(-)=Absence de la Zone

(a ≈) =Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition.

Tableau 8 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits de la plante sur mes souches bactériennes

concentration	Diamètre d'inhibition (mm) des souches bactérienne								
	Escherichia coli			Staphylococcus aureus			pseudomonas aeruginosa aureus		
	EHE	EME	EAC	EHE	EME	EAC	EHE	EME	EAC
Extrait brute	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait brute dilue 1 fois	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait brute dilue 2 fois	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Il est difficile de comparer les résultats ou les résultats avec la bibliographie car il y a une variété de résultats d'autres travaux similaires, certains d'entre eux ont trouvé des résultats qui concordent avec nos résultats, comme le travail de (A.Elbashit et al., 2011). Autres ont découvert des résultats différents, comme l'étude de (Chaouche et al., 2021). Il semble que les méthodes d'extraction utilisées jouent un rôle important dans cela (Markham, K.R. 1982). Les caractéristiques génétiques de la espèce ont également été étudiées (Bruneton, J. 1999), l'origine géographique (Narayana, K.R et al., 2001), ainsi que les conditions de harvest du matériau végétal (Lin, J.K., Weng, M.S. 2006). Selon Ounaissia et al. (2020), les caractéristiques des extraits dépendent du type de solvant utilisé pour l'extraction et de l'espèce.

CONCLUSION

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherches du laboratoire de biochimie et de microbiologie de l'Université de M'sila dont l'objectif principal est d'étudier le dosage des composés phénoliques, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne de trois extraits issus d'une plante Algérienne ; *Atriplex halimus*.

Les extractions des différents composés de cette plante par succession de trois systèmes des solvants de polarité croissante, nous a permis de déterminer le rendement d'extraction de chaque extrait. Le résultat obtenu montre que l'extrait méthanolique a présenté le rendement le plus élevé (22,4%), suivi de l'extrait acétonique tandis que l'extrait hexanique a montré le rendement le plus faible.

L'évaluation du contenu des phénols totaux révèle la présence des quantités intéressantes en polyphénols. La teneur la plus élevée est constatée dans l'extrait acétonique ($2,303 \pm 0.230$ mg EAG/g MS). La quantification des flavonoïdes montre que l'extrait acétonique possède la meilleur teneur ($0,319 \pm 0.001$ mg EQ/100g MS). De même, le dosage des tannins nous a mené à conclure que cette plante est riche en tannins.

L'activité antioxydante mesurée par test au radical DPPH[•], nous a permis de constater que tous les extraits de la plante étudiée ont une activité antioxydante importante. L'extrait acétonique présente une activité très intéressante ($EC_{50} = 0,039 \pm 0,001$ mg/ml) par rapport aux autres extraits. Ce dernier montre une activité antioxydante supérieure à celui du contrôle positif (BHT et vitamine C). En revanche, les extraits (hexanique, et méthanolique) ont montré une activité antioxydante remarquable, mais cette activité est faible à celles de la vitamine C et le BHT.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur milieu solide, Les résultats indiquent que les trois extraits n'ont pas une activité antibactérienne sur les souches testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que les extraits de *Atriplex halimus* ont une bonne activité antioxydante en particulier l'extrait antioxydant qui s'est avéré le plus actif. Son effet antioxydant semble être lié à sa richesse en composés phénoliques.

Néanmoins, Plusieurs études ont montré que ces familles de substances naturelles sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique, comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire. Alors que les extraits d'*Atriplex halimus* approuvés dans cette étude ne contenaient pas d'activité antimicrobienne.

Toutefois, d'autres études plus poussées, plus larges, plus approfondies et plus accomplies seront nécessaires pour préciser la nature chimique et le mécanisme d'action du principe actif présent dans l'extrait acétonique de la plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Abbad, A., Benchaabene, A., Cherkaoui, M., Wahid, N et Elhadram, A .** (2004) : (b) Variabilité phénotypique et génétique de trois populations naturelles d'*Atriplex halimus*. Présenté par S.DECAMPH. Département de biologie, faculté des sciences Semlalia , Univ.Cadi-Ayyad. Marrakech , Maroc.
2. **Aduane, S.** (2015) : Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Université Mohamed Khider – Biskra.
3. **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A.** (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.
4. **Aharonson, Z., Shani, (Mishkinsy), J., Sulman, F.G.** (1969): Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a feeding source of the Sand Rat (*Psammomysobesus*), *Diabetologia*. 5. p379-383.
5. **Belakhdar, D.** (2006) : Plantes médicinales au Maghreb et soins de base précis de phytothérapie. Ed. Le fennec. Maroc. p 386.
6. **Bencheikh, D., Gueddah, A., Soualat, K., Ben-aissi, H., Benslama, A., Harrar, A., & Khenouf, S.** (2021). Polyphenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* L. and *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Applied Biological Sciences*, 15(1), 53-63.
7. **Benhammou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T.K.** (2009): Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*, *Comptes Rendus Chimie*. 12. p1259-1266.
8. **Bensaadi H., Guemmouda S.** (2017). Etude de l'activité antioxydante, Et antibactérienne d'extrait de *Suaeda fruticosa* Mémoire master académique.
9. **Bensafiddine F.** (2019). Etude de l'effet antioxydant et antiinflammatoire des extraits de plantes locales. Thèse de doctorat en sciences, Université d' Amar Telidji Laghouat.
10. **Berger, M. M.** (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(1), 48-53.
11. **Bondet V., Brand-Williams W., and Berset C.** Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*, 1997, 30 (6), P 609– 615.
12. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran R., and Igic I.** Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 2008, p 925-929.
13. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*, 1995, 28 (1), p 25-30.
14. **Camille, D.** (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier.
15. **Chadefaud, M., Emberger, L.** (1960) : Traité de botanique : systématique, les végétaux vasculaire. Tome II. Ed. Masson & Cie. Paris. p1540.
16. **Chikhi, I., Allali, H., Dib, M.A., Medjdoub, H., Tabti, B.** (2014) : Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L.(*Chenopodiaceae*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4. 181-184.
17. **D.Villaño, M.S.Fernández-Pachón, M.L.Moyá, A.M.Troncoso M.C.García-Parrilla.** (2007). "Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*," p. 71.
18. **Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B.** (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology*, 34, 975-991.
19. **Djeridane A., Hamdi A., Bensania W., Cheifa K., Lakhdari I., Yousfi M.** The in vitro evaluation of antioxidative activity, a-glucosidase and a-amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews*, 2015, 9, p 324–331.

20. **Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., and Stocker P.** (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.
21. **Emam, S.S.** (2011) : Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products*. 4. p 25-41.
22. **Goudable, J., & Favier, A.** (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
23. **Hadjadj, S., Bayoussef, Z., Ould El Hadj-Khelil, A., Beggat, H., Bouhafs, Z., Boukaka, Y., Khaldi, I., Mimouni, S., Sayah, F., Tey, M.** (2015) : Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in the Northeastern Sahara of Algeria (area of Ouargla). *Journal of Medicinal Plants Research*. 8. 1049-1059.
24. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.** (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10).
25. **Huang D., Ou B and Prior R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
26. **Jian T., Qinxue H., Jing Y., Rurun L., Xiuyi L., Chengping L., Chaoyin C., Ling., Robin S., and Kunlong B.** In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Research*, 2007, 75 (3), p 227-233
27. **Kahlouche-Riachi, F.** (2014). évaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie.
28. **Khacheba I., Djeridane A., Kameli A., and Yousfi M.** The Inhibitory Effect of Some Algerian Plants Phenolics Extracts on the α - glucosidase and α - amylase Activities and their Antioxidant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, 2014, 10, p 59-68
29. **KHADIDJA, D., ZOUINA, D., SALIHA, D., ANIS, B., ABD RAOUF, M. A. A. D. A. D. I., & SEDDIK, K.** (2021). A Contribution to the Valorization of Two Medicinal Plants: *Atriplex Halimus* Sub. Sp. *Schweinfurthii* and *Bunium Incrassatum*, Growing in the Region of M'sila (North-East Algeria).
30. **Marcel, J. P.** (2005). L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques*, 7(1), 53-58.
31. **Mertz, W., Rosinski, E.E., Gordon, W.A., Harrison, W.W., Shani, J., Sulman, F.G.,** (2011): *In vitro* potentiating of insulin by ash from Saltbush (*Atriplex halimus*). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1. p121-182.
32. **Nedjimi, B., Guit, B., Toumi, M., Beladel, B., Akam, A., Daoud, Y.** (2013) : *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* (*Chenopodiaceae*) : Description, écologie et utilisations pastorales et thérapeutiques.
33. **Ouattara, L. H., Kabran, G. R. M., Guessennd, N. K., Konan, K. F., Mamyrbekova-Bekro, J. A., & BEKRO, Y. A.** (2017). Activités antibactériennes in vitro des extraits d'écorces de racines de *Mezoneuron benthamianum* et de tiges de *Paullinia pinnata*: 2 plantes de la pharmacopée Ivoirienne. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 18, 31-40.
34. **Ounaissia, K., Bennadja, S., Aliane, L., Djahoudi, A.** 2020. Phytochemical screening and anti-bacterial activity of methanolic extracts of the aerial parts of *Atriplex halimus* L. from Biskra (Algeria) *IJANS*. 13(1): 26-33
35. **Ozenda, P.** (2004) : Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition. CNRS Editions, Paris.
36. **Popovici, C., Saykova, I. and Tylkowsk, B.** (2009). "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*," pp. 4. 25-39.
37. **Rebbas, K., & Bounar, R.** (2014). Études floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la région de M'Sila (Algérie). *Phytothérapie*, 12(5), 284-291.
38. **Sanchez-Moreno C.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, 8, p 121-137.
39. **Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., ... & Diop, Y. M.** (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263-1269.

40. Singleton V.L., Orthofer R., & Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt A*, 299, 152-178.
41. Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.

ANNEXES

Annexes

Composition du milieu Mueller-Hinton :

Extrait de viande de bœuf : 2.0g.

Peptone de caséine : 17.5g.

Amidon de maïs : 1.5g.

Agar : 17.0g.

pH : 7.4.

Composition du milieu gélose nutritive :

Extrait de viande : 1,0 g/L

Extrait de levure : 2,5 g/L

Peptone : 5,0 g/L

Chlorure de sodium : 5,0 g/L

Agar-agar : 15,0 g/L

pH = 7,0