

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE : DES SCIENCES.
DEPARTEMENT : MICROBIOLOGIE
ET BIOCHIMIE

N° :



DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE
ET DE LA VIE
FILIERE : BIOLOGIE
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par :

DIFALLAH Safia & DJELLAL Amel

Intitulé

**Etude *in vitro* de l'activité anti-lithiasique de
l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*Atriplex
Halimus***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. BELABBAS H.	Université de M'sila	Président
Dr. BENKHALED A.	Université de M'sila	Rapporteur
Mr. KHERBACHE A.	Université de M'sila	Examineur

Année universitaire : 2018 /2019

Remerciements

Avant tout, Nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la sante, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et nos remerciements au Dr. Benkhaled A. Pour avoir accepté la charge d'être promoteur de ce mémoire. Nous le remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'il avait consentis durant la rédaction de ce mémoire, ainsi pour son soutien moral et scientifique qui nous permis de mener à bien ce travail.

Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail :

Dr. Belabbes H. d'avoir présidé ce jury

Mr. Kherbache A. d'avoir examiné ce travail

Nos sincères remerciements vont également à Dr. Cherif K., M^{me}. Bouasiz S. et tous l'ensemble des enseignants du département de Microbiologie et de Biochimie, tous les techniciens de laboratoire du département sans oublier Mr Seghiri K, le responsable des laboratoires et tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu le tout puissant qui m'a éclairé les chemins du
savoir,*

*J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à
Mes très chers parents, avec tout mon amour, ma tendresse et mon
estime. Je n'arriverai jamais à leurs rendre ce qu'ils ont fait pour moi.*

Que Dieu vous protège.

A mes sœurs, pour leurs amours et soutien.

A toute ma famille « DJELAL ».

A mon encadreur Dr. Benkhaled A. qui a dirigé de près ce travail.

*Je remercie beaucoup pour son aide précieux et son soutien
inestimable dans la réalisation de ce mémoire.*

*A tous mes enseignants du département de Microbiologie et
Biochimie et plus particulièrement M^{me} Bouasiz S. et Dr. Cherif K.*

Sans oublier les Doctorants Baali F. et Chaabani S.

A toutes mes amies pour leurs encouragements.

En fin je dédie ce mémoire à tous mes collègues de la promotion

Biochimie Appliquée 2019

Amel

Dédicaces

Je dédie ce travail à

A mes parents

Aucune dédicace ne serait exprimer ma profonde reconnaissance pour tous les sacrifices que vous m'avez généreusement consentis, et les efforts que vous avez fourni pour mon éducation et mon institution

Je vous dois tout et je ne vous en remercierais jamais assez

Que ce modeste travail soit pour vous le gage de ma reconnaissance et de mon affection

Que Dieu vous prête santé et longue vie

A mes sœurs et mes frères

Pour votre soutien moral et encouragements

A mon encadreur Dr. Benkhaled A.

D'avoir conduire dans ce travail

A Baali F.

D'avoir aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire

A toutes les membres de la famille « DIFALLAH et SALMI »

A toutes mes amies

A tous mes maîtres et enseignants de l'école à l'université.

Safia

Résumé

Vu la large propagation des maladies lithiasiques en Algérie, nous sommes intéressés à l'étude de l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux (Ex aq) d'*Atriplex halimus* récoltée de la région de maarif (M'sila) sur la lithiase oxalo-calcique. L'extraction a donné un rendement en Ex aq de 20.77% ms et les tests phytochimiques ont montré la présence de plusieurs familles chimiques comme les saponosides, les tannins, les polyphénols et les flavonoïdes. La teneur de l'Ex aq en polyphénols et flavonoïde est de $17.92 \pm 0.165 \mu\text{g}$ EAG/ mg Ex et $5.39 \pm 0.124 \mu\text{g}$ EQ/ mg Ex respectivement. L'évaluation du pouvoir antilithiasique a révélé la grande efficacité d'Ex aq d'*A. Hlimus* dans l'inhibition de cristallisation l'oxalate de calcium qui est de l'ordre 85.99% pour une concentration d'extrait de 0.5 mg/ml. Cette efficacité a été confirmée par la méthode microscopie.

Mot clé : Extraits aqueux, maladies lithiasiques, *Atriplex halimus*, pouvoir antilithiasique.

Summary

Given the wide spread of lithiasis diseases in Algeria, we are interested in studying the inhibitory effect of the aqueous extract (Ex aq) of *Atriplex halimus* harvested from the Maarif region (M'sila) on the oxalocalcium lithiasis. The extraction gave an Ex aq t yield of 20.77% dm and phytochemical tests showed the presence of several chemical families such as saponosides, tannins, polyphenols and flavonoids. The content of polyphenols in Ex aq is $17.92 \pm 0.165 \mu\text{g}$ EAG/ mg Ex and $5.39 \pm 0.124 \mu\text{g}$ EQ/ mg Ex respectively. The evaluation of the antilithiasis power revealed the great efficacy of Ex aq of *A. Hlimus* in inhibiting the crystallization of calcium oxalate which is of the order of 85.99% for an extract concentration of 0.5 mg/ml. This efficacy has been confirmed by the microscopy method.

Key words: Aqueous extracts, lithiasis diseases, *Atriplex halimus*, antilithiasic power.

ملخص

نظرا للانتشار الواسع لأمراض الحصى الكلوي بالجزائر، ارتأينا دراسة الأفعال التثبيطية للمستخلص المائي لنبتة الرغل الملحي (القطف) المجمعة من منطقة المعاريف (المسيلة) على هذه الحصى من نوع أوكسالو كالسيك. عملية استخلاص كل مكونات هذه النبتة أعطت مردود بقيمة 20.77 % و الفحوصات الكيميائية النباتية أظهرت وجود العديد من العائلات الكيميائية مثل الصابونوزيدات، تانين، عديدات الفينول و فلافونويدات. محتوى المستخلص المائي من عديدات الفينول و الفلافونويدات هو 17.92 ± 0.165 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك / ميلليغرام من المستخلص و 5.39 ± 0.124 ميكروغرام مكافئ الكاغستين / ميلليغرام من المستخلص على التوالي. تقييم القدرة التثبيطية كشف الكفاءة العالية للمستخلص المائي لنبتة الرغل الملحي في تثبيط تبلور أكسالات الكالسيوم وكانت النتيجة 85.99 % بحيث كان تركيز المستخلص 0.5 مغ / مل. تم تأكيد هذه الفعالية من خلال طريقة الفحص المجهرى.

الكلمات المفتاح: المستخلص المائي ، أمراض الحصى الكلوي ، الرغل الملحي ، تثبيط التبلور.

Listes des figures

Figure 01 : Arbuste d' <i>Atriplex halimus</i>	02
Figure 02 : Carte montrant la répartition des <i>A.halimus</i> dans le bassin méditerranée	03
Figure 03a: Whewellite	05
Figure 03b: Weddellite	05
Figure 03c: Calcul phosphocalcique intra tubulaire	05
Figure 04 : Calculs d'acide urique	06
Figure 05 : Struvite	06
Figure 06 : Calcul de cystine	07
Figure 07a: Calcul de métabolites du triamterène	07
Figure 07b: Calcul d'amoxiciline	07
Figure 07c: Cristaux d'amoxiciline	07
Figure 08 : Principales étapes de la lithogénèse	09
Figure 09 : La procédure de préparation de l'urine synthétique	16
Figure 10 : Teneur en eau (%) de la partie aérienne d' <i>A. Halimus</i>	18
Figure 11 : Comparaison des teneurs en flavonoïdes et polyphénols totaux de l'Ex aq	21
Figure 12 : Allure générale des courbes turbidimétriques	22
Figure 13 : Evolution de la cristallisation oxalo-calcique en absence d'inhibiteur	24
Figure 14 : Cinétique de l'effet de l'acide citrique sur la cristallisation oxalo-calcique	24
Figure 15 : Cinétique de l'effet de l'extrait aqueux sur la cristallisation oxalo-calcique	25
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de l'acide citrique et l'extrait d' <i>A.Halimus</i>	26

Liste des tableaux

Tableau 01: Résultats des tests phytochimiques sur l' <i>A. halimus</i>	19
Tableau 02: la cristallisation oxalo-calcique sans inhibiteur	23
Tableau 03: Paramètres turbidimétrique de la cristallisation oxalo-calcique en présence de l'extrait aqueux et de l'acide citrique	26
Tableau 04: Evolution du taux d'agrégation et du pourcentage d'inhibition.	27
Tableau 05: Cristallisation d'oxalate de calcium en absence et en présence de l'inhibiteur (l'extrait).	28

Abréviations

ASP : Abdomen sans préparation

EAG : équivalent d'acide gallique

EQ : équivalent de quercétin

Ex aq : extrait aqueux

I% : pourcentage d'inhibition

MS : matière sèche

pH : potentiel d'hydrogène

TA : taux d'agrégation

tpm : tour par minute

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Abréviations	
Introduction	1

I. Revue bibliographique

I.1. <i>Atriplex halimus</i>	2
I.1.1. Généralités	2
I.1.2. Description botanique	2
I.1.3. Distribution	2
I.1.4. Classification botanique	3
I.1.5. Noms vernaculaires	3
I.1.6. Composition chimique	4
I.1.7. Utilisations en médecine traditionnelle à développer et en pharmacologie moderne	4
I.2. La Lithiase	4
I.2.1. Définition de la lithiase urinaire	4
I.2.2. Epidémiologie de la lithiase dans le monde	4
I.2.3. Types de lithiases urinaires	5
I.2.3.1. Lithiases calciques	5
I.2.3.2. Acide urique	6
I.2.3.3. Calculs de struvite (phosphate ammoniaco-magnésienne)	6
I.2.3.4. Calcul de cystine	6
I.2.3.5. Lithiase médicamenteuse	7
I.2.4. Facteurs de risques lithogènes généraux	7
I.2.5. Symptômes des lithiases urinaires	8
I.2.6. Les étapes de la lithogénèse	8
I.2.7. Rôle du pH	10
I.2.8. Promoteurs et inhibiteurs de la lithogénèse	10
I.2.9. Traitements	11

II. Matériels et Méthodes

II.1. Récolte et séchage du matériel végétal.....	12
II.2. Taux d'humidité	12
II.3. Préparation de l'extrait aqueux de <i>l'A. halimus</i>	12
II.4. Les tests phytochimique (screening phytochimique)	13
II.5. Dosage des polyphénols totaux	14
II.6. Dosage des flavonoïdes totaux	15
II.7. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique	15
II.7.1. Model expérimental d'étude de la cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium par la méthode turbidimétrique	15
II.7.2. Suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium par microscope	16
II.8. Etude statistique.....	17

III. Résultats et Discussion

III.1. Etude phytochimique.....	18
III.1.1. Test d'humidité et séchage	18
III.1.2. Extraction.....	18
III.1.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique)	19
III.1.4. Dosage des polyphénols totaux.....	20
III.1.5. Dosage des flavonoïdes totaux	21
III.2. Pouvoir anti-lithiasique.....	22
III.2.1. Suivi de la cinétique de cristallisation oxalo-calcique par la méthode turbidimétrique.....	22
III.2.2. Suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium di-hydraté par microscopie....	26
Conclusion	30

Référence bibliographique

Annexes

Introduction

Introduction

La lithiase urinaire (LU) est une maladie fréquente qui touche près de 10 % de la population dans les pays industrialisés. Les études épidémiologiques européennes, américaines et asiatiques montrent que la prévalence de la LU a progressivement augmenté au cours des 50 dernières années, notamment en raison des modifications alimentaires davantage tournées vers un régime salé et carné (Castiglione *et al.*, 2014).

En Algérie, de plus en plus de personnes ont recours à la médecine traditionnelle dans le traitement de cette maladie car d'une part, le coût des médicaments conventionnels est relativement élevé et d'autre part, ces derniers peuvent avoir un effet limité. A titre d'exemple, les diurétiques, les anti-inflammatoires et les inhibiteurs de certains métabolites sont les seuls médicaments utilisés dans le traitement de la lithiase oxalo-calcique, avec des effets secondaires inévitables (Khitri *et al.*, 2016).

Plusieurs plantes ont fait l'objet de recherches scientifiques, en Algérie et à travers le monde, pour évaluer l'activité antilithiasique dans un système *in vivo* et *in vitro*. Vu à la propagation des maladies lithiasiques en Algérie (M'sila en particulier) et la richesse de la région du Hodna en plantes sahariennes médicinales, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir inhibiteur de l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante d'*Atriplex halimus* sur la formation de lithiase urinaire type oxalo-calcique par méthode turbidimétrique et par suivi cinétique de la cristallisation oxalocalcique par microscopie.

Revue Bibliographique

I. Revue Bibliographique

I.1. *Atriplex halimus*

I.1.1. Généralités

Atriplex sont des plantes arbustives vivaces appartenant à la famille des Chenopodiaceae. Ces arbustes sont considérés comme des fourrages. *Atriplex* comprend environ 417 espèces, dont 48 dans le bassin méditerranéen (Houérou, 1992). La capacité d'*Atriplex halimus* à se développer dans des conditions environnementales difficiles a contribué à son utilisation traditionnelle comme source d'émissions de fourrage et de broutage pour le bétail dans ces régions (Walker *et al.*, 2014).

I.1.2. Description botanique

Atriplex halimus (figure 1) est une plante ramifiée à partir de la base, l'écorce est de couleur gris-blanc (Walker *et al.*, 2014), arbrisseau de 50-200 cm, à tiges érigées-dressées, ligneuses (Quezel et Santa, 1962). Ses Feuilles mesurent 10 à 30 mm de long et 5 à 20 mm de large. Elles sont de forme très variable (Walker *et al.*, 2014), oblongues ou ovales-obtuses. Valves fructifères coriaces, arrondies-rénifonnes, lisses. Plante polymorphe des rocailles, talus argileux, zones d'épandage plus ou moins salées (Quezel et Santa, 1962).



Fig.1 Arbuste d'*Atriplex halimus*.

I.1.3. Distribution

Très commun dans le secteur du sahara septentrional, secteur du sahara occidental, secteur du sahara central et les montagnes du sahara central et dans les sols un peu salés (Quezel et Santa, 1962).

A.halimus est une espèce xéro-halophyte largement répartie (figure 2) dans les zones non salines et salines, dans les régions subhumides à arides d'Europe du Sud, de Méditerranée orientale à Afrique du Nord, y compris le sahara en Algérien (Chikhi *et al.*, 2014).

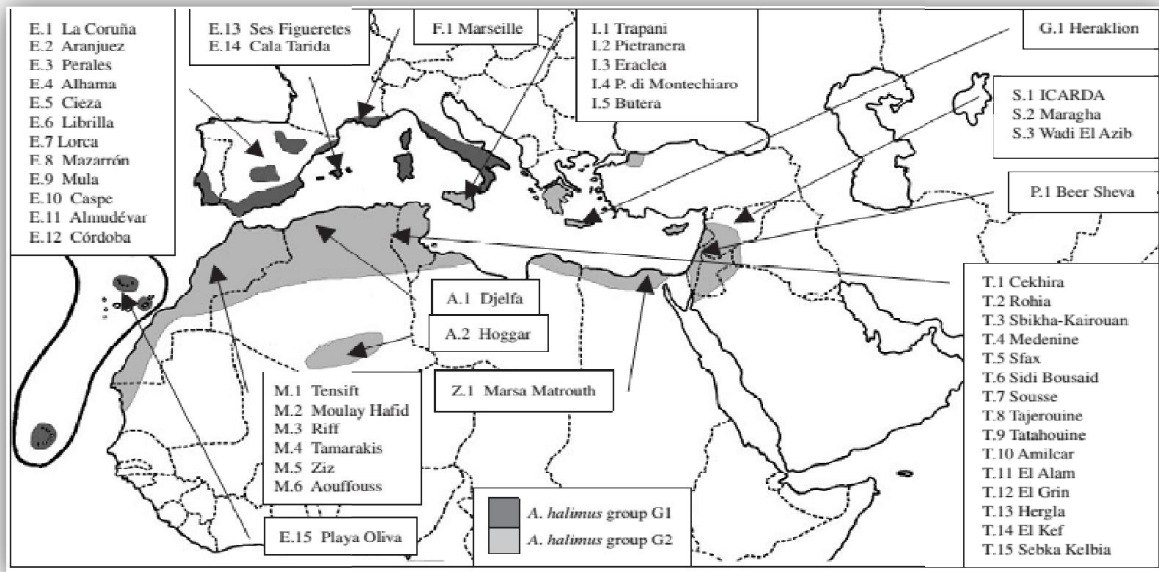


Fig. 2 Carte montrant la répartition des *A. halimus* dans le bassin méditerranéen (Ortiz-dorda *et al.*, 2005).

I.1.4. Classification botanique

D'après Quezel et Santa (1962), la classification de l'espèce *A. halimus* dans le règne végétal est la suivante :

Règne: Végétal.

Embranchement: Spermaphyte ou Magnoliopyta.

Sous-embranchement: Angiospermes.

Classe: Dicotylédones ou Magnoliopsida.

Sous classe: Caryophyllidae. Apétale.

Ordre: Caryophyllales.

Famille: Chénopodiacées.

Genre: *Atriplex*.

Espèce: *Atriplex halimus*.

I.1.5. Noms vernaculaires

Atriplex halimus L.

Nom français: Arroche sauvage, Pourpier de mer;

Nom Arabe: Guettaf, الرغل الملحي (Ghourri *et al.*, 2013)

I.1.6. Composition chimique

A. halimus est une source de vitamines A, C et D. Elle contient des tanins, des flavonoïdes, saponines, alcaloïdes et résines. En plus, *A. halimus* renferme jusqu'à 10% de chlorure de sodium (Chikhi, 2014).

I.1.7. Utilisations en médecine traditionnel à développer et en pharmacologie moderne

De nombreux auteurs ont signalé les utilisations médicinales des halophytes tout en décrivant l'importance économique de les plantes (Nedjimi *et al.*, 2012).

Les phytothérapeutes d'Arabe indigène utilisent les feuilles pour traiter les maladies cardiaques, le diabète (décoction) et le rhumatisme (Walker *et al.*, 2014).

A. halimus est également utilisée pour soigner les inflammations des voies urinaires (cystites) et les lithiases urinaires (Belouad, 2001; Emam, 2011). En effet les feuilles d'*A. halimus* sont utilisées, en décoction, contre les calculs rénaux à raison de 250 g de feuilles par litre d'eau (Ghourri *et al.*, 2013). Grâce à leurs propriétés anti oxydantes, certains flavonoïdes ont un effet protecteur des tissus du foie contre le cancer (Emam, 2011).

I.2. La Lithiase

I.2.1. Définition de la lithiase urinaire

Urolithiase (du grec *ouiron*, "urine" et *lithos*, "pierre") (Rajeshwari *et al.*, 2013), également appelée "pierres aux reins" (Dalibon, 2015), est une concrétion constituée par un agglomérat, ordonné ou non, de particules cristallines ou amorphes, précipitées dans les urines (Daudon et Doré, 1999), se développant dans le bassinet et/ou les calices d'un rein et provoquant une obstruction partielle ou totale à l'écoulement normal de l'urine (Battu, 2016).

I.2.2. Epidémiologie de la lithiase dans le monde

Jusqu'à la fin du XIX siècle, la lithiase urinaire (LU) était essentiellement vésicale, constituée de purines et de phosphate de calcium et touchait principalement les jeunes garçons (Traxer, 2007). Les calculs urinaires sont fréquents dans les pays industrialisés et affectent 5 à 10% des adultes avec une incidence annuelle de 0.1 à 0.3 % (Traxer *et al.*, 2008). Aujourd'hui, la lithiase est de siège rénal, oxalo-calcique dans près de 80 % des cas et concerne environ 2 hommes pour 1 femme entre 20 et 60 ans (Traxer, 2007). Les études

épidémiologiques européennes, américaines et asiatiques montrent que la prévalence de la LU a progressivement augmenté au cours des 50 dernières années, notamment en raison des modifications alimentaires davantage tournées vers un régime salé et carné (Castiglione *et al.*, 2014).

I.2.3. Types de lithiases urinaires

Plusieurs types de calculs existent qui diffèrent par leur composition chimique. Les calculs calciques représentent la majorité des pathologies lithiasiques et englobent notamment les calculs à base d'oxalate de calcium (75 %) et de phosphate de calcium. Les calculs d'acide urique sont communs alors que les calculs de phosphate ammoniacomagnésien (struvite) sont moins fréquents. Les calculs de cystine sont plus rares (Battu, 2016).

I.2.3.1. Lithiases calciques

Environ 75 à 80 % de tous les calculs rénaux contiennent du calcium. La plupart sont composés d'oxalate de calcium, seul ou en combinaison avec du phosphate de calcium.

Les calculs d'oxalate de calcium (figure 3a et 3b) sont bruns ou gris, petits, et bien circonscrits sur les radiographies. Les cristaux d'oxalate de calcium peuvent apparaître comme des haltères ou des pyramides. Il existe deux types de calculs oxalate de calcium:

- Les calculs d'oxalate de calcium mono-hydratés (whewellite).
- Les calculs d'oxalate de calcium di-hydratés (weddelite) sont moins radio opaques, plus friables, de couleur jaune et spiculés (Traxer, 2007).

Les calculs de phosphate de calcium (Figure 3c) sont de couleur beige ou blanche et forment des cristaux d'apatite et de brushite (Cynthia *et al.*, 2011).



Fig. 3a Whewellite (Fazil Marickar *et al.*, 2009).



Fig. 3b Weddellite (Fazil Marickar *et al.*, 2009).



Fig. 3c Calcul phosphocalcique intra tubulaire (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.3.2. Acide urique

Les calculs d'acide urique (figure 4) comptent pour 5 à 10 % des lithiases, mais dans les pays méditerranéens, ils interviendraient dans près de 30 % des cas. De couleur jaune ou orange (Cynthia *et al.*, 2011). L'acide urique est le produit du métabolisme des bases puriques dont la solubilité urinaire dépend du pH. Lorsque le pH urinaire est acide (5-6) on note la cristallisation de l'acide urique (Traxer, 2007).



Fig. 4 Calculs d'acide urique (Dominique, 2014).

I.2.3.3. Calculs de struvite (phosphate ammoniaco-magnésienne)

Dans la lithiase phospho-ammoniac-magnésienne, les calculs se forment au cours d'infections urinaires à germe uréasique en pH alcalin (Dalibon, 2015). Les calculs de struvite (figure 5) représente 10 à 15 % de tous les calculs, causes principales des calculs coralliformes, sont plus fréquentes chez les femmes. Leur coloration est brun clair (Cynthia *et al.*, 2011).



Fig. 5 Struvite (Sekkoume, 2011).

I.2.3.4. Calcul de cystine

La lithiase cystinique résulte d'une anomalie héréditaire du transport transépithélial rénal et intestinal de la cystine et des acides aminés dibasiques. L'excrétion urinaire excessive de cystine, le moins soluble de tous les acides aminés, entraîne la formation répétée de calculs de cystine (figure 6). La lithiase cystinique représente environ 1% des lithiases (Jungers *et al.*, 2001).



Fig. 6 Calcul de cystine (Cochat *et al.*, 2012).

I.2.3.5. Lithiase médicamenteuse

Les lithiases médicamenteuses représentent 1 à 2% des lithiases rénales. Elles peuvent être divisées en deux catégories: d'une part, celles qui résultent de la cristallisation urinaire d'un médicament ou d'un métabolite peu soluble dont l'excrétion urinaire est importante et, d'autre part, celles liées aux effets métaboliques des médicaments (Servais *et al.*, 2006). C'est le cas du triamtèrene (Teriam) (figure 7a), de l'allopurinol (Zyloric), des sulfamides (Bactrim), de l'amoxicilline (Clamoxyl) (Figure 7b et 7c), de l'indinavir (Crixivan) dans les trithérapies pour HIV (Traxer, 2007).



Fig. 7a Calcul de métabolites du triamtèrene (Servais *et al.*, 2006).



Fig. 7b Calcul d'amoxicilline (Servais *et al.*, 2006).



Fig. 7c cristaux d'amoxicilline (Servais *et al.*, 2006).

I.2.4. Facteurs de risques lithogènes généraux

Plusieurs facteurs de risque lithogènes ont été identifiés:

- **Influence du sexe:** Il est connu depuis longtemps que l'homme est plus exposé que la femme au risque de lithiase de l'appareil urinaire (Daudon et Doré, 1999).
- **Influence de l'âge:** Le risque de développer un type donné de calcul n'est pas le même à tout âge. La composition des calculs évolue également en fonction de l'âge (Daudon et Doré, 1999), il est 20 à 40 fois plus fréquent chez l'adulte que chez l'enfant (Cochat *et al.*, 2012).
- **Les facteurs ethniques:** antécédents familiaux dans 40 % des cas;
- **L'alimentation:** apports alimentaires accrus en produits laitiers, protéines animales, sel, aliments riches en oxalate, purines (abats, charcuterie...) ou sucres

rapides (fructose notamment), consommation faible en fibres alimentaires (Dalibon, 2015).

- **Les facteurs climatique:** Les facteurs climatiques et saisonniers interviennent dans l'épidémiologie de la lithiase par déshydratation et donc par l'augmentation des concentrations urinaires dans les régions les plus chaudes (Fekak *et al.*, 2006).
- **Infection urinaire à germes uréase-positifs:** cette enzyme, en dégradant l'urée, induit la formation d'une matrice protéique sur laquelle les sels minéraux précipitent pour former des calculs phospho-ammoniac-magnésien;
- **Anomalies du pH urinaire:** anomalies anatomiques favorisant la stase urinaire, donc la formation des calculs;
- **Iatrogénie médicamenteuse dans 1 % des cas** (Dalibon, 2015).

I.2.5. Symptômes des lithiases urinaires

Dans la plupart des cas, un calcul urinaire est totalement asymptomatique, découvert de façon fortuite sur un ASP ou une échographie demandés pour un autre motif. Les manifestations cliniques sont multiples, indépendantes de sa nature physico-chimique (Traxer, 2007).

Il peut se révéler par un syndrome douloureux, une hématurie, une infection urinaire avec risque de septicémie et de choc septique ou une insuffisance rénale aiguë ou chronique (Zoung-Kanyi et Sow, 1990).

I.2.6. Les étapes de la lithogénèse

Le terme de lithogénèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent au développement d'un calcul dans les voies urinaires. La lithogénèse comporte plusieurs phases qui s'expriment successivement ou simultanément (figure 8). Certaines étapes, qui concernent les premières étapes de la lithogénèse et que l'on peut désigner sous le terme de cristallogénèse (Daudon *et al.*, 2008).

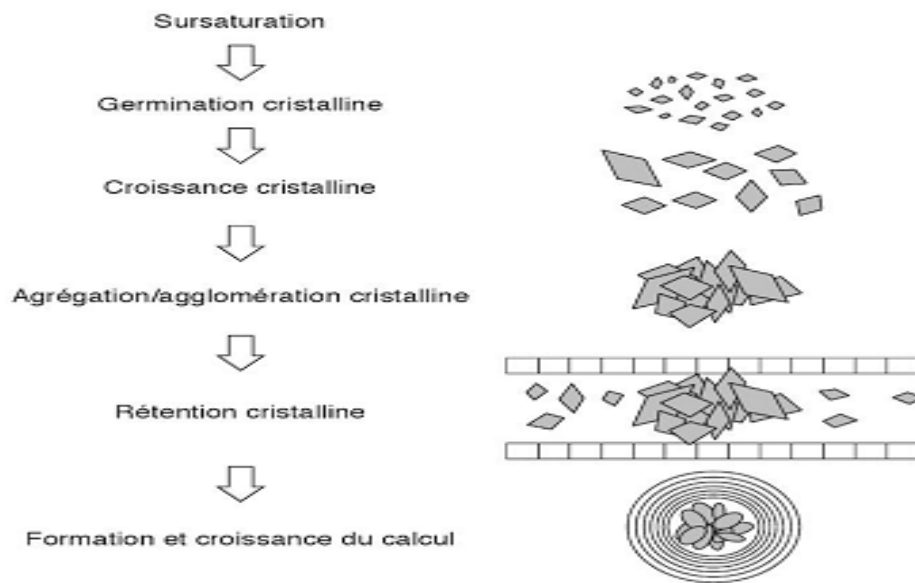


Fig. 8 Principales étapes de la lithogénèse (Daudon *et al.*, 2012).

I.2.6.1. La sursaturation des urines

La sursaturation urinaire est le moteur de la formation de cristaux dans les reins. Depuis la formation de particules cristallines doit évidemment à partir de la sursaturation, la sursaturation est sans aucun doute essentielle pour formation de pierre (Tsujihata, 2008).

I.1.6.2. La germination cristalline

Le niveau de sursaturation à partir du quel les cristaux se forment rapidement (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.6.3. La croissance des cristaux

Les cristaux engendrés par une sursaturation élevée des urines sont initialement très petits (< 100 nm) et ne constituent donc pas une menace de lithiase. Ils vont ensuite grossir plus ou moins rapidement par captation de nouvelles molécules de la substance sursaturée présentes dans l'urine et former des particules plus grosses, comprises, selon les espèces cristallines et la composition urinaire, entre 1 et $100\mu\text{m}$ (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.6.4. L'agrégation des cristaux

Contrairement à la croissance, l'agrégation cristalline, qui met en jeu des phénomènes d'attraction électrostatique en fonction de la charge superficielle des cristaux, est un processus rapide. Elle peut, de ce fait, engendrer des particules volumineuses dans un délai très court (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.6.5. L'agglomération cristalline

L'agglomération des cristaux implique des macromolécules urinaires qui, par leurs nombreuses charges négatives, peuvent se fixer à la surface des cristaux et favoriser secondairement la fixation de nouveaux cristaux sur les premiers en les organisant les uns par rapport aux autres, contribuant ainsi à l'architecture du calcul. Il s'agit d'un aspect fondamental des processus lithiasiques s'exprimant aussi bien au niveau des étapes initiales de la lithogénèse, qui aboutissent à la rétention de particules dans les voies urinaires (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.6.6. La rétention des particules cristallisées

Cette étape peut être considérée comme la première étape du processus lithogène proprement dit, à partir de laquelle des particules cristallines formées au cours des différentes phases de la cristallogénèse vont être retenues dans le rein ou les voies urinaires et vont croître pour former un calcul (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.6.7. La croissance du calcul

La vitesse de croissance du calcul initié par la rétention cristalline est ensuite très variable, dépendant du niveau de sursaturation des urines et donc de la nature des anomalies métaboliques présentes (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.7. Rôle du pH

L'importance du pH urinaire ne doit pas être négligée, car il conditionne souvent le risque lithiasique. Ainsi, lorsqu'il est inférieur à 5.3, cela favorise la cristallisation de l'acide urique, de la cystine, de la xanthine. Lorsqu'il est supérieur à 6.5, cela favorise la cristallisation du phosphate de calcium et du complexe phospho-ammoniac-magnésien (Cochat *et al.*, 2012).

I.2.8. Promoteurs et inhibiteurs de la lithogénèse

I.2.8.1. Promoteurs de la lithogénèse

Les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés promoteurs de la cristallisation. Ils s'associent très souvent par deux ou par trois pour former une substance cristallisable qui, elle-même, peut se présenter sous plusieurs espèces cristallines (Daudon *et al.*, 2008).

I.2.8.2. Inhibiteurs de la lithogenèse

Les inhibiteurs peuvent, selon leur nature, intervenir à toutes les étapes de la cristallogenèse. Ils sont présents aussi bien chez les sujets normaux que chez les patients lithiasiques, mais sont globalement moins efficaces chez ces derniers pour s'opposer à la formation des cristaux, soit parce que leur quantité est insuffisante par rapport à celle des promoteurs de la cristallisation, soit parce qu'ils présentent des modifications structurales qui altèrent leur efficacité (Jaggi *et al.*, 2007).

I.2.9. Traitements

Plusieurs traitements peuvent suivis selon les cas

- le traitement chirurgical vise à éradiquer tout calcul dans l'arbre urinaire. L'urologue prend en compte la localisation du calcul, sa taille, sa composition, l'anatomie des voies urinaires et la morphologie du patient (Dalibon, 2015);
- la base du traitement de toute lithiase est la dilution des solutés contenus dans l'urine grâce à l'augmentation de la diurèse, et donc de l'hydratation (Cochat *et al.*, 2012) ;
 - boissons abondantes, au moins deux litres par jour d'une eau pauvre en calcium ;
 - limitation de la ration calcique en cas d'apport important (2 à 3 produits laitiers/j);
 - limitation des apports en oxalates, en protéines animales et diminution de l'apport sodique;
 - régimes riches en fibres naturelles qui complexent le calcium dans le tube digestif (acide phytique) et limitent son absorption (Traxer, 2007).

Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1. Récolte et séchage du matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes d'*A. Halimus*. La récolte a été faite au début du mois de mars 2019, dans la région du Maarif (wilaya de M'Sila). Après la récolte, les parties aériennes débarrassées des débris (mauvaises herbes et poussières), sont étalées sur des supports perforés puis incubés dans une étuve à 60°C. Le séchage n'est arrêté que lorsque le poids devient stable. Elles sont broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre est conservée dans des boîtes hermétiquement fermées et à l'abri de l'humidité (Benkhaled, 2018).

II.2. Taux d'humidité

Les échantillons sont séchés jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids fixe. Trois échantillons de la partie aérienne fraîche de 1 g chacun sont placés dans une étuve ventilée à 104°C pendant 4 heures, ensuite les creusets sont retirés de l'étuve et placés dans un dessiccateur pour être pesés une fois refroidis. La teneur en eau des feuilles est déterminée comme suit:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = [(Mf - Ms) / Mf] \times 100$$

Mf: matière fraîche

Ms: matière sèche (Benkhaled, 2018)

II.3. Préparation de l'extrait aqueux de *A. halimus*

Une masse de 20g de la poudre obtenue est infusée dans 200 ml de l'eau distillée préalablement chauffée, laisser infusé pendant 2 heures sous agitation continue. Après refroidissement, le mélange est filtré sur une gaze et ensuite sur papier Wattman (3 mm) par filtration sous vide, les aliquotes du filtrat sont placées dans des boîtes de pétri puis séchées dans une étuve jusqu'à obtention d'un extrait sec à 60 °C. Le résidu sec obtenu est récupéré puis conservé à 4°C dans un flacon hermétiquement fermé (Benkhaled et Senator, 2015).

Le rendement exprime en pourcentage de matière sèche (% ms) est calculé comme suite :

$$R(\%) = (m / M) * 100$$

R%: rendement exprimé en % ms

m: masse de l'extrait sec

M: masse de la poudre végétale sèche

II.4. Les tests phytochimique (screening phytochimique)

II.4.1. Polyphénols

Quelques gouttes de perchlorure ferrique (FeCl_3) (10%) sont ajoutées à 2 ml d'extrait, la formation d'une précipité noir-vert intense fut le signe de la présence des polyphénols (rajeshwar et lalitha, 2013).

II.4.2. Flavonoïdes

Le test de l'hydroxyde de sodium pour les flavonoïdes: préparation de NaOH diluée on dissous 0.5g de NaOH dans 5ml d'eau. Préparation d'HCl diluée: on dissous 1ml d'HCl dans 2ml d'eau. 2ml de l'extrait + 0.5ml NaOH diluée suivie par l'addition de 0.5ml HCl diluée. Solution jaune avec le NaOH qui se décolore avec l'HCl diluée est une indication de la présence de flavonoïdes (Usman *et al.*, 2009).

II.4.3. Tannins

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins (EL-Haoud *et al.*, 2018).

II.4.4. Composés réducteurs

Leur détection consiste à introduire 1ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2ml de la liqueur de Fehling sont ajoutés. L'ensemble est porté au bain-marie bouillant durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (EL-Haoud *et al.*, 2018).

II.4.5. Saponosides

Dans un tube à essai on dissout quelques mg d'extrait dans l'eau distillée et on agite vigoureusement pendant au moins 5 minutes. L'apparition d'une colonne de mousse d'environ 1cm et persistant au moins 15 minutes indique la présence de saponosides (rajeshwar et lalitha, 2013).

II.4.6. Quinones

Quelques de NaOH (10%) sont ajoutées à 1ml d'extrait, l'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge orangé ou violet indique la présence des quinones libre (Oloyed, 2005).

II.4.7. Coumarines

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 0,5 ml de NH_4OH (25%). Mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines (Harbone, 1998).

II.4.8. Alcaloïdes

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de Dragendorff (réactif de l'iodobismuthate) de Bouchardat (réactif iodoioduré) et de Mayer ont été utilisés. Un ml d'extrait est divisé en 2 volume égaux dans 2 tube à essais. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl et ajouter 0.5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0.5 ml de réactif de Dragendorff dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brune, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (Harbone, 1998).

II.4.9. Terpénoïdes

Cinq ml d'extrait est mélangé avec 2 ml de chloroforme, puis 2 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés. L'apparition d'un interphase entre les deux phase indique la présence des terpénoïdes (Edeoga *et al.*, 2005).

II.5. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait d'*A. halimus* est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Li *et al.*, 2007).

Un volume de 1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μl d'échantillon ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μl d'une solution de carbonate de sodium (10 %) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) (Boizot et charpentier, 2006).

II.6. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune coloration dont l'intensité est mesurable à un spectrophotomètre à UV (Donzo *et al.*, 2015).

À 1 ml d'échantillon ou standard est ajouté 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration en flavonoïdes est déterminée à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2.5 - 20 $\mu\text{g/ml}$). les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg Ex}$) (Bahorun *et al.*, 1996).

II.7. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique

Deux méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité anti-lithiasique de l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*A. Halimus*: l'étude de la cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium par la méthode turbidimétrique et suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium par microscope.

II.7.1. Model expérimental d'étude de la cinétique de cristallisation de l'oxalate de calcium par la méthode turbidimétrique

La cristallisation de l'oxalate de calcium et l'effet de l'inhibiteurs sur la cinétique de cristallisation ont été étudiées par turbidimétrie à 620 nm, en solution aqueuse avec l'aide d'un spectrophotomètre (Driouch *et al.*, 2008).

La turbidimétrie est une méthode optique qui mesure le trouble (absorbance) qui existe dans une solution. Ce modèle possède l'avantage de quantifier le pouvoir inhibiteur exprimé en % par rapport à un témoin.

Il est donné par la formule suivante (Abdelmalek *et al.*, 2001).

$$I (\%) = [1 - (P_{AI} / P_{SI})] \times 100$$

P_{AI} et P_{SI} représentent respectivement les valeurs des pentes turbidimétriques avec et sans inhibiteur.

Toutes les solutions sont préparées dans NaCl (0.15 M). Les expériences sont effectuées en présence et en absence d'inhibiteur.

II.7.1.1. Test en absence d'inhibiteur

Un volume de 1.5 ml de CaCl_2 (20mM) est placé dans un cuve, placé dans un spectrophotomètre et tarer au zéro, aussi tôt 1.5ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (2mM) est versé

rapidement sur la solution de CaCl_2 . la mesure de l'absorbance est déclenchée chaque 6s pendant 20 min (Abdelmalek *et al.*, 2001).

II.7.1.2. Test avec inhibiteur

L'évaluation de l'effet inhibitrice d'extrait aqueux de la partie aérienne d'*A.Halimus* est effectuée par la même méthode, avec 1ml de la solution d'extrait à différentes concentration (0.5mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml et 0.05mg/ml). Un volume de 1ml de CaCl_2 (20mM) est ajouté et qui permet de tarer le spectrophotomètre au zéro, aussi tôt 1 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (2mM) est versé rapidement. La mesure de l'absorbance est déclenchée rapidement chaque 6s pendant 20 min (Abdelmalek *et al.*, 2001).

La manipulation se fait contre un contrôle positif qui est l'acide citrique avec les concentrations (1mg/ml, 0.5mg/ml).

II.7.2. Suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium par microscope

II.7.2.1. Cristallisation en absence d'inhibiteur

Les solutions préparées sont placées dans des erlenmyer et mises dans un bain-marie thermostaté à 37°C . Le milieu de la cristallisation est maintenu sous agitation magnétique (150 tpm) à 37°C . Après agitation, un prélèvement de la suspension homogène est effectué à l'aide d'une pipette pasteur, placé en cellule de thoma puis examiné par microscope optique (l'objectif X40) pour la détermination du nombre de cristaux et d'agrégats d'oxalate de calcium di-hydraté. La cinétique est suivie chaque 5 minute pendant 55 minutes de cristallisation, les expériences ont été répétées 03 fois (Sbahi, 2017).

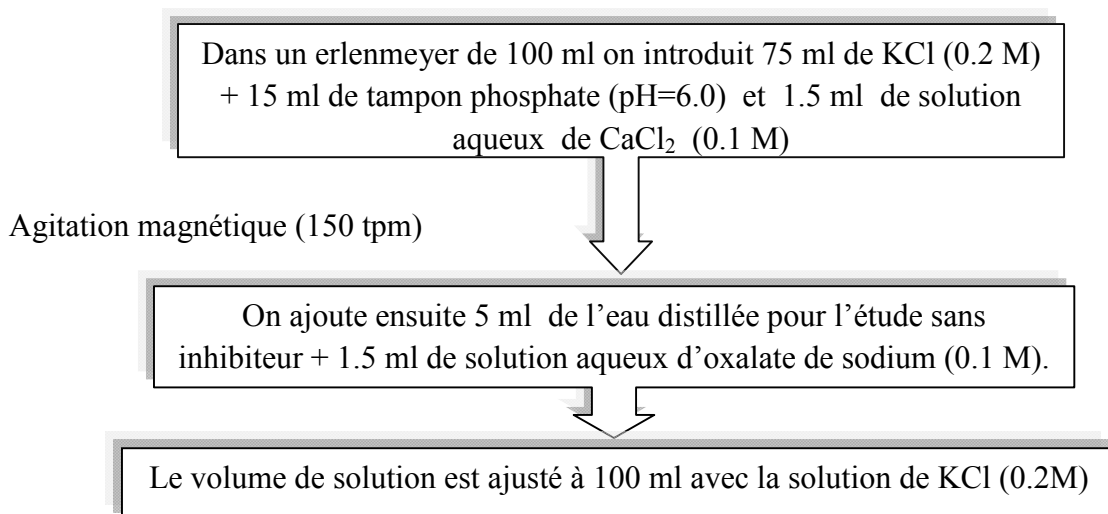


Fig. 9 La procédure de préparation de l'urine synthétique.

II.7.2.2. Cristallisation en présence d'extrait aqueux de la partie aérienne d'*A. Halimus*

La cinétique de cristallisation a été suivie par la même procédure d'étude sans inhibiteur, sauf en remplaçant l'eau distillée par 05 mL de l'extrait aqueux avec les concentrations (0.5mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml et 0.05mg/ml).

Paramètres déterminés

Pour une meilleure appréciation de l'activité d'*A. Halimus* sur la cristallisation, le nombre de cristaux et d'agrégats ont été déterminés. Deux paramètres de plus ont été calculés (Sbahi, 2017).

- Le pourcentage d'inhibition (PI %), utilisé pour évaluer le développement du nombre et de la taille de cristaux. Il se calcule comme suit :

$$I\% = 1 - (AI / SI) \times 100$$

AI : valeur avec inhibiteur

SI : valeur sans inhibiteur

- Le deuxième est le taux d'agrégation. Bien que rarement étudiée dans les cristalluries spontanées, l'agrégation cristalline est considérée comme l'un des principaux facteurs de la formation des calculs. Le taux d'agrégation représente le pourcentage d'agrégats par rapport au nombre total de cristaux et qui se calcule comme suit :

$$TA = (\text{Nombre d'agrégats} \times 100) / (\text{Nombre de cristaux isolés} + \text{Nombre d'agrégats})$$

II.8. Etude statistique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne \pm SD. La comparaison de résultats de contrôle positif (AC) et ceux des différents essais d'échantillons (0.5, 0.2, 0.1 et 0.05 mg/ml) ont été fait par Anova suivé par le test Dunnett (comparaison multiple) en utilisant le logiciel Graph Pad. Prism (version 7.00). Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ($p \leq 0.05$).

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Etude phytochimique

III.1.1. Test d'humidité et séchage

L'appréciation de la matière sèche repose sur la détermination de la teneur en eau des échantillons à analyser qui ont été récoltés en Mars 2019.

L'analyse de notre échantillon montre un taux d'humidité très élevé équivalent à 83.07 %. Ce résultat montre que plus de $\frac{3}{4}$ du poids de la plante fraîche est constitué par l'eau, le reste (16.93) étant de la matière sèche (figure10).

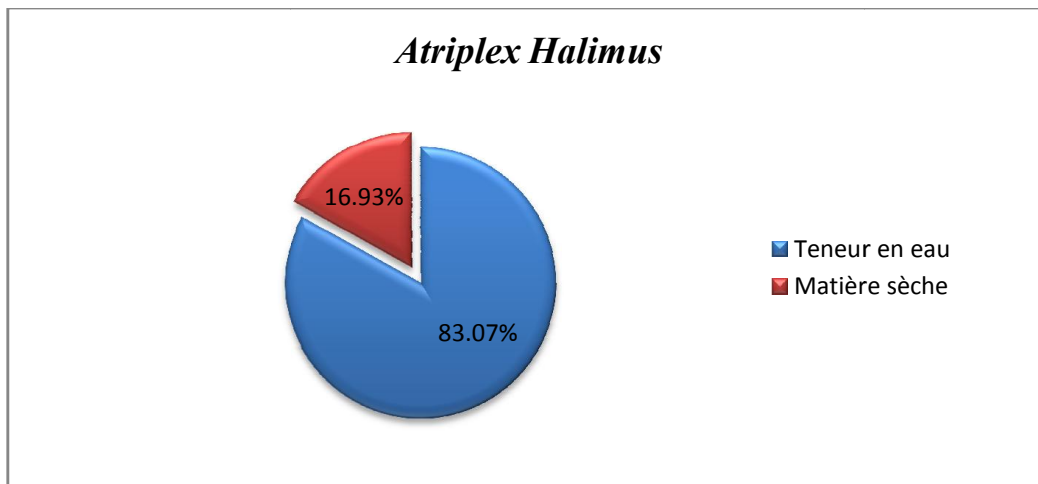


Fig. 10 Teneur en eau (%) de la partie aérienne d'*Atriplex Halimus*.

Belarbia (2018) a montré que le taux de la ms *A. Halimus*, récolté de différentes régions de Mostaganem, varie de 17.91 à 21.66 % qui approximativement égale le résultat de notre plante qui est récolté de la région de Maarif m'sila.

Cette petite variation expliquée par les conditions climatiques différentes qui caractérisent les deux régions.

III.1.2. Extraction

L'opération de l'extraction par infusion de la partie aérienne d'*A. Halimus* a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute avec un rendement de 20.77%. L'ex aq obtenue est sous forme poudre et de couleur marron.





Il est difficile de comparer notre résultat avec ceux de la bibliographie, car l'extraction est influencée par la nature chimique de solvant utilisée, la méthode d'extraction employée, la taille des particules de l'échantillon, ainsi que la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007).

III.1.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique)

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait aqueux préparé à partir de la partie aérienne de l'*A. halimus*. Ces tests consistent à détecter les différentes familles des composés existant dans la partie étudiée dans notre plante par des réactions qualitatives de caractérisation (tableau 1). Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (Hagerman *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus ont montré la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de tannins, de saponosides, de coumarines, de terpénoïdes et des alcaloïdes. Les mêmes résultats ont été trouvés par Benhammou *et al* (2009) et Emam (2011) qui ont montré leur présence par des tests préliminaires et des dosages sur des extraits méthanoliques des feuilles de l'*A. halimus*.

Tableau 1: Résultats des tests phytochimiques sur l'*A. halimus*.

Groupes chimiques	Indicateur	Résultats	
Polyphénols	Formation d'un précipité noir-vert	++	
Flavonoïdes	De couleurs jaune à incolore	++	
Tannins	Vert foncée ou bleu vert	++	
Composés reducteurs	Précipité rouge brique	+++	

Saponosides	Formation de mousse	+++	
Quinones	Couleur qui vire au jaune, rouge orangé ou violet	++	
Coumarines	Fluorescences	+	
Alcaloïdes	Précipite blanc ou brune	+	
Terpénoïdes	Apparition d'un interphase entre deux phases	++	

- Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive: ++

- Réaction faiblement positive : +

Réaction négative: -

III.1.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par mg de la matière végétale sèche (μg EAG/ mg Ex). Ils sont basés sur la formule de la régression linéaire de ($y = 0.0109x + 0,0724$) avec un coefficient de corrélation ($R^2 = 0.9993$), de la courbe $A = f$ ([Acide gallique]) (Annexe 1). Les résultats révèlent que la teneur en polyphénols de l'Ex aq de la partie aérienne d'*A.Halimus* est de $17.92 \pm 0.165 \mu\text{g}$ EAG/ mg Ex (figure 11).

Bouchoucha et Ouazeta (2018) ont trouvé une valeur 27.04 mg d'acide gallique/g d'extrait, une valeur est supérieure à notre résultat. Paradoxalement notre résultat est

supérieur à ceux de Belhadj Tahar *et al* (2015) qui est de l'ordre 3.648mg EAG/g Ex et de Rached (2009) a trouvé une valeur de 16.50mg EAG/g Ex.

Les teneurs et la composition en polyphénols diffèrent d'un auteur à un autre, cela est probablement dû à différents facteurs comme la complexité de ces composés, le type et la concentration du solvant et la différence de la période et de la région de récolte. De plus la méthode d'extraction et du dosage influence les teneurs en composés phénoliques (Boukroune, 2012).

III.1.5. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode spectrophotométrique au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent de quercétine par mg de la matière végétale sèche (μg EQ/ mg Ex). Ils sont basés sur la formule de la régression linéaire de ($y = 0.0439x - 0,0180$) avec un coefficient de corrélation ($R^2 = 0.9987$), de la courbe $A = f([Quercétine])$ (Annexe 2).

Les résultats révèlent que l'Ex aq de la partie aérienne d'*A.Halimus* contient une teneur de $5.39 \pm 0.124 \mu g$ EQ/ mg Ex en flavonoïde (figure 11).

Comparativement à d'autres études, notre résultat concorde avec celui obtenu par Bouchoucha et Ouazeta (2018) qui ont trouvé 7.691mg ER/g Ex. Rached (2009) qui trouve une valeur de 16.41mg ECAT/g Ex. Par contre, la teneur rapportée par Belhadj Tahar *et al* (2015) est de 0.120mg EQ/g Ex, une valeur très inférieure à notre résultat. Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

D'après les résultats précédents, on constate que la teneur en polyphénols d'*A.Halimus* est supérieure à celle des flavonoïdes.

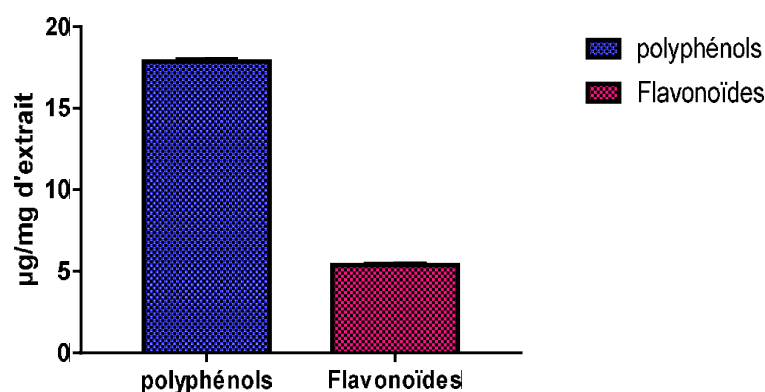


Fig.11 Comparaison des teneurs en flavonoïdes et polyphénols totaux de l'Ex aq.

III.2. Pouvoir anti-lithiasique

Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolismes secondaires. Dans la plupart de cas, les patients utilisent les plantes médicinales comme un remède alternatif pour traiter lithiases urinaires.

Dans notre travail on a testé l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de la partie aérienne d'*A.Halimus* sur la cristallisation oxalo-calcique qui représente un modèle d'étude de lithiase urinaire *in vitro*.

III.2.1. Suivi de la cinétique de cristallisation oxalo-calcique par la méthode turbidimétrique.

La turbidimétrie est une méthode cinétique qui mesure la variation de l'absorbance en fonction du temps. Elle mesure l'absorbance qui a lieu lors de la formation de nombreux cristaux. Le nombre et la taille des cristaux formés dans la solution changent en fonction du temps. Au début, il s'agit de germes qui sont de très petits cristaux, en suite ils croissent et après un certain moment ils s'agrègent. Elle assure aussi un suivi de la cristallisation d'une façon continu et permet l'obtention d'un profile tri phasique, montrant les trois phases de la cristallisation (figure 12) (Djemoui, 2003).

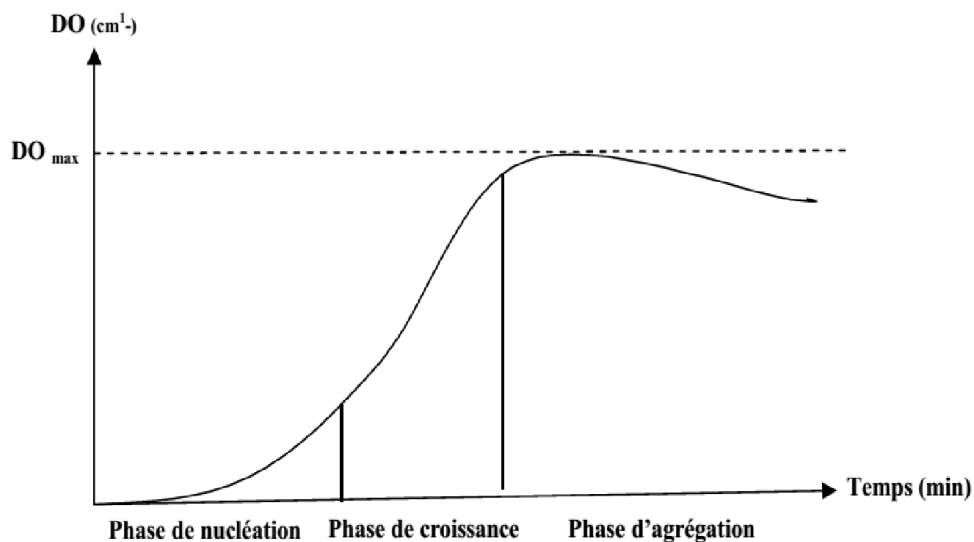


Fig. 12 Allure générale des courbes turbidimétriques (Sekkoum, 2011).

La courbe turbidimétrique de la cristallisation peut être divisée en trois parties:

- La première partie correspond à la phase de nucléation, le paramètre cinétique qui la caractérise est le temps d'induction.

- La deuxième partie correspond à la croissance cristalline, caractérisée par un paramètre cinétique qui est la pente turbidimétrique.
- la troisième partie représente l'agrégation cristalline (Djemoui, 2003).

Les essais ont été réalisés en absence et présence d'inhibiteur (extrait) à différentes concentration.

III.2.1.1. Essai sans inhibiteur

Dans l'étude de cristallisation actuelle, on a choisi le modèle turbidimétrique qui a une sensibilité et une fiabilité assez importante. Pour suivre la cinétique de la cristallisation et calculer le pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux des feuilles d'*A. Halimus*, on réalise préalablement l'essai sans inhibiteur considéré comme témoin.

Les valeurs de la pente et la régression linéaire (R^2) de la courbe de la cristallisation sans inhibiteur sont ressemblent dans le tableau suivantes:

Tableau 2: la cristallisation oxalo-calcique sans inhibiteur.

Concentration (mmol/l)	Pente	R^2
CaCl ₂ (20mM) Na ₂ C ₂ O ₄ (2mM)	0.002555	0.997

La figure (13) représente la variation de l'absorbance en fonction de temps pour l'essai sans inhibiteurs. La courbe de cristallisation sans inhibiteurs présente une allure similaire à celle citée précédemment (figure 12), sauf que le temps d'induction est nul pour la cristallisation sans inhibiteur et il est autant augmenté à la plus forte concentration en inhibiteur.

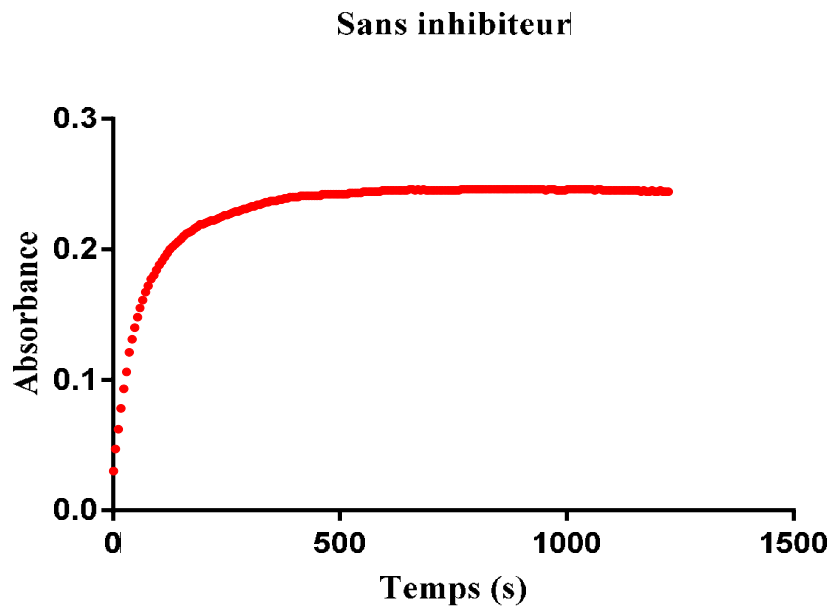


Fig. 13 Evolution de la cristallisation oxalo-calcique en absence d'inhibiteur.

III.2.1.2. Essai avec l'acide citrique

La cristallisation oxalocalcique en présence de l'acide citrique a été testée avec des concentrations de 0.5 et 1mg. L'évolution de la cristallisation pour les différentes concentrations de l'acide citrique est donnée par la figure 14.

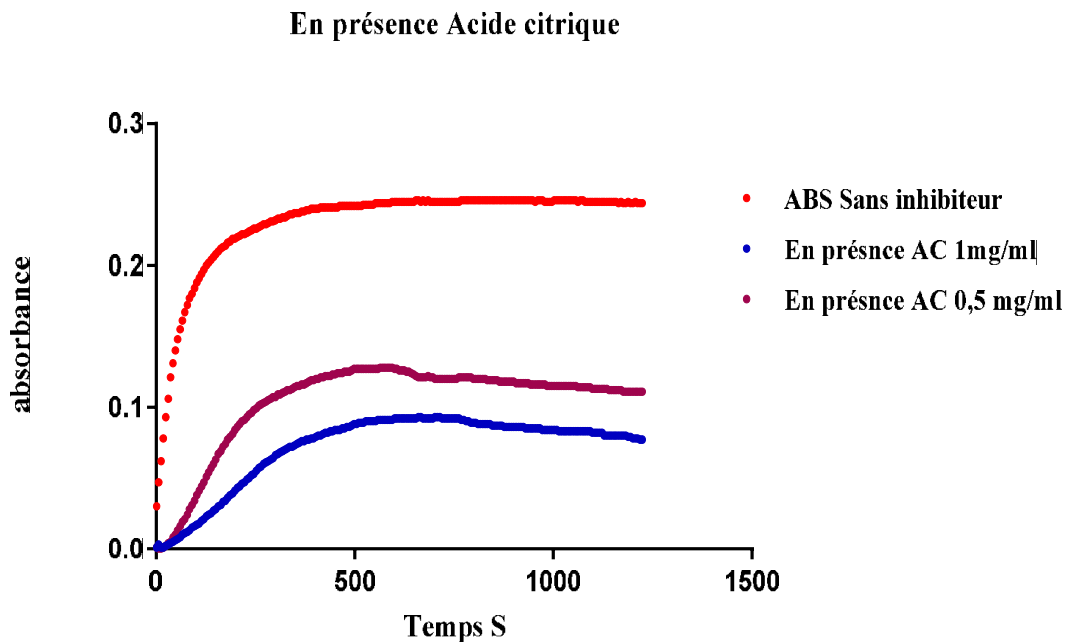


Fig. 14 Cinétique de l'effet de l'acide citrique sur la cristallisation oxalo-calcique.

III.2.1.3. Essai avec inhibiteur

L'essai permet de mettre en évidence l'effet de l'extrait aqueux d'*A. halimus* à différentes concentrations sur la cristallisation oxalo-calcique par rapport au témoin (essai sans inhibiteur).

Les courbes de la figure 15 montrent que la variation de l'absorbance décroît progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Ainsi, on remarque que les valeurs des pentes décroît avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur, ces valeurs atteignent une valeur minimale de 0.00358 pour une concentration de 0.01 mg/ml (tableau 4). D'autres parts on observe que les valeurs du pourcentage d'inhibition croient avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur, ces valeurs atteignent une valeur maximale de 85.99 % pour une concentration de 0.5 mg/ml.

L'analyse des différents graphes avec inhibiteur nous permet de l'extrait à différentes concentrations montre un pouvoir inhibiteur dose-dépendante.

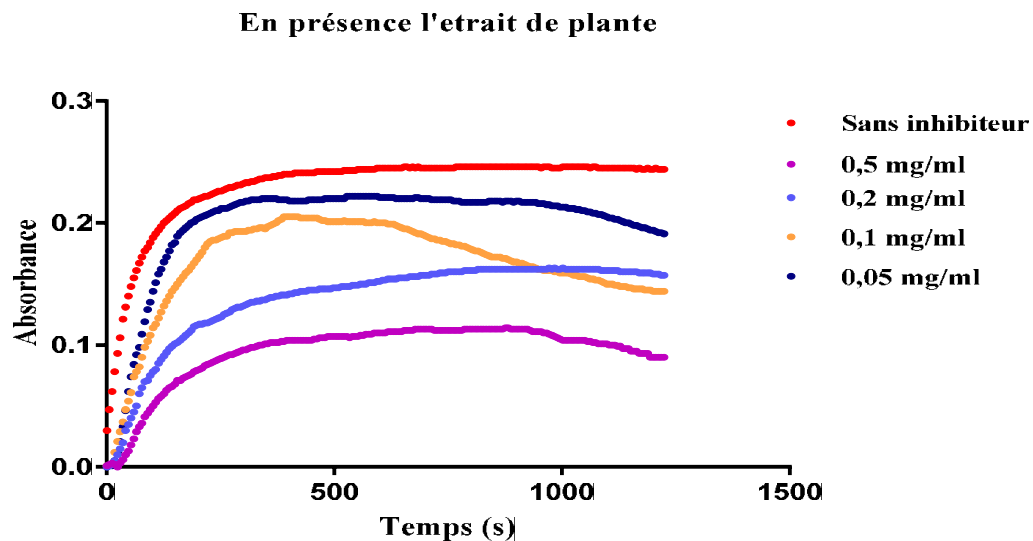


Fig. 15 Cinétique de l'effet de l'extrait aqueux sur la cristallisation oxalo-calcique.

Comparativement, notre résultat de l'extrait d'*Atriplex Halimus* qui présente un pourcentage d'inhibition maximale de 85.99% à la concentration 0.5mg/ml avec l'acide citrique qui présente un pourcentage d'inhibition de 79.33 à la même concentration. Ceci permet de conclure que notre extrait a une forte activité anti-lithiasique (figure 16).

Tableau 3: Paramètres turbidimétrique de la cristallisation oxalo-calcique en présence de l'extrait aqueux et de l'acide citrique.

Echantillon	Concentration (mg/ml)	Pente	R ²	Inhibition (%)
Acide citrique	1	0.000248	0.997	90.29 ± 0.925
	0.5	0.000528	0.999	79.33 ± 1.266
Extrait aqueux	0.5	0.00358	0.995	85.99 ± 1.294
	0.2	0.00103	0.994	59.69 ± 1.471
	0.1	0.001786	0.995	48.65 ± 0.863
	0.05	0.001786	0.992	30.10 ± 1.167

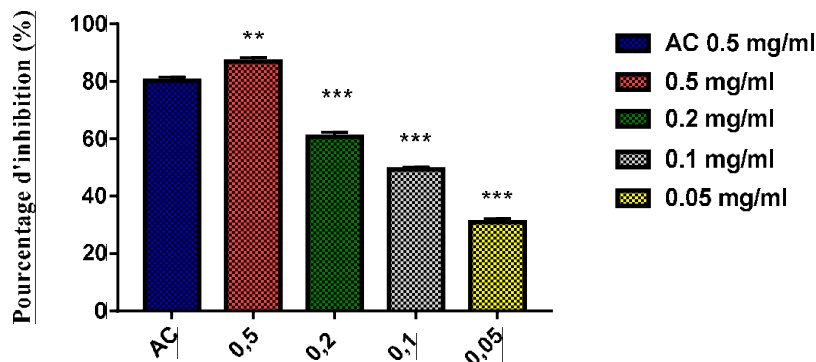


Fig. 16 Pourcentage d'inhibition de l'acide citrique et de l'extrait d'*A. Halimus* à différentes concentrations.

Les valeurs de pourcentage d'inhibition d'Ex aq sont significativement différentes par rapport au AC (0.5 mg/ml), (**): significative et (***) : Très significative ; (P< 0.05, test Dunnett).

III.2.2. Suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium di-hydraté par microscopie

Pour montrer l'action des différentes concentrations de l'extrait d'*A. Halimus* (0.5, 0.2, 0.1 et 0.05 mg/ml) sur les phases de cristallisation (nucléation, croissance cristalline et agrégation), nous avons appliquée une méthode simple qui consiste à suivre la cinétique de la cristallisation en fonction du temps. Les résultats sont développés sous forme de photographies.

III.2.2.1. En absence de l'extrait d'*A. Halimus*

D'après les résultats obtenus on remarque que le taux d'agrégation augmente au cours du temps (tableau 4), en parallèle les photographies obtenues montrent la diminution du nombre des cristaux d'oxalate de calcium et l'augmentation de nombre et le volume des agrégats (tableau 5).

III.2.2.2. En présence de l'extrait d'*A.Halimus*

Dans les mêmes conditions de fonctionnement en présence de l'extrait aqueux d'*Atriplex Halimus* a une concentration de 0.5 mg/ml, l'observation microscopique montre clairement qu'il ya une réduction significative de la taille et du nombre des cristaux et les agrégats avec un taux d'agrégation faible. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré à la 25^{ème} minutes (74.14%), ce pourcentage diminue avec le temps jusqu'à atteindre une valeur 34.42% à la 55^{ème} minutes (tableau 4).

De la 5^{ème} minutes jusqu'à la 30^{ème} minutes, l'extrait a la concentration 0,2mg/ml exerce un effet inhibiteur qui est maximal a la 20^{ème} minutes (68.49%), cet effet diminue au cours du temps jusqu'à atteindre 2.38 % à la 55^{ème} minutes (tableau 4).




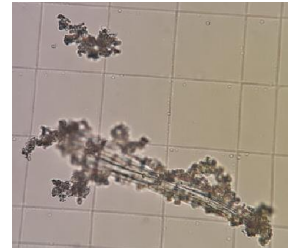


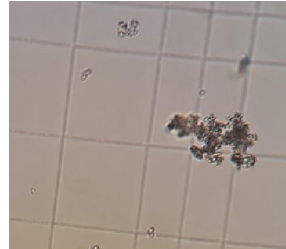
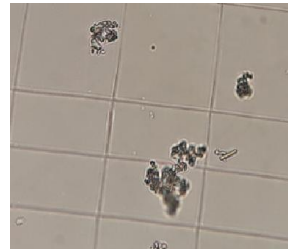
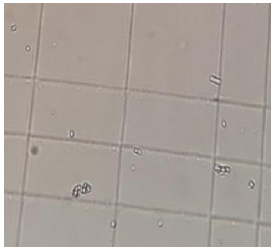
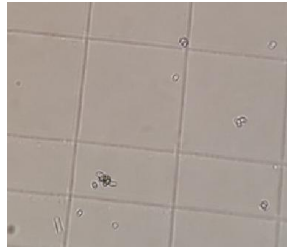




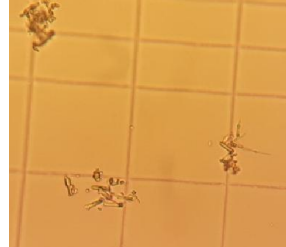





De même manière l'extrait à des concentrations 0.1mg/ml et 0.05mg/ml exerce un effet inhibiteur maximal à la 25^{ème} et la 20^{ème} minutes, avec des pourcentages d'inhibition de 48.28% et 41.1% respectivement. De même, on observe une diminution du taux d'agrégation au cours du temps pour les deux concentrations (tableau 4).

Ces résultats peuvent être interprétés par la présence de substances inhibitrices qui peuvent bloquer la croissance de certaines faces cristallines, et engendrer la modification de la forme du cristal. Certains extraits agissent comme préventeur de la germination des cristaux, d'autres agissent sur l'agrégation (Bouamoud, 2014).

Tableau 4: Evolution du taux d'agrégation et du pourcentage d'inhibition.

		Temps (min)					
		5	20	25	30	45	55
SI	TA	14.63	23.33	35.46	37.93	40.09	47.6
	PI%						
0.05 mg/ml	TA	10.64	22.58	24.44	35.71	39.84	45.45
	PI%	27.27	41.1	40.08	36	13.88	0
0.1 mg/ml	TA	9.28	13.88	20.55	24	28.57	32.76
	PI%	36.56	38.37	48.28	42	31.94	1.19
0.2 mg/ml	TA	6.67	8.12	12.45	14.16	17.99	20.5
	PI%	39.46	68.49	56.47	50.5	34.72	2.38
0.5 mg/ml	TA	4.56	7.89	10.12	13.34	17.67	19.56
	PI%	41.01	64.38	74.14	70.5	60.42	34.42

Tableau 5: Cristallisation d'oxalate de calcium en absence et en présence de l'inhibiteur (l'extrait).

		Temps (min)			
		5	20	45	55
SI					
	0.05				
	0.1				
	0.2				
	0.5				

Après les recherches approfondies dans les différents sites et les bases de données de la littérature, nous n'avons trouvé aucune étude sur l'activité anti-lithiasique d'*A. Halimus* par microscopique, mais il y'a une étude faite par Sbahi (2017) sur la plante *Inula viscosa* (plante halophyte). Cette plante exprime un pourcentage d'inhibition maximale (20.5%) à la 5^{ème} minute pour une concentration de 30mg/ml. Cependant, notre extrait exerce un pouvoir inhibiteur de 74.14 % à la 25^{ème} minute pour une concentration 0.5mg/ml.

Notre extrait possède un effet inhibitrice hautement supérieur (presque 4 fois plus) à celui de Sbahi (2017) et ceci pour une concentration très bas (60 fois inférieur).

Conclusion

Conclusion

Pour combattre les diverses pathologies, l'Homme a utilisé des différents médicaments, mais ces derniers peuvent causer quelques complications graves. C'est pour cela qu'il a recourt à la médecine traditionnelle par l'utilisation des substances naturelles assimilables par l'organisme et qui représentent le premier réservoir de nouveaux médicaments.

Dans ce travail, nous avons tenté de traiter un problème de santé (la lithiase urinaire) par l'utilisation de la plante d'*Atriplex halimus* de la région de Hodna (Maarif). L'effet de l'extrait aqueux de la partie aérienne de cette plante a été étudié sur la formation des calculs d'oxalate de calcium *in vitro*.

Le screening phytochimique d'*A. halimus* à révèle sa richesse en polyphénols, en flavonoïdes, en tanins, en saponines, en coumarines et en alcaloïdes. De plus, le dosage spectrophotométriques de l'extrait aqueux de cette plante montre que la teneur en polyphénols de l'extrait aqueux d'*A. halimus* est supérieure à celle de flavonoïdes.

Les travaux expérimentaux se basés dans un premier temps sur le suivi de la cinétique de cristallisation oxalo-calcique par la méthode turbidimétrique qui nous a permis de déterminer le pouvoir d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait de la plante étudiée. De même, le suivi de la cristallisation de l'oxalate de calcium di-hydraté des urines synthétiques par microscopie nous a permis de confirmer le grand pouvoir anti-lithiasique de ce extrait.

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus ont démontré l'efficacité de l'Ex aq de la partie aérienne d'*Atriplex Halimus* dans l'inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium. Le pouvoir d'inhibiteur de ce dernier est de l'ordre 85.99% pour une concentration d'extrait de 0.5 mg/ml. Ce résultat prometteur est un grand pas vers la recherche d'un remède efficace contre la formation de lithiases urinaires dans l'avenir et ceci par la caractérisation et la détermination des substances bioactive responsables au cette activité.

Référence bibliographique

Référence bibliographique

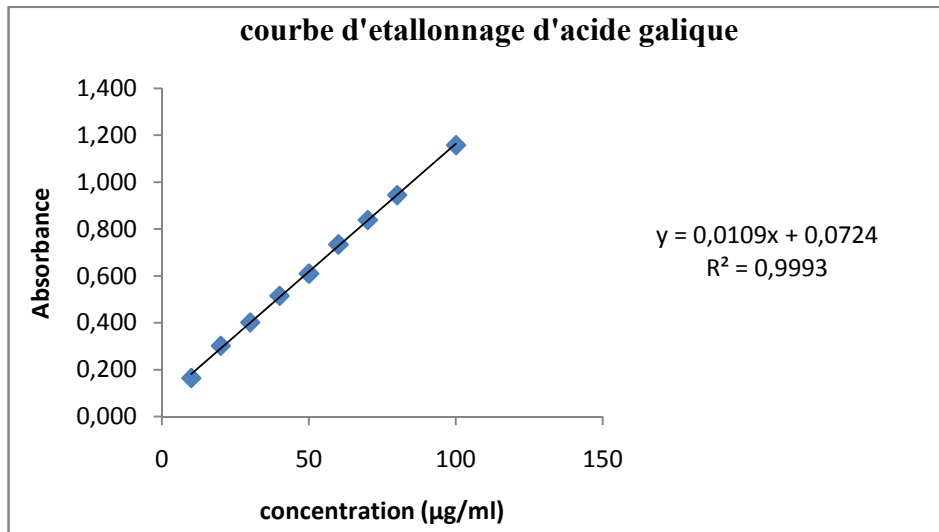
- **Abdelmalek, F., Harrache, D., Addoum, S., Semmoud, A., (2001).** Étude par turbidimétrie de la cristallisation oxalo-calcique en présence de quelques inhibiteurs. *Phys. Chem. News*, 4 : 96-107.
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch*, 46 : 1086-1089.
- **Battu, C., (2016).** L'accompagnement nutritionnel d'un patient présentant une lithiase urinaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 55(561):53–56.
- **Belarbia, A., (2018).** *Etude physiologique et phytochimique de la tolérance aux métaux lourds « Pb,Cr(III) et Cr(VI) » par l'Atriplex Hlimus L.* Thèse pour obtention du diplôme de doctorat en Sciences. Mostaganem, Université Abdelhamid Ben Badis, 281 pages.
- **Belhadj Tahar,S. Hadj-Mahammed, M.et Yousefi, M., (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de l'Atriplex halimus L et de l'Haloxylonscopariumpomel du Sahara septentrional. *Annales des Sciences et Technologie*, 7(11) : 258-264.
- **Belouad, A., (2001).** *Plantes médicinales d'Algérie*, éd. office des Publications Universitaires, Alger, 284 p.
- **Benhammou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T. K., (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of Atriplex halimus. *Science direct Chimie*, 12 :1259–1266.
- **Benkhaled, A., (2018)** *Activités anti-inflammatoire, anti-oxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux de Limoniastrum guyonianum.* Thèse pour obtention du diplôme de doctorat en Sciences. Sétif, Université Farhat Abbas Sétif 1, 124p.
- **Benkhaled, A., Senator, A., (2015).** Effects of Aqueous Leaf Extract of Limoniastrum guyonianum Pretreatment on Nickel Induced Acute Heamato-toxicity in Male Mice. *Global Veterinaria* ,15 (5): 493-497.
- **Boizot, N., et charpentier, J., (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foresties. Le Cahier des techniques de L'INRA, Numéro spécial 2006 : Méthodes et outils pour l'observation des milieux forstiers, Prairiaux et aquatiques, 79-82.
- **Bouamoud, F., (2014).** *Etude des paramètres biochimiques et corrélation avec la lithiase urinaire.* Thèse pour obtention du diplôme de doctorat en Sciences. Mostaganem, Université Abdelhamid Ben Badis, 160 P.
- **Bouchoucha, M et Ouazeta, R., (2018).** *Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant de l'extrait méthanolique d'Atriplex halimus.L.* Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Constantine, Université des Frères Mentouri Constantine1, 66 p.

- **Boukroune, N., (2012).** *Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale «Matricaria pubescens» : effets de la durée et du solvant d'extraction.* Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie, 44 p.
- **Castiglione, V., Jouret, F., Bruyère, O., Dubois, B., Thomas, A., Waltregny, D., Bekaert, A.C., Cavalier, E., Gadisseur, R., (2014).** Epidemiology of urolithiasis in Belgium on the basis of a morpho-constitutional classification. *Nephrol Ther*, 11(1): 42-49.
- **Chikhi, I., Allali, H., Dib, M.A., Medjdoub, H., Tabeti, 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(3): 181-184.
- **Cochat, P., Bacchetta, J., Sabot, J. F., Bertholet-Thomas, A., Demède, D., (2012).** Lithiase urinaire de l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 25(5): 255-268.
- **Cynthia, J., Denu-Ciocca, Romulo E., Colindres., (2011).** calculs urinaires (néphrolithiase), *Elsevier Masson S.A.S*, 1059-1065.
- **Dalibon, P. (2015).** La lithiase urinaire, une affection sous surveillance. *Actualités Pharmaceutiques*, 54(542): 23-29.
- **Daudon, M., Jungers, P., Traxer, O., (2012).** *Lithiase urinaire*. 2^{ème} éd. Paris : Leclerc, E.p200
- **Daudon, M et Doré, B., (1999).** Cristallographie des calculs urinaires, Aspects néphrologiques et urologiques. *Néphrologie-Urologie*, 18-104-A-25: 1-17.
- **Daudon, M., Traxer, O., Lechevallier, O., Saussine, E., (2008).** Lithogenesis. *Prog Urol*, 18(12): 815-827.
- **Djemoui, A. (2003).** *L'effet inhibiteur de l'extrait de quelques plantes sahariennes sur la lithiase urinaire type Oxalo-calcique.* Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Ouargla, Université d'Ouargla, 83 p.
- **Dominique, S. (2014).** Medical treatment of uric acid stone. *Prog Urol*, 24(14): 915-917.
- **Donzo, M., Sarr, A., Diop, M., Samb, A., Bassene, E., Barrym.S., (2015).** Dosage des flavonoïdes totaux et détermination du pouvoir antioxydant dans l'extrait brut des écorces de tronc d'*Uapaca togoensis* (Aub. et Léan.). *El Wahat pour les Recherches et les Etudes*, 8 (1) : 11 - 18.
- **Driouch, A., Djelloul, A., Kaid-Omar, Z., Semmoud, A., Rais, A., Addou, A. (2008).** Optimized experimental design for the inhibition of calciumoxalate using a turbidimetric model, *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineerig*, 3: 425-431.
- **Edeoga, H.O., Okwu, D.E et Mbaebie, B.O., (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of Biotechnology*, 4(7):685-688.
- **EL-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R., (2018).** SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: *Mentha Spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 226-233.
- **Emam S.S., (2011).** Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant, *Journal of Natural Products*, 4: 25-41.
- **Fazil Marickar Y. M., Lekshmi Luxmi Varma, P. R., Peter Koshy., (2009).** Optical microscopy versus scanning electron microscopy in urolithiasis. *Urol Res*, 37: 293-297.

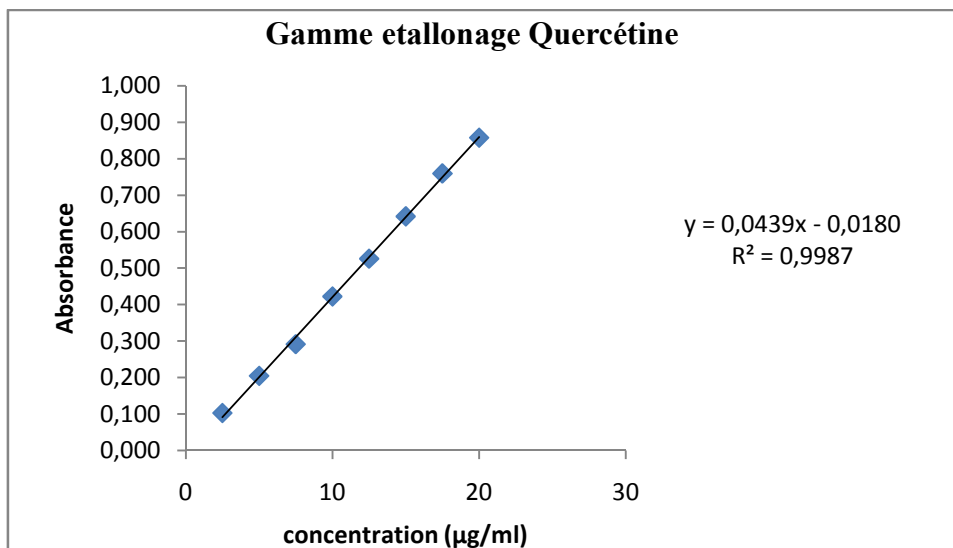
- **Fekak H. A. S., Rabii, R., EL Frougui, Y., Joual A., Debbagh, A., Bennani, S., Oussama, A., Meziane, F., (2006).** La lithiase urinaire : Etude spectrophotométrique (a propos de 80 cas). *J Maroc Urol*, 1: 17-20.
- **Ghourri .M., Zidane, L., Douira, A., (2013).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). *International Journal of biological and chemical science* ,7(4): 1688-1700.
- **Hagerman AE, Muller-Harvey I, Makkar HPS., (2000)** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques In Food and Agriculture. Vienna, 26p.
- **Harbone JB., (1998).** *Phytochemical Methods: A guide to techniques of plant analysis. 3ème Ed. Chapman et Hall Thomson Science (UK)*, 203-234.
- **Houérou, H. N., (1992).** The role of saltbushes (*Atriplex spp.*) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry Systems*, 18(2):107–148.
- **Jaggi, M., Nakagawa Y., Zipperle L., Hess B., (2007).** Tamm–Horsfall protein in recurrent calcium kidney stone formers with positive family history: abnormalities in urinary excretion, molecular structure and function. *Urol Res*, 35:55–62.
- **Jungers, P., Marie-France Gagnadoux D. J., Daudon M., (2001).** Lithiase cystinique : physiopathologie et traitement médical. *Progrès en Urologie*, 11: 122-126.
- **Khitri, W., Lachgueur, N., Tasfaout, A., Lardjam, A., Khalfa, A., (2016).** Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d’Oran, Algérie Approche ethnobotanique et phytochimique, *Revue d’ethnoécologie* [En ligne], 9 | 2016, mis en ligne le 01 juillet 2016, consulté le 30 septembre 2016. URL : <http://ethnoecologie.revues.org/2511> ; DOI : 10.4000/ethnoecologie,2511.
- **Li, H.B., 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 chemist*, 102: 771-776.
- **Nedjimi .B., Beladel .B., Guit .B., (2012).** Biodiversity of Halophytic Vegetation in Chott Zehrez Lake of Djelfa (Algeria). *American Journal of Plant Sciences*, 3, 1527-1534.
- **Oloyed, O.I ., (2005).** Chemical profile of Unripe pulp of *Carica papaya*, Pakistan. *Journal of Nutrition*, 4(6):3 79-381.
- **Ortiz-dorda, J., Martínez-mora, C., Correal, E., Simón, B., Cenis, J. L., (2005).** Genetic Structure of *Atriplex halimus* Populations in the Mediterranean Basin. *Annals of Botany*, 95: (5), 827-834.
- **Pouget. M., (1980).** *Les relations sol-végétations dans les steppes sud-Algéroises travaux et document de L’O.R.S.T.O.M.N°* :166 P.555. Paris.
- **Quezel, P., Santa, S., (1962).** *Nouvelle flore de l’Algérie, et des régions désertiques méridionales*. Edition du centre national de la recherche scientifique, Tom1, Paris, 286-288.
- **Rached.W., (2009).** Évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique, thèse pour l’obtention du diplôme de magistère en biologie. 120 pages
- **Rajeshwar, Y., litha, N., (2013).** Preliminary phytochemical screening and *in vitro* anthelmintic effects of *acemella paniculata* plant extracts. *Biolife*, 1 (3): 106-112.

- **Rajeshwari, P., Jabbirulla, G. R. SK., Vishnu Vardhan, I., (2013).** Evaluation of invitro anti-urolithiasis activity of convolvulus arvensis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5: 599-601.
- **Sbahi, K., (2017).** *Etude épidémiologique, paramétrique et phytothérapeutique de la lithiase urinaire.* Thèse pour obtention du doctorat en Sciences. Mostaganem, Université Abdelhamid Ibn badis, 189p.
- **Sekkoum, K., (2011).** *Composition phytochimique et effet, in vitro, des extraits de quelques plantes médicinales du Sud-Ouest Algérien sur la cristallisation lithiasique oxalocalcique.* Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences. Sidi bela-abbes, université djillali liabes de sidi bela-abbes, 108p.
- **Servais, A., Daudon, M., Knebelman, B., (2006).** Lithiases médicamenteuses. *Annales d'Urologie*, 40(2): 57-68.
- **Stalikas, C. D., (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18): 3268-3295.
- **Traxer, O., Lechevallier E., Saussine, C., (2008).** Urolithiasis in childhood. *Prog Urol*, 18(12): 1005-1014.
- **Traxer, O., (2007).** Lithiase urinaire. *la revue du praticien*, 57: 1805-1815.
- **Tsujihata, M., (2008).** Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. *International Journal of Urology*, 5(2): 115-120.
- **Usman, H., Abdulrahman, FI ., Usman, A., (2009).** Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of ficus thonningii (moraceae). *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6 (3): 289-295.
- **Walker, D. J., Lutts, S., Sánchez-García, M., & Correal, E., (2014).** *Atriplex halimus L.: Its biology and uses.* *Journal of Arid Environments*, 100-121.
- **Zoung-Kanyi J., Sow, M., (1990).** La Lithiase urinaire au cameroun considération Etiopathogeniques, Clinique et thérapeutique. A propos de 118 cas. *Médecine d'Afrique Noire*, 37 (4):176-182.

Annexes



Annexe .1 Courbe d'étalonnage d'acide galique.



Annexe. 2 Courbe d'étalonnage de Quercétine.