REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Laboratoire de Protection des Végétaux

Thèse en vue de l'obtention du Doctorat en Sciences Agronomiques

Domaine: Science de la nature et de la vie

Filière: Sciences Agronomiques

Spécialité: Hygiène et Sécurité Agroalimentaire

Présentée par

M^elle OULD KADDOUR Asma Souad

Thème

Etude de l'effet antifongique des extraits polyphénoliques de l'*Atriplex halimus* L., sur la croissance de certains champignons dermatophytes

Soutenue publiquement le: 19/06/2019

Devant le jury:

Président	CHERIGUENE	Abderrahim	Pr.	Univ. Mostaganem
Examinateur	BOUZOUINA	Mohammed	MCA.	Univ. Mostaganem
Examinateur	LATRECHE	Ali	Pr.	Univ. Sidi Belabès
Examinateur	BEKADA	Ahmed Mohamed Ali	Pr.	Centre Univ. Tissmesilt
Examinateur	TEFIANI	Choukri	MCA.	Univ. Tlemcen
Promoteur	LOTMANI	Brahim	Pr.	Univ. Mostaganem

Année universitaire: 2018/ 2019

Dédicaces

Tous d'abord je dédie cet évènement marquant de ma vie à la mémoire de mon pére Djillali qui n'a pas été présent dans tous les grands moments de ma carrière d'étude et professionnelle, mais sa présence dans mon cœur est éternelle.

J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

A ma très chère mère MEDJAHEDI Fatma

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à son juste valeur la gratitude et l'amour que je te porte. Je mets entre ta main, le fruit de longues années d'études, de long mois de distance de ton amour de ta tendresse, ton soutien et tes encouragements et surtout tes bénédictions. Tu représentes touts les membres de ma famille et tu es ma force motrice dans ma vie. C'est gráce à ton éducation et tes conseilles que je suis aujourd'hui une femme forte, courageuse et surtout reconnaissante.

Puisse le tout puissant te donne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tours

OULD KADDOUR

Asma Souad

Remerciements

Mes remerciements vont, tous d'abord, à Monsieur *Brahim LOTMANI*, professeur au département d'Agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, mon encadreur de thèse. Recevez, monsieur, mes plus sincères remerciements et reconnaissances pour votre disponibilité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Les conseils, que vous m'avez prodigués tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et succincts, m'ont facilité grandement la tâche et m'ont permis d'aboutir à la production de ce manuscrit. J'étais extrêmement sensible à vos qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je remercie également Monsieur *Abderrahim CHERIGUENE*, professeur au département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem), de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes respectueuses considérations.

Je tiens aussi à exprimer mes gratitudes à Monsieur *Ahmed Mohamed Ali BEKADA*, professeur au centre universitaire de Tissemsilt, qui m'a fait un grand honneur de lire et examiner cette thèse. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tous mes respects.

Je tiens aussi à remercier Monsieur *Mohammed BOUZOUINA*, Maître de Conférences au département d'Agronomie et directeur du laboratoire ''Protection des végétaux'', faculté des sciences de la nature et de la vie, Université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, de m'avoir honoré par l'examinassions de ce manuscrit, mais je vous exprime aussi mes éternelles reconnaissances pour vos aides et conseils pertinents et avisés, vos écoutes prépondérantes et votre disponibilité. Mais surtout, merci pour votre humanité, soutien et patience durant la période de réalisation de ce travail et de ce manuscrit.

Il m'est très agréable de remercier Monsieur *Ali LATRECH*, professeur au département de Biologie à la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'Université Djilali LYABES (Sidi Bel-Abbes), pour avoir accepté de juger mon travail. Veuillez croire en l'expression de mes respectueuses considérations.

Mes remerciements vont également à Mr *Choukri TEFIANI*, Maître de Conférences au département d'Agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie à l'Université d'Abou Baker

Belkaid (Tlemcen), pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je tiens à vous exprimer mes sincères reconnaissances et mes plus profonds respects.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr Djamel AIT SAADA et Mme Ouiza AIT CHAABAN, Maîtres de Conférences au département de Biologie, ainsi que Messieurs Abdelkader HOMRANI et Mohamed LARID professeurs au département d'Agronomie à l'université de Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem).

Je remercie également mes collègues : Mrs MESENOUA Mohamed et ARBAOUI Mohamed Maîtres de Conférences au Centre de Recherche Scientifique et Technique des Régions Arides (Biskra) et au département de Biologie de l'Université de Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem), respectivement, qui ont participé d'une part ou d'une autre à la réalisation de ce travail, notamment l'acquisition des échantillons expérimentaux.

Je tiens aussi à remercier, du plus fond de mon cœur, mon amie et ma petite Dr KOUADRIA Rabiaa, qui m'a vraiment soutenu et encouragé surtout pendant les moments difficiles, sans oublier tous les ingénieurs des différents laboratoires ; de Microbiologie, de Chimie, de Biochimie et en particulier celui de la protection des végétaux (Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem), qu'ils trouvent ici toutes mes reconnaissances et mes respects.

Merci

Résumé

Résumé

Les substances naturelles, et particulièrement les métabolites secondaires issus des biomasses végétales cultivées et/ou spontanés ont des intérêts multiples pour les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Des analyses chimiques, spectrophotométriques et chromatographiques (HPLC-DAD) des polyphénols, des flavonoïdes, des flavonols et des caroténoïdes contenus dans les parties aériennes de l'*Atriplex halimus* L. (feuilles et tiges) issus de trois zones Algériennes (Mazagran, Biskra et Sig) ont été déterminées. D'autres, complémentaires, permet de mettre en évidence les capacités antioxydantes et anti-radicalaires (CAT, DPPH, ABTS et BCB) et antifongiques contre *C. albicans* et *tropicalis*. Les résultats révèlent des quantités importantes de composés phénoliques dans les extraits de feuilles contrairement aux tiges. Les extraits de feuilles et de tiges de Mazagran sont plus riches en CPT (279,33±1,17 *vs* 68,11±7,76mg EAG /g EL) et en CFT (98,19±1,51 et 64,35±0,41mg ER/g EL, respectivement). D'importantes concentrations de flavonols et de caroténoïdes ont été notées dans les extraits de feuilles de Mazagran et de Sig, respectivement (34,87±1,32mg ER/g EL *vs* 73µg E*β*C/g EL). Néanmoins, l'analyse qualitative (HPLC-DAD) montre la présence de vingt-cinq composés phénoliques dont cinq acides phénoliques (quatre acide hydroxybenzoïques et un acide hydroxycinamique) et vingt flavonoïdes exclusivement présents dans les feuilles des différents écotypes. Les concentrations des extraits de feuilles indiquent une forte activité antioxydante par apport aux tiges. Comme pour le CAT (122,67±4,13µg EAA/g EL), les tests DPPH, ABTS et BCB (CI_{50}= 497,46±37,53µg ET/ml- 56,75±5,36µmol ET/ml et 17,38±4,17µg BE/ml, respectivement), les extraits de tiges de Biskra révèlent une activité intéressante. Cette propriété biologique est en relation étroite avec la structure et/ou la synergie entre les composés phénoliques. Cependant, une résistance fongique de *C. albicans* et *tropicalis* est constatée vis-à-vis des différents extraits, avec des zones d'inhibition n'excèdant pas 12mm. *A. halimus* de Biskra peut être utilisé comme source d'antioxydants naturels, dans différents domaines tels que l'alimentation animale et les applications médicinales.

Mots clés : *Atriplex halimus* L. – Ecotype – Composés phénoliques – Activité antioxydante – Activité antifongique - Champignons dermatophytes.

Abstract

Natural substances, particularly secondary metabolites derived from cultivated and/or spontaneous plants, have multiple interests for Agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries. In this study, chemical methods analysis, spectrophotometry and chromatography (HPLC-DAD) of polyphenols, flavonoids, flavonols and carotenoids contained in the aerial parts of *Atriplex halimus* L. (Leaves and stems) of three Algerian geographical zones (Mazagran, Biskra and Sig) were determined. Complementary, analyses were used to highlight the antioxidant capacities (CAT, DPPH, ABTS and BCB) and antifungal proprieties against *C. albicans* and *C. tropicalis*. Results revealed larger amounts of phenolics in leaf extracts, unlike stems. Significant variation was found between ecotypes; Mazagran leaves and stems extracts are richer in CPT (279.33±1.17 *vs* 68.11±7.76mg GAE/g LE) and TFC (98.19±1.51 *vs* 64.35±0.41mg RE/g LE, respectively). Great concentrations of flavonols and carotenoids were exhibited by Mazagran and Sig leaves extracts, respectively (34.87±1.32mg RE/g LE and 73µg βCE/g LE). However, qualitative analysis (HPLC-DAD) showed twenty-five phenolic compounds including five phenolic acids (four hydroxybenzoic acid and one hydroxycinamic acid) and twenty flavonoids, exclusively present in leaves of all ecotypes. Leaves extracts concentrations exhibited higher antioxidant proprieties than stems. Nevertheless, TAC (122.67±4.13µg AAE/g LE), DPPH, ABTS and BCB tests demonstrated the higher antiradical capacity of Biskra stems extracts (IC_{50}= 497.46±37.53TE µg/mL – 56.75±5.36TE µmol/mL and 17.38±4.17BEµg /mL, respectively). This biological property is narrowly related to the structure and/or synergy between phenolic compounds. However, fungal resistance of *C. albicans* and *tropicalis* was observed; inhibition zones does not exceed 12mm. Biskra *Atriplex halimus* can be used as source of natural antioxidant, in different fields such as animals' food and medicinal applications.

Keywords: *Atriplex halimus* L. – Ecotypes – Phenolic compounds – antioxidant activity, antifangical activity – Dermatophytes fungi.

ملخص

المواد الطبيعية ، ولسيما المستقلبات الثانوية المستمدة من النباتية المزروعة منها أو العفوي ، لها اهتمامات متعددة للصناعات الزراعية الغذائية ومستحضرات التجميل والأدوية. المشروع الدراس تضمن الجمع بين بعض التحليل الكيميائي لتحديد كمية و انواع المركبات الفيلونية ,لفلافونويد، الفلافون ومحتوى كاروتينويد الموجودة في الأجزاء الهوائية لنبتة *A. halimus L.* .(الأوراق والسيقان) لثلاثة مناطق جغرافية جزائرية (مزغران ، بسكرة وسيق) باستعمال التقنية الطيفية وفحص المستخلصات بطرقة (HPLC-DAD). وكذا تم تحديد أنشطة مضادة للأكسدة, من خلال الطرق التالية : القدرة الإجمالية لمضادة للأكسدة (TAC) ,تثبيط جدر DPPH$^{\cdot}$و ABTS$^{\cdot+}$ و قوة تثبيط تبيض بيطا كاروتين (BCB) اضافة لإجراء تحديد نشاط مضادات الميكروبات والفطرية ضد *Candida albicans* و *Candida tropicalis*، اظهرت النتائج غنى مستخلصات الاوراق بالمركبات الفينولية, على عكس السيقان. تم العثور على اختلاف كبير بين الأنماط البيئية. تحتوي مستخلصات أوراق و سيقان مزغران على اكبر كمية من الفينول 279,33±117 مقابل 68,11±7,76 مقابل 68,11±7,76مغ م ح غ/غ م م)و1,51± 98,19 مقابل 64,35 ± 0,41 مغ م ر /غ م م).اضافة الى تسجيل كميات كبيرة من الكاروتينات ومركبات الفلافونول في اوراق كل من مزغران و سيق (1,32±34,87مغ م ر/ غ م م و73µغ م *β*ك/ غ م م).ومع ذلك، اثبت التحليل النوعي (HPLC-DAD) خمسة وعشرين مركبا فينوليا بما في ذلك خمسة الأحماض الفينولية (اربعة احماض الهيدروكسي بنزويك وحمض الهيدروكسي سينامیك) وعشرين فلافونيدات والموجود حصريا في مستخلص كل أوراق دون استثناء. تبين من خلال النتائج ان تركيزات مستخلصات الأوراق اكثر فعالية من السيقان و هدا كمضادة للأكسدة أعلى. ومع ذلك، مثلTAC(ABTS،DPPH) والاختبارات BCB التي برهنة على القدرة الكبير لمستخلصات بسكرة كمضاد لأكسدة و مقارنة مع مضادات الاكسدة النموذجية. ترتب هذه الخاصية الحيوية ارتباطًا وطيدا بالبنية و/أو التفاعل بين المركبات الفينولية. ومع ذلك، لوحظ مقاومة فطرية من طرف *C. albicans* و *C. tropicalis* ؛حيث ان مناطق التثبيط لم تتجاوز 12مم. يمكن استخدام *Atriplex halimus الموجودة في بسكرة* كمصدر لمضادات الأكسدة الطبيعية، في مجالات مختلفة مثل المواد الغذائية الموجهة للحيوانات والتطبيقات الطبية.

الكلمات المفتاحية: *Atriplex halimus* L. - نوع ايكولوجي - المركبات الفينولية - النشاط الحيوي - فطريات جلدية.

Table des matières

Introduction générale **1**

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Composés polyphénoliques **5**

Introduction: **5**

1. Les polyphénols (composés phénoliques) 5

1.1. La biosynthèse des polyphénols 6

1.2. Structures chimiques et Classification des composés phénoliques 7

1.2.1. Les non flavonoïdes 7

a. Les acides phénoliques 7

b. Les stilbènes 8

c. Les Lignanes 8

d. Les coumarines 8

e. Les tanins 9

1.2.2. Les flavonoïdes 10

1.2.2.1. Classification des flavonoïdes 10

1. Les flavones 10

2. Les flavonols 10

3. Les flavanones 11

4. Les flavanes 11

5. Les isoflavonoïdes 11

6. Les anthocyanes 11

1.2.3. Les Caroténoïdes 12

2. Les intérêts biologiques des polyphénols **13**

2.1. Rôle physiologiques chez les végétaux 13

2.2. Rôle technologique 13

2.3. Rôle antioxydant 13

2.3.1. Inhibition des enzymes pro-oxydantes 13

2.3.2. Chélation des ions métalliques 14

2.3.3. Piégeage des radicaux libres 15

2.4. Rôle thérapeutique des polyphénols 16

2.5. Rôle antimicrobien des polyphénols 17

3. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols **18**

3.1. Effet des facteurs externes 18

3.1.1. La lumière 18
3.1.2. La température 18
3.1.3. Les microorganismes pathogènes 18
3.1.4. Les traitements appliqués par l'homme 18
3.1.5. Le stade physiologique 19
3.2. Effet de l'espèce et de la variété 19
Chapitre II: L'*Atriplex halimus* **20**
Introduction **20**
1. Définition de l'*Atriplex halimus* L. 20
2. Systématique de l'espèce 21
3. Répartition géographique de l'espèce 21
4. Description botanique de l'espèce 21
5. Usage de l'*A. halimus* 22
Chapitre III: Les champignons dermatophytes **24**
Introduction 24
1. Origine 24
1.1. Espèces anthropophiles 24
1.2. Espèces zoophiles 25
1.3. Espèces telluriques 25
Chapitre IV: Les Candidoses **26**
1. Candidoses 26
2. Genre *Candida* 26
2.1. *C. albicans* 27
2.2. *C. tropicalis* 28
3. Symptômes des candidoses 29
4. Facteurs favorisants des candidoses 29
5. Traitement 30

Partie II: Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes
1. Objectif **31**
2. Matériel végétal et Préparation de la drogue **31**
3. Méthodes **32**
3.1. Extraction des composés bioactives 32
3.2. Analyse quantitative des molécules bioactives 34

3.2.1. Estimation du rendement d'extraction 34
3.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux (CPT) 34
3.2.3. Quantification des flavonoïdes totaux (FT) 35
3.2.4. Dosage des flavonols totaux (FLT) 35
3.2.5. Quantifications des Caroténoïdes totaux (CT) 35
4. Analyse qualitative des molécules bioactives par CLHP 36
5. Etude *in-vitro* des activités biologiques des extraits de l'*Atriplex halimus* 36
5.1. Potentiel antioxydant 36
5.1.1. Capacité antioxydante totale 37
5.1.2. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH 38
5.1.3. Piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ 39
5.1.4. Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique (BCB)..... 40
6. Activité antifongiques 41
6.1. Pureté des souches et activation des souches fongiques 41
6.2. Préparation des solutions phénoliques 41
6.3. Evaluation de la sensibilité des souches microbiennes *vis-à-vis* des extraits éthanoliques 42
6.3.1. Méthode de diffusion sur Agar-agar (Aromatogramme) 42
6.3.2. Principe de la méthode dite de contact direct 43
7. Analyse statistique des données 44

Chapitre II: Résultats et discussion

Introduction 45
1. Analyse quantitative des molécules bioactives 45
1.1. Aspects, couleurs et rendements des extraits 45
1.2. Teneurs et concentrations des métabolites secondaires (Polyphénols totaux"PT", flavonoides totaux "FT", flavonols totaux "FLT" et les caroténoïdes totaux "CT") 47
1.2.1. Composés phénoliques totaux (CPT**)** 47
1.2.2. Flavonoïdes totaux (FT) 50
1.2.3. Flavonols totaux (FLT) 53
1.3. Caroténoïdes (TCT) 55
2. Identification et analyse qualitative des molécules bioactives par CLHP-DAD 57
3. Les activités biologiques de la drogue *A. halimus* 65
3.1. Potentiel antioxydant des extraits de l'*A. halimus* L. 65

3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT) 66
3.1.2. Activités anti-radicalaires 67
3.1.2.1. Test de piégeage du radicale libre de DPPH 67
3.1.2.2. Test de piégeage du radicale-cation libre d'ABTS 71
3.1.3. Inhibition du blanchiment de ß-catoténe 73
4. Activité antifongique des extraits d'*A. halimus* 77
4.1. Evaluation de la sensibilité de souches fongiques vis-à-vis des extraits hydro-éthanoliques 78
4.1.1. Méthode d'aromatogramme 78
a. *C. albicans* 78
b. C. tropicalis 80
4.1.2. Méthode de contact directe 82
a. *C.albicans* 82
b. C.tropicalis 83

Conclusion et perspectives……. 86

Références bibliographiques 88

Annexe

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure chimique de certaines classes de flavonoïdes 12

Tableau 2 : Activités biologiques de certains composés phénoliques.....17

Tableau 3 : Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d'*A. halimus* 23

Tableau 4 : Espèces pathogènes testées..... 41

Tableau 5 : Aspects, couleurs et rendements des extraits éthanoliques des feuilles et tiges des différents écotypes d'*A. halimus* L. 46

Tableau 6 : Identification des métabolites secondaires des extraits de l'*A. halimus* par la méthode HPLC-DAD..... 63

Tableau 7 : Structures chimiques des molécules bioactives identifiées.....64

Tableau 8 : Relation entre les activités Antioxydantes des différents extraits de l'*A halimus* L. et leurs composés bioactives par le calcule de coefficient de Pearson (r).....67

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique d'un phénol simple 6

Figure 2 : Biosynthèse des polyphénols par voie de Schikimate 6

Figure 3 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe 7

Figure 4 : Structure des acides hydroxybenzoïques et hyroxycinnamiques 7

Figure 5 : Représentation structural des stilbénes 8

Figure 6 : Structure de lignanes 8

Figure 7 : Formation de coumarine 9

Figure 8 : Structure de quelques tannins hydrolysables (a) et tannins condensés (b) 9

Figure 9 : Structure de base de flavonoïde 10

Figure 10 : Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (M^{n+})……. 14

Figure 11 : Propriété réductrice des polyphénols 15

Figure 12 : Caractéristiques structurelles des flavonoïdes avec une activitéde piégeage des radicaux libres élevés 15

Figure 13 : Les différentes morphologies et la croissance de *C.albicans* 28

Figure 14 : Les maladies de candidose 29

Figure 15 : Provenances géographiques de l'*Atriplex halimus* L.. 32

Figure 16 : Protocole d'extraction 33

Figure 17 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire $DPPH^{\bullet}$ et un antioxydant (AO) 38

Figure 18 : Génération du radicale cation $ABTS^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AOH 39

Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 47

Figure 20 : Teneurs (**a_1, a_2, a_3**) des extraits éthanoliques en polyphénols totaux des feuilles et tiges *d'A. halimus*, issus des trois régions algériennes 48

Figure 21 : Concentrations des polyphénols totaux (**b_1, b_2 et b_3**) des extraits des feuilles et tiges *d'A. halimus*, issus des trois régions algériennes 49

Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la Rutine 50

Figure 23 : Teneurs des flavonoïdes totaux **(a_1, a_2 et a_3)** des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes. 51

Figure 24 : Concentrations des flavonoïdes totaux **(b_1, b_2 et b_3)** des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5% (*)]... 52

Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la rutine 52

Figure 26 : Teneurs **(a_1, a_2 et a_3)** des flavonols totaux dans les extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5% (*)]…….. 53

Figure 27 : Concentrations **(b_1, b_2 et b_3)** des flavonols totaux (FLT) dans les extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5% (*)]… 53

Figure 28 : Courbe d'étalonnage de ß-carotène 54

Figure 29 : Teneur (**a_1, a_2 et a_3**) des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algérienne en caroténoïdes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)] 55

Figure 30 : Concentration (**b_1, b_2 et b_3**) des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algérienne en caroténoïdes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)] 55

Figure 31 : Profils phytochimiques des extraits éthanoliques d'*A. halimus* des feuilles et des tiges de Biskra (a, d), de Sig (c, f) et de Mazagran (b, e) par la méthode de chromatographie à haute performance (HPLC-DAD) à 280 nm 60

Figure 32 : Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique 65

Figure 33 : Capacité antioxydante totale des extraits des feuilles(A) et tiges (B) d'*A. halimus*…….. 66

Figure 34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH par Trolox 67

Figure 35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH en fonction des concentrations des extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus* 67

Figure 36 : Réduction des extraits de l'*A halimus* du radicale libre de DPPH (Photo originale) 68

Figures 37 : Valeurs de CI_{50} des extraits de l'*A. halimus* et du trolox par le piégeage du radicale libre du DPPH (p=0) 69

Figure 38 : Réduction des extraits de l'*A. halimus* et de trolox du radicale libre de $ABTS^{\bullet}$ (Photo originale).....70

Figure 39 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre de l'$ABTS^{+\bullet}$ en fonction des concentrationsdes extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus* 71

Figure 40 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre de l'$ABTS^{+\bullet}$ par le standard trolox 71

Figure 41 : Valeurs de CI_{50} des extraits de l'*A. halimus* et du trolox par le piégeage du radicale libre de l'ABTS (p>0.05).....72

Figure 42 : Pourcentage d'inhibition de blanchiment de ß-carotène par la BHT.....73

Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de blanchiment de ß-carotène en fonction des concentrations des extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus*.....73

Figure 44 : Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-éthanoliques de l'*A. halimus* L. et du BHT vis-à-vis le blanchiment du ß-carotène (p<0.05).....74

Figure 45 : Groupes fonctionnels de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes 76

Figure 46 : Caractère morphologique d'identification du genre *Candida*.....78

Figure 47 : Effet des extraits des feuilles (A) et des tiges (B) des trois provenances de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode d'aromatogramme (p=0).....79

Figure 48 : Effet des extraits de l'*Atriplex halimus* sur la croissance de *Candida albicans* 79

Figure 49 : Effet d'amphotéricinne *B* sur la croissance de *Candida albicans* 80

Figure 50 : Effet des extraits des feuilles (A) et des tiges (B) des trois provenances de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode d'aromatogramme (p=0).....80

Figure 51 : Effet des extraits de l'*Atriplex halimus* sur la croissance de *Candida tropicalis* (Photo originale).....81

Figure 52 : Effet Amphotéricine *B* sur la croissance de *Candida tropicalis*.....81

Figure 53: Effet des extraits des feuilles (a_1, a_2) et des tiges (b_1, b_2) de l'*A.halimus* sur la croissance de *Candida albicans* par la méthode de contact direct 83

Figure 54 : Effet des extraits éthanoliques des feuilles (a_1, a_2) et des tiges (b_1, b_2) de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode de contact direct (p=0).....84

Liste des abréviations

HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector
DPPH	2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyl
ABTS	Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
CAT	Capacité antioxydante totale
BCB	Blanchiment du ß-carotène
BHT	Dibutylhydroxytoluène
CI	Concentration inhibitrice
N	Nord
O	Ouest
S	Sud
mm	Millimètre
m	Métre
° C	Degré celsus
T°	Température
g	Gramme
v	Volume
DO	Densité optique
nm	Nanomètre
H	Heure
min	Minute
ml	Millilitre
µl	Microllitre
DI	Diamètre interne
Å	Angstrom
%	Pourcentage
C	Concentration
mg EAG/g LE	Milligramme équivalent acide Gallique par gramme d'extraits lyophilisé
mg EAG/g MS	Milligramme équivalent acide Gallique par gramme de matière sèche
mg ER/g LE	Milligramme équivalent acide rutine par gramme d'extraits lyophilisé
mg ER/g MS	Milligramme équivalent rutine par gramme de matière sèche
mg EβC/g EL	Milligramme équivalent béta carotène par gramme d'extraits lyophilisé
mg EβC/g MS	Milligramme équivalent béta carotène par gramme de matière sèche
mg EAA/g EL	Milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extraits lyophilisé
µg ET/ml	Microgramme équivalent trolox par millilitre
ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unités formant colonies
tpm	Tours par minute
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
TBis	Tige biskra
FBis	Feuille Biskra
TMaz	Tiges Mazanran
FMaz	Feuilles Mazagran
TMaz	Tiges mazagran
FSig	Feuille Sig
TSig	Tige Sig
OMS	Organisation mondiale de la santé

Introduction générale

Introduction générale

Les végétaux supérieurs constituent des éléments vitaux de la diversité biologique, ils servent essentiellement au bien être humain et constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurales en Afrique, plus de 80% de cette population s'en sert pour assurer leurs soins de santé (Jiofack et *al*., 2010). En dehors des plantes cultivées, plusieurs plantes sauvages peu connues, revêtent une grande importance culturelle et un fort potentiel économique pour la nutrition, l'alimentation des bétails (Prache et *al.,* 2011) et les applications phytothérapeutiques (Bouzouina et *al.,* 2016), en raison de leur bioactivité puissante et de leur toxicité relativement faible (Kontogianni *et al.,* 2013). En Algérie, les industries pharmaceutiques, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médicine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi que, les principes actifs sont étudiés depuis plusieurs années (Maizak et *al.*, 1993).

Au cours de la dernière décennie, la recherche de composés phytochimiques des plantes indigènes et intéressant, les industries pharmaceutiques, cosmétiques et nutritionnelles a suscité un regain d'intérêt (Wangensteen et *al.*, 2004). Il s'agit des métabolites secondaires notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et coumarines) (Khadhri, 2013), ces composés possèdent une forte activité biologique ; antibactériennes, anti-cancérigène, anti-inflammatoire et antioxydante dépassant celles de nombreux antioxydants synthétiques (hydroxyanisol butyle (BHA), le butylhydroxytoluene (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ) pouvant avoir une activité possible en tant que promoteurs de la cancérogenèse (Berrougui et *al.*, 2006).

En outre, les antioxydants jouent un rôle protecteur contre les stress biotique et abiotique (stress oxydatif), qui entraînent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que le $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet 1}$ et le O_3 (Chaouche et *al*., 2013b; Mittler , 2002). Ces derniers provoquent des dommages oxydatifs sur les biomolécules cellulaires comme les molécules de lipides, protéines, ARN et ADN et peuvent même conduire à la destruction oxydative des cellules dans un processus appelé stress oxydatif (Mittler, 2002), qui affecte la qualité des produits et la santé animale (Durand et *al.,* 2013). Ce mécanisme est atténué dans les cellules par un grand nombre de protéines détoxifiantes des ERO (par exemple, la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate-peroxydase (APX), la catalase (CAT), la glutathion-peroxydase (GPX) et la peroxiredoxine (PRX), ainsi que par antioxydant comme l'acide ascorbique et le glutathion (GSH), composés phénoliques, alcaloïdes, acides aminés non protéiques et α-tocophérols présents dans presque tous les compartiments subcellulaires (Nuutila et *al*., 2003).

Dans les cellules, les ERO jouent un rôle de signalisation dans de nombreux systèmes biologiques et contrôlent des processus tels que la croissance, la réponse au développement biotique et abiotique, des stimuli environnementaux et des programmations cellulaire, comme ils jouent un rôle vital dans le maintien de la santé humaine (Hancock, 2001), bien que la production incontrôlée de ERO et le mécanisme déséquilibré du système de protection des antioxydants peuvent entraîner de nombreuses maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires et le processus du vieillissement (Chaouche et *al.*, 2013b). A l'égard de diverses maladies citées précédemment, les maladies dermiques causées par les infections fongiques ont considérablement augmenté ces dernières années et sont devenues aujourd'hui une préoccupation importante pour les établissements de soins. Les traitements antifongiques (anti-candidose), qu'ils soient de nature physique (exemple de retrait du cathéter infecté) ou pharmacologique, ne sont pas toujours couronnés de succès. Une multitude de facteurs, particulièrement l'utilisation anarchique, inadéquate et abusive des antibiotiques en santé humaine et animale provoquent la formation du ou des mycètes causant des infections invasives ce qui explique l'échec clinique d'un traitement antifongique. Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe à cause de l'émergence de bactéries, et en particulier de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels tel que les levures du genre *candida* (*C. albicans* et *C. tropicalis*), induisant de graves infections dermiques à cause de leurs dimorphismes (Arnaud et *al.*, 2009) qui lui confère une résistance non seulement aux conditions abiotiques, mais aussi aux différents traitements chimiques. Ces agents infectieux multi-résistants sont néfastes surtout chez les sujets vulnérables tels que les enfants, les vieillards et les personnes immunodéprimées. La problématique de résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques à trouver de nouveaux agents antimicrobiens naturels en se référant aux plantes utilisées dans le traitement des maladies infectieuses en médecine traditionnelle.

En Algérie, des scientifiques ont entrepris de valoriser les espèces végétales et plus spécifiquement les espèces du sud, y compris le genre *Atriplex* où plusieurs études ont signalé leurs propriétés biologiques (Said et *al.*, 2007).

Atriplex halimus L. est une espèce algérienne communément appelée «Guettaf», xérohalophyte et nitrophile appartenant à la famille des Amaranthaceae. Elle est autochtone, poussant sur un large éventail de sols et largement répandue dans les zones algériennes (Aouissat et *al*., 2011), et décrite comme un hyperaccumulateur métallique (Lotmani et *al.*, 2011a ; Mesnoua et *al.*, 2016). Cette plante est souvent cultivée comme plante fourragère car elle tolère les conditions de sécheresse sévères et peut pousser dans des sols très alcalins et salins (Talamali et *al*., 2001a). *A. halimus* est

aussi connus pour ses intérêts économiques; elle a la propriété de produire une biomasse foliaire abondante même pendant des périodes défavorables de l'année (Kessler, 1990), avec une bonne valeur nutritive (Stringi, 1991; Abdelguerif, 2004). Elle peut également contribuer à la valorisation et à l'amélioration des sols marginaux et dégradés ainsi, l'amélioration des productions végétales et animales dans plusieurs zones steppiques (Le Houérou, 1992).

En médecine traditionnelle, le cocktail de minéraux d'*A. halimus* a un effet antidiabétique et réduit les maladies cardiaques (Chikhi et *al*., 2014). En outre, cette espèce de salière est également utilisée dans le traitement de l'anémie et des rhumatismes (Aouissat *et al.*, 2011), ainsi, les infections urinaires et la lithiase (Emam, 2011). En plus, l'effet de contrôle des parasites dans les essais vétérinaires (Bayoumi et El-Shaer, 1992) et des activités antimicrobiennes contre diverses bactéries pathogènes à Gram positif et négatif. (Abd El-Rahman et *al.*, 2006).

Dans ce contexte, cette étude se focalise dans l'évaluation *in-vitro* du potentiel antioxydant et antifongique toutes en recherchant de nouvelles composées phytochimiques dans les extraits éthanoliques de deux parties aériennes (feuilles et tiges) de l'*A. halimus* issus du Sud (Biskra "El-Outaya") et de l'ouest Algériens (Mostaganem "Mazagran "; Mascara "Sig"), qui peuvent avoir la capacité de substituer les antioxydants et les antifongiques de synthèses avec la spécification de l'organe végétale et son provenance. Le manque d'information de la nature chimique et/ou biologique explique le choix de cette espèce spontanée de ces zones géographiques Algériennes.

Pour répondre aux objectifs fixés à ce travail, trois parties distinguées ont été abordées :

La première partie est portée sur une synthèse bibliographique, sur la classification et les intérêts des composés polyphénoliques, les antioxydants et la plante étudiée, ainsi, qu'un aperçue sur les champignons dermathophytes et les candidoses, particuliérement causés par des levures du genre C*andida (C. albicans et C. tropicals*).

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, avec la présentation de technique d'extraction ainsi que le procédé de préparation des échantillons, la détermination des teneurs et concentrations en composés polyphénoliques (Polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux et les caroténoïdes totaux) présent dans les différents extraits de la plante testée à l'aide des dosages spectrophotométriques. Cette étude quantitative est complétée par une étude qualitative mettant en œuvre la technique d'analyse de haute performance liquide en phase inverse, couplé à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD, High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector. Ainsi, qu'à l'évaluation des pouvoirs antioxydants par l'application de quatre tests différents : Capacité antioxydante totale accompagnée par les tests anti-radicalaires (DPPH, ABTS), et le teste de capacité de blanchiment de β-carotène ensuite. Tous les extraits testés ont subi une étude

de leur activité antifongique contre les souches des levures choisies, en mesurant leurs pouvoirs inhibiteurs de croissance par deux méthodes (diffusion sur gélose et contact direct).

La troisième partie est consacrée aux résultats et discussion où elle comporte: les calculs du rendement des extraits des deux parties aériennes des trois écotypes de l'*A. halimus*, suivi par l'étude des teneurs en composés phénoliques des extraits hydro-éthanoliques. Cette dernière est complétée par l'identification des biomolécules par l'analyse CLHP-DAD contenus dans les différents extraits de l'*A. halimus*. Et enfin, l'évaluation des activités antioxydantes et antifongiques des six extraits hydro-éthanoliques afin de sélectionner l'organe et l'écotype les plus prometteurs.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

Synthèse bibliographique

Chapitre I
Composés polyphénoliques

Chapitre I: Les composés polyphénoliques

Introduction

Le règne végétal constitue, depuis l'aube des temps, une source naturelle incontournable de micro-constituants bioactifs issus de leur métabolisme secondaire avec des groupes chimique variés tels les alcaloïdes, les composés terpéniques et en plus particulier les polyphénols ou les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes…). Ces derniers constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux et ils sont répartis dans toutes les parties végétales ; racines, écorces, tiges, feuilles, fruits et fleurs…etc (Boudjouref, 2011).

Ces corps naturels jouent un rôle physiologique dans le développement, la protection des plantes contre les agressions environnementales ainsi que dans la défense vis-à-vis les prédateurs et les agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les moisissures...etc (Zem et Fernandez, 2005) et également, la pigmentation des fleurs et des fruits (Macheïx et *al*., 2005).

A la différence des métabolites primaires des végétaux supérieurs (protéines, glucides et lipides), les métabolites secondaires sont bio-synthétisés suite au stress biotique et/ou abiotique et engendrent des propriétés biologiques sur d'autres organismes, d'où leurs importances dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agronomique ainsi que l'agroalimentaire (Guignard, 2006).

1. Les polyphénols (composés phénoliques)

Polyphénols appelés aussi les composés phénoliques sont des molécules spécifiques du règne végétal issu du métabolisme secondaire désigné auparavant par le tanin végétal (Ragan et Glombitza, 1986). Deux définitions ont été citées par Buchanan et *al*. (2000) et rapportées par Ghnimi, 2015. Il s'agit en premier lieu d'une structure moléculaire qui porte plusieurs groupements phénoliques tandis que la deuxième montre la présence d'un groupement phénol polyhydroxylé (Fig. 1). Ils renferment environ huit mille composés phytochimiques naturels non azotés qui ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Lobstein, 2010 ; Boudjouref, 2011) et selon Macheix et *al.* (2006) ; Spencer et *al*. (2008), cette grande variété structurale se distingues par la complexité du squelette initial, depuis les molécules simples (acides phénoliques simples : C_6) vers des molécules plus hautement polymérisées (tanins condensés :(C_6-C_3-C_6)$_n$), le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation…) ainsi, les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques).

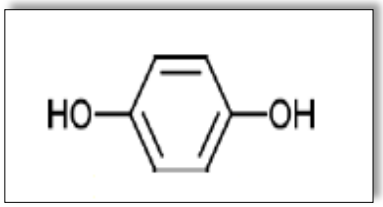


Figure 1. La structure chimique d'un phénol simple (Scalbert et Williamson**,** 2000).

1.1. La biosynthèse des polyphénols

Deux voix métaboliques principales sont à l'origine de la biosynthèse de ces métabolites secondaires à savoir ; la voie du schikimate et la voie des polycétates.

- **La voie du Schikimate** (Fig.2).

Cette voie aboutit à la génération des composés aromatiques, des acides cinnamiques et à leurs dérivés comme les acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignine à partir de l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate qui sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables, les flavonoïdes et tannins condensés (Dewick, 1995; Knaggs, 2003).

- **La voie des polycétate**

Ce mécanisme de biosynthèse aboutit à la formation des composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Livermore, 2002) par cyclisation des chaines polycétonique telles que (dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones) issus de condensation répétée d'unités « Acétates », qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA obtenue par la glycolyse et la β-oxydation (Bruneton, 1999; Naczk et Shahidi, 2004).

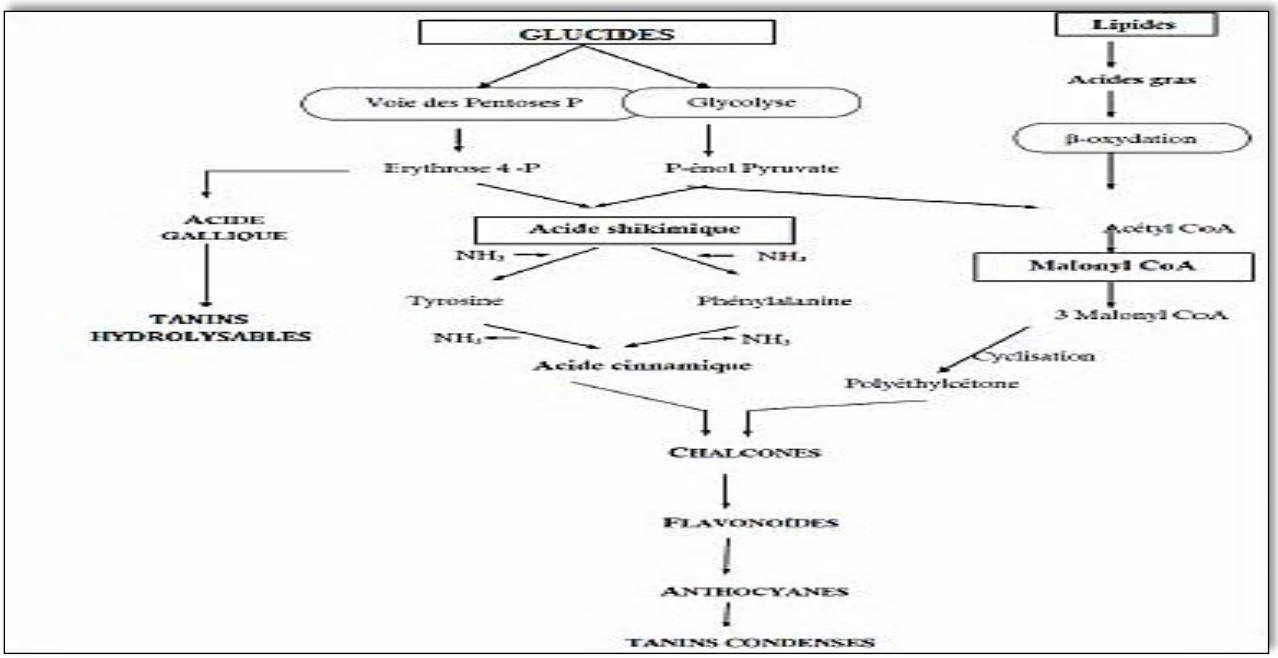


Figure 2. Biosynthèse des polyphénols par voie de Schikimate (Richter, 1993).

1.2. Structures chimiques et Classification des composés phénoliques

Les polyphénols (Fig.3) peuvent être distribués en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes (Corona, 2011).

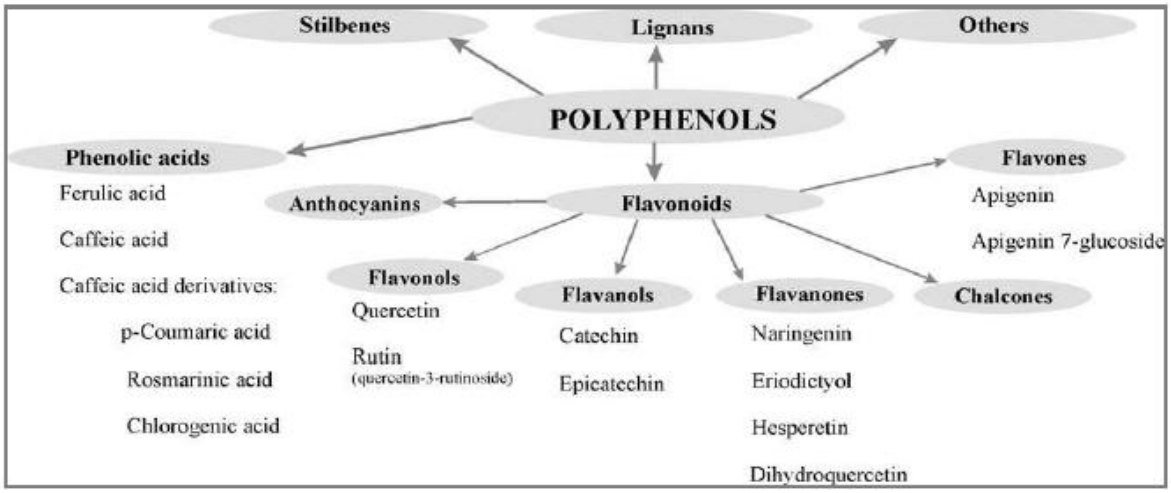


Figure 3. Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe (Boros et *al*., 2010).

1.2.1. Les non flavonoïdes

Cette classe contient plusieurs composés chimiques, parmi lesquels : les acides phénoliques, les stilbènes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones.

a. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques (C_6-C_1 ou C_6-C_3) sont des dérivés des acides benzoïques et cinnamiques tels que, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide férulique et l'acide gallique (Fig. 2) (Bruneton, 1993 ; Hale, 2003) avec des pouvoirs antioxydants, de chélation et anti-inflammatoire. D'après Psotová et *al*. (2003), ces constituants phytochimiques se caractérisent par leurs faibles voir leurs non toxicités (Fig. 4).

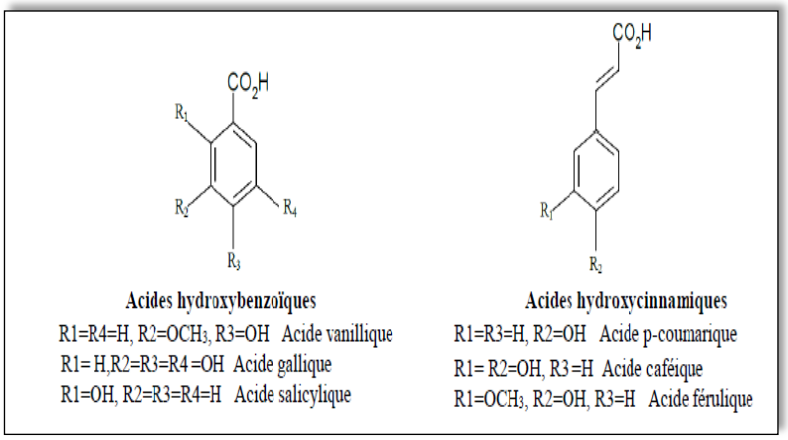


Figure 4. Structure des acides hydroxybenzoïques et hyroxycinnamiques (Macheix et *al.*, 2005).

b. Les stilbènes

Les stilbènes (C_6-C_2-C_6) caractérisés par une structure ayant un noyau 1,2-diphényléthylène avec des groupements hydroxyles substitués sur les cycles aromatiques et existent sous forme de monomères ou d'oligomères. Ces molécules sont présentes dans notre alimentation en petite quantité. Le plus connu d'entre eux est le trans-resvératrol, possédant un squelette trihydroxystilbène dont leur propriété anticancéreuse a été prouvé par des études scientifiques sur les plantes médicinales (Han et *al*., 2007 ; kundu, 2008) (Fig. 5).

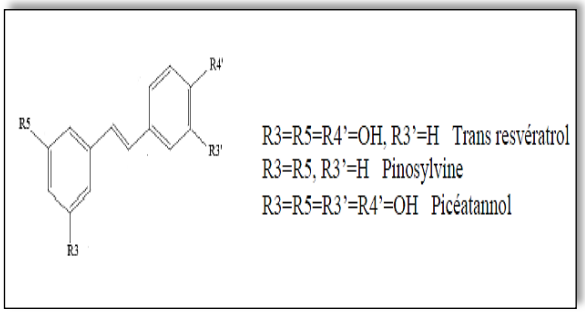


Figure 5. Représentation structural des stilbénes (Para, 2013).

c. Lignanes

Les lignanes $(C_6\text{-}C_3)^2$ sont formés par la polymérisation dans la position huit de deux molécules de phénylpropane (C_6-C_3). Ils sont présents dans la plante sous forme de glucosides (El Gharras, 2009), et interviens dans son système de défense (Puupponen-Pimiä, 2005).

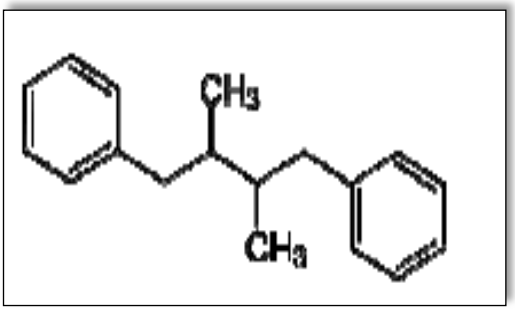


Figure 6. Structure de lignanes (Scalbert et Williamson**,** 2000).

d. Les coumarines

Ces composés phénoliques, à structures variables sont aussi les dérivés de C_6-C_3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo-α-pyrone **(**O'Kennedy et Thornes, 1997) où plus de 1000 composés coumariques sont isolés à partir des plantes et des micro-organismes (Sakagami et *al.,* 2005) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle (Fig. 7). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres, comme ils jouent un rôle dans la prévention de la péroxidation des lipides membranaires ainsi que le piégeage des radicaux hydroxyles, superoxydes et péroxyles (Anderson et *al*., 1996).

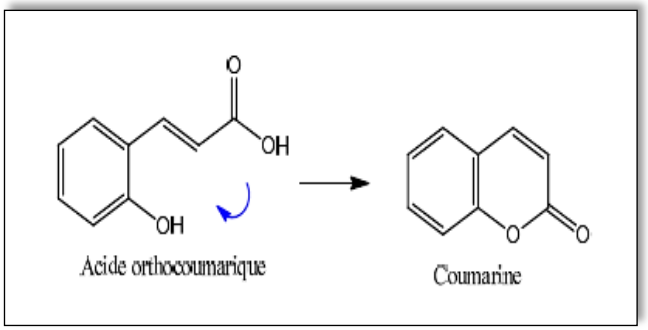


Figure 7. Formation de coumarine (Anderson et *al*., 1996).

e. Les tanins

Les tannins (Fig. 8) ou tanins $(C_{15})_n$ sont des composés phénoliques complexes hydrosolubles avec un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (Frutos et *al.*, 2004) et se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines, alcaloïdes, acides nucléiques et les glucides, ce qui est due à leur teneur en groupements hydroxyles. Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées à ces poyphénols et essentiellement le pouvoir antioxydant par une grande capacité de piéger les radicaux libres et aussi dans l'inactivation des ions pro-oxydants grâce au noyau phénol (Bruneton, 1999 ; Frutos et *al.*, 2004). En effet, ils présentent des activités antibactérienne, antifongique et antivirale assez importantes (Chung et *al*., 1998). Ils sont très répandus dans le règne végétal, particulièrement dans certaines familles comme les rosacée, les conifères et les fagacées (Kamra et *al.*, 2006). Deux groupes de tanins ont été identifiés selon la nature de l'acide phénolique et le type de liaisons: tannins hydrolysables et tannins condensés (Rira, 2006).

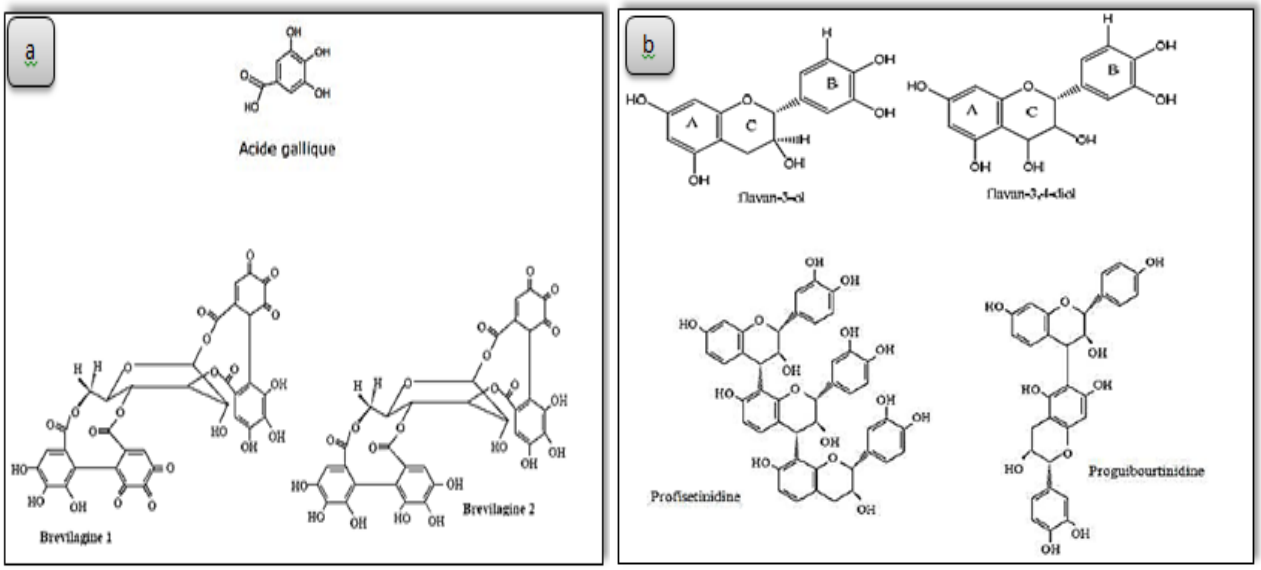


Figure 8. Structure de quelques tannins hydrolysables (a) et tannins condensés (b) (Doat, 1978)

1.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques naturels qui sont responsables de la pigmentation de différents organes végétaux (colorations jaune, orange et rouge) (Boukri, 2014), en dehors de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (Wilson, 1987). A l'état naturel, ils existent le plus souvent sous forme d'hétérosides (les flavonosides). Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C_6-C_3-C_6), correspond à deux unités C_6 (cycles A et B) de nature phénolique. En raison du profil d'hydroxylation et des variations du cycle C qui est un hétérocycle pyranique (Fig.9), les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous-groupes tels que: les flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavones et anthocyanines, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Dai et Mumper, 2010 ; Tsao, 2010).

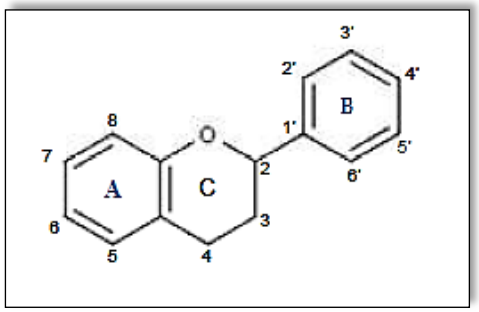


Figure 9. Structure de base de flavonoïde (Dacosta, 2003).

1.2.2.1. Classification des flavonoïdes

Comme il est représenté dans le tableau ci-dessous, plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation, de méthoxylation et de polymérisation du noyau pyranique central ainsi que la nature et la substitution portés sur le cycle C (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006 ; Lobestein, 2010).

1) Les flavones

Les flavones sont très rencontrés dans les plantes supérieures, ils se trouvent sous les deux formes aglycones ou glycosylées, caractérisés par la même structure de base de flavonoïdes avec une liaison instaurée en position C_2-C_3 avec une fonction cétone tels que l'apigénine, Chrysine (Kim, 2004**)**. Certains sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Selon Stafford (1990), ces composés sont caractérisés par leurs activités physiologiques remarquables, spécialement leurs propriétés antimicrobienne et antivirale.

2) Les flavonols

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C tels que le kaempférol, la quercetine et la rutine qui sont les composants les

plus représentatifs de cette famille. Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu et *al.*, 2012).

3) Les flavanones

Ces constituants se définie par une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'instauration au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont généralement rencontrés chez les espèces Myrtacées (Wollenweber et *al.*, 2000). Cependant, l'alimentation représente une source de ces composant comme il est le cas des tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes qui se caractérisent par la présence d'un grand pourcentage des flavanones. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron ((Lobestein, 2010).

4) Les flavanes

Ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé et qui n'ont pas de fonction cétone. Les flavanes sont répondus dans les écorces des végétaux. Ces composés sont connus sous forme de monomères ou polymères exemple de la catéchine qui existe dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé qui sont les principales sources de ce composé ((Jakupovic et *al*., 1988, Castaneda-ovando et *al.*, 2009).

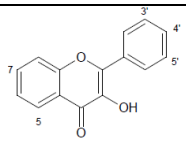
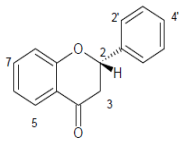
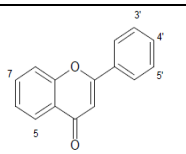
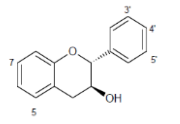
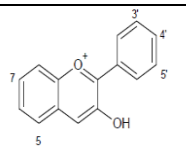
5) Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes se distinguent des flavonoïdes par la position C_3 sur l'hétérocycle pyranique central C du noyau aromatique B. Ce sont des composés à 15 atomes de carbones comme les flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2- diphénylpropane (Schwarz et *al*., 2007). Les isoflavonoïdes se trouvent essentiellement chez les fabacées ou les légumineuses (Dewick, 1993). Ces composés sont classés en fonction du degré d'oxydation et de l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires. On trouve aussi, les isoflavones, les isoflavanones, les Isoflavanols, les isoflavanes, les roténoïdes, les ptérocarpanes, les coumaranochromones et les 3-arylcoumarines (Iwashina, 2000).

6) Les anthocyanes

Ce sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C (Tab.1). Ce sont des pigments vacuolaires de couleur rouge, violet et bleu (Kim et *al.*, 2004). Les anthocyanes les plus connus sont la pélargonidine et cyanidine responsables de la couleur rouge ou orangé et rose chez certaines plantes suivi par la delphinidine responsable de la coloration mauve (Heller et Forkmann, 1993). Ces pigments interviennent directement dans les interactions plantes animaux et surtout dans l'attraction des pollinisateurs par la couleur des fleurs (Buchanan et *al*., 2000).

Tableau 1. Structure chimique de certaines classes de flavonoïdes (Heim et *al.*, 2002 ; Kim et *al.*, 2004).

Classes	**Structure générale**	**Flavonoïdes typiques**	**Substituants**					
Flavonols			5	6	7	3’	4’	5’
3-hydroxy-2-phénylchromen-4-on		Kamphérole	OH	H	OH	H	OH	H
		Myricétine	OH	H	OH	OH	OH	OH
		Quercétine	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavanones			5	6	7	3’	4’	5’
2,3-dihydro-2 phenylchromen-4-one		Eriodictyol	OH	H	OH	OH	OH	H
		Hesperitine	OH	H	OH	OH	OH	H
		Naringénine	OH	H	OH	H	OH	H
flavones			5	6	7	3’	4’	5’
2-phénylchromen-4-one		Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
		Chrysine	H	H	OH	H	H	H
		Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavanonoles			5	6	7	3’	4’	5’
3-hydroxy-2,3-dihydro2-phénylchromen-4-		Catéchine	OH	H	OH	OH	OH	H
		Gallocatéchine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Anthocyanes			3	5	7	3’	4’	5’
		Pelargonidine	OH	OH	OH	H	OH	H
		Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	H
		Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH

1.2.3. Les Caroténoïdes

Ce sont des pigments photosynthétiques d’apparence orangée ou jaune, liposolubles, appartenant à la famille des terpénoïdes en C_{40} qui possèdent à un chromophore avec au moins dix doubles liaisons (Lichtenthaler, 1987 ; Rouessac, 2004**)**. Deux grandes classes de caroténoïdes ont étés identifiés : les carotènes uniquement composés de carbone et d’hydrogène avec deux forme différentes de carotène (ά et ß) également appeler provitamines A et les xanthophylles qui sont synthétisés à partir des carotènes et possèdent en plus, des atomes d’oxygène comme la lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, anthéraxanthine et néoxanthine). Il apparaît que les légumes verts à feuilles font partie des aliments contenant le plus de caroténoïdes, le cresson étant le plus riche en ß-carotène, le persil et les épinards sont aussi considéré comme, une source importante de ß -carotène

et de lutéine. Cependant, la lycopène et ses dérivés sont les pigments les plus abondantes dans la tomate, la concentration en caroténoïdes est influencée par plusieurs facteurs : les variétés, le climat et le degré de maturation des fruits (Bruggisser, 2002). L'introduction d'une fonction hydroxyle dans le ά -carotène permet la formation de lutéine, alors que le ß-carotène est le précurseur de la zéaxanthine, la violaxanthine, et l'anthéraxanthine. Ce mécanisme est à l'origine de leurs propriétés anti-oxydantes (Hyardin, 2008). Fréquemment, les caroténoïdes interagissent avec les radicaux libres ($ROO^{\bullet}$, $R^{\bullet}$) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (El-Agamey et *al*., 2004). Ainsi, la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure lui accorde cette propriété biologique**.**

2. Les intérêts biologiques des polyphénols

2.1. Rôle physiologiques chez les végétaux

Les plantes contiennent une grande variété de dérivés phénoliques. Ces substances seraient associer aux nombreux processus physiologiques (Contreras-Calderón, 2011): la croissance, la pigmentation, la reproduction des plantes, la différenciation, l'organogenèse, la dormance des bourgeons, la floraison, la tubérisation et la résistance aux pathogènes (les bactéries et les champignons) et les prédateurs (les insectes) dont ils réagies comme des antibiotiques et des pesticides. Cette dernière est en fonction de la teneur en métabolites secondaires (Alibert et *al*., 1977 ; Butler, 1982 ; Bahorun, 1997 ; Bhooshan Pandey *et al*., 2009). Ils sont susceptibles de protéger les tissus végétaux contre les effets nocifs des rayonnements UV. Ils sont également responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des feuilles (Hadi, 2004).

2.2. Rôle technologique

Les polyphénols contribuent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits mûrs, ils attribuent aux fruits et légumes leurs teinte rouge ou bleuté, ils sont aussi responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de leurs teneurs (Lugasi et *al*., 2003).

2.3. Rôle antioxydant

Ces dernières décennies, plusieurs travaux scientifiques sur les polyphénols ont été publiés pour informer et sensibiliser les consommateurs et les pouvoirs publics sur l'intérêt des fruits et des légumes riches en polyphénols ; source naturel d'antioxydants. Ces molécules sont reconnu par leurs considérable potentiels antioxydants qui est en relation direct avec la santé humaine (Bouayed et *al*., 2008). Ces polyphénols peuvent agir par autres mécanismes d'actions :

2.3.1. Inhibition des enzymes pro-oxydantes

Les polyphénols inhibent une grande variété d'enzymes. Cos et *al*. (1998) établissent les relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité d'inhibition d'enzymes dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monoxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase) (Ghedira, 2005).

2.3.2. Chélation des ions métalliques

Les ions fer et cuivre sont fondamentaux pour de nombreuses activités physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant tels que les ions de fer et de cuivre dans la biosynthèse de la catalase et du superoxyde dismutase, respectivement. Cependant, l'autoxydation en précense des ions Fe^{+2} et Cu^{+2} comme catalyseurs favorisent la production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène qui sont régénérés par la réaction de Fonten.

$$\mathbf{H_2O_2 + Fe^{2+}\ (Cu^{+}) \longrightarrow\ \bullet OH + {-}OH + Fe^{3+}\ (Cu^{2+})}$$

Les plantes et les aliments sont reconnus comme des bons chélateurs des ions métalliques à cause leurs richesses en une large gamme de polyphénols. La complexassions des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leurs bandes d'absorption dans le domaine UV-Visible. L'étude élaborée par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques qui sont: (a) les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, (b) les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxy (Fig.10). Ainsi, la quercetine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace.

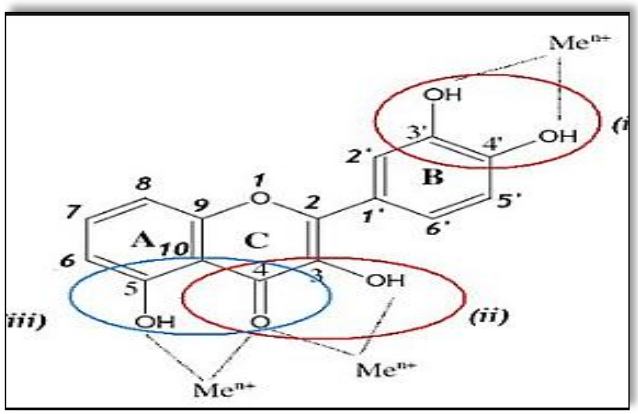


Figure 10. Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}) (Van Acker et *al.*, 1996).

2.3.3. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux (Fig.11) par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante, ces molécules réagissent selon le mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin par un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées (Portes, 2008).

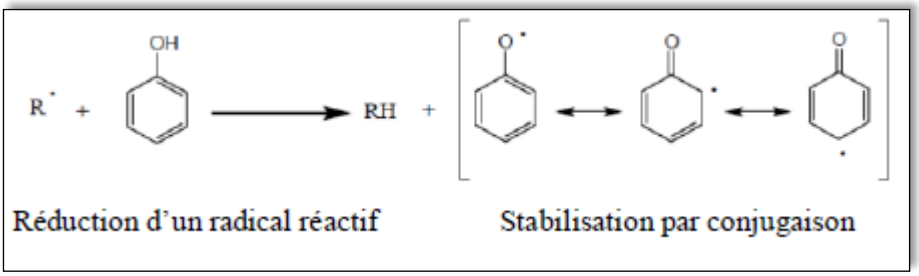


Figure 11 : Propriété réductrice des polyphénols (Portes, 2008).

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonnance (Dai et Mumper, 2010).

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols, en particulier (Fig.12), sont de bons piégeurs de radical libre qui lui donne des propriétés Antioxydantes (Fraga, 2007), attribuée à la présence de 3',4'-dihydroxy sur le noyau aromatique B et de 3-OH du cycle C. La présence de double liaison C_2-C_3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B qui améliore encore l'activité antiradicalaire (Amić et *al.*,2003 ; Khazai et *al.*, 2011).

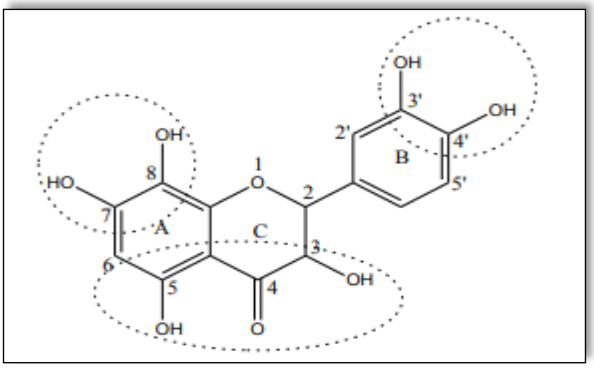


Figure 12. Caractéristiques structurelles des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevées.

2.4. Rôle thérapeutique des polyphénols

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et aussi vis-à-vis de leurs propriétés antioxydantes et plus particulièrement des flavonoïdes.

Les travaux de Fuchs (1998) ont montré l'importance des polyphénols dans la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par les rayons solaires, ce qui explique l'application de ces composés dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (Menaa *et al*., 2014). Ainsi, les polyphénols et en particulier les flavonoïdes comme les xanthones, la quercetine, la gossypetine, la myricetine et l'epicatechin-3-gallate ont été révélés comme des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholenestérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Brühlmann *et al*., 2004). Ces produits naturels agissent en inhibant l'AchE ce qui va corriger le déficit de l'acétylcholine et améliore son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du niveau de l'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (Heinrich et Theoh, 2004).

L'effet hypercholestérolémie et le traitement des affections hépatiques de ces molécules bioactives ont été aussi prouvé par les études de Huang et Lin (2012), l'action antiallergique (Martin et *al.,* 1994) par inhibition des enzymes qui favorisent la libération de l'histamine à partir des cellules impliquées dans les réponses immunitaires: les mastocytes et les basophiles. Les activités anti-inflammatoire (Sakurai et *al*., 2010) et antivirale et en particulier anti-HIV (Liu *et al*., 2005) sont encore attribuées aux composés phénoliques. Ils agissent aussi comme : agents ulcérogènes, hypoglycémiants et hypotriglycéridémiants (Chaudhry et *al*., 1983), l'effet anticancéreux est également montré par Babar Ali et *al*. (2007). Les effets biologiques de quelques métabolites secondaires sont récapitulé dans le tableau 2.

Tableau 2. Activités biologiques de certains composés phénoliques (Chaouche, 2014).

Composés phénoliques	**Activités biologiques**	**Références**
Acides phénols	Antiparasitaire, antifongiques, antioxydantes, antibactériennes, anti-ulcéres	Flores et *al.*, 2009, Kim et *al.*, 2010
Coumarines	Analgésiques, anti-inflamatoires, protectrices vasculaires, antiparasitaires, anticœdèmeuses, antitumoral, soin des hémorroïdes et des varices.	Ito *et al.*, 2005 Smyth et *al.*, 2009
Flavonoïdes	Antitumorales, anticarcinogénes, antioxydantes, anti-inflamatoires, antiparasitaires, antivirales, antibactériennes,antiallergfiques, antithrombique, antiatherogéniques, hypotenseurs, analgésiques, ostéogéne, diurétiques.	Freadman et *al.*, 2006 Cushnie et *al.*, 2007 Batovska et *al.*, 2009
Anthocyanes	Protectrice capillaro-veineux, antioxydant	Bruneton et *al*., 2009
Tanins condensés	Effets stabilisants sur la collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques, anti-inflammatoires	Maquelier et *al.*, 1979 Zhou et *al*., 2011
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes, antimicrobiens, antiviraux, anti-inflammatoires, hypoglycémiants	Okamura et *al.*, 1993 Kubata et *al.*, 2005
Lignanes	Anti-inflamatoire, analgésique	Kim et *al*., 2009

2.5. Rôle antimicrobien des polyphénols

L'étude sur les nouveaux principes actifs, ont fondé des explications sur certaines utilisations traditionnelles des plantes. Une grande diversité de structures chimiques, ayant des activités antimicrobiennes potentielles ont étés identifiées, dans le but de lutter contre le phénomène d'apparition de résistances à l'usage fréquent des antibiotiques (Ferrazzano et *al*., 2011 ; Daglia, 2012; Haddouchi et *al*., 2013).

Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions: le premier consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (Wu et *al*., 2013). Tandis que le deuxième provoque l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (Tsuchiya et Linuma, 2000).

3. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

3.1. Effet des facteurs externes

Le métabolisme secondaire (phénoliques) est particulièrement sensible à l'action des facteurs externes comme la lumière, la température, les microorganismes pathogènes et les traitements appliqués par l'homme (Dinelli et *al*., 2006).

3.1.1. La lumière

L'importance de la lumière (spectre visible mais aussi UV contenus dans le rayonnement solaire) sur l'accumulation des anthocyanes se résume par l'intervention de deux paramètres: d'une part l'intensité du flux lumineux et d'autre part la nature des radiations constitutives. Elle agit directement, par l'intermédiaire des radiations bleues et rouges et du pigment végétal phytochrome sur l'activation du promoteur des gènes phénylalanine ammonia lyase (*PAL*), ce qui se traduit alors par la transcription des ARNm puis la formation de la protéine enzymatique (enzyme du métabolisme) (Hahlbrock et *al*., 1995).

3.1.2. La température

La température est également un facteur de régulation de l'expression du métabolisme phénolique, souvent en interaction avec la lumière. Ainsi, un abaissement de la température associé à un traitement lumineux adéquat induit fréquemment une accumulation des anthocyanes. Là encore, la régulation pourrait intervenir au niveau du *PAL* elle-même, des inhibiteurs de l'enzyme pouvant être mis en place sous l'effet des températures élevées. Des perturbations du métabolisme phénolique peuvent quelques fois apparaître à la suite de traitements d'organes végétaux au froid, conduisant alors à des brunissements (Rhodes et *al*., 1981).

3.1.3. Les microorganismes pathogènes

La contamination microbienne du végétal par des microorganismes pathogènes engendre une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place de mécanismes de défense de la plante (Dixon et Paiva, 1995).

3.1.4. Les traitements appliqués par l'homme

Certains traitements (application de fertilisants, irradiations, etc.) peuvent influencer sur la composition phénoliques au sein de la plante, soit au cours de la croissance ou au cours de la conservation des organes végétaux. Les conséquences sont souvent prévisibles car la réponse peut être très variable d'une espèce à l'autre et en fonction des doses appliquées et des durées de traitements. De profondes modifications de l'équipement phénolique interviennent également lorsque les organes végétaux sont soumis à des procédés technologiques destinés à la transformation (blanchiment, cuisson, etc.) (Macheix et *al*., 2005).

3.1.5. Le stade physiologique

Les teneurs en composés phénoliques des organes végétaux sont également variables en fonction du stade physiologique. A l'exception des anthocyanes, la concentration en composés phénoliques se décroit au cours de la croissance et de la maturation. Chaque groupe de composés phénoliques peut évoluer au cours de la croissance selon une cinétique qui lui est propre, ce qui conduit alors à des proportions variables des différents composés en fonction du stade physiologique atteint (Macheix et *al*., 2005).

3.2. Effet de l'espèce et de la variété

L'expression du métabolisme phénolique dans la plante est la traduction du patrimoine génétique propre à chaque espèce. La nature et la teneur en composés phénoliques accumulés sont donc d'abord une caractéristique de l'espèce végétale considérée. En effet, il est possible de caractériser les différentes variétés d'espèces par une véritable empreinte phénolique qui peut être utilisée pour la certification de variétés nouvelles obtenues par hybridation. Ces mêmes approches peuvent permettre de déceler certaines fraudes dans des produits de l'agroalimentaire (Fleuriet et Macheix, 2003).

Chapitre II
Atriplex halimus

Chapitre II : *Atriplex halimus L.*

Introduction

Le genre *Atriplex* est une dicotylédone, il renferme à peu près 130 espèces originaires de toutes les régions tempérées et subtropicales du monde. Beaucoup sont des halophytes littorales (région méditerranéenne), d'autres des halophytes continentales, de déserts salés (Asie centrale, Amérique du nord occidentale). Certains d'entre eux sont annuels (Salgues, 1962 ; Walker et *al*., 2013). Plusieurs espèces sont distinguables par leur morphologie, leur cycle de développement et par leur adaptation écologique (Barrow et Osuna, 2002). *Atriplex,* le plus grand genre en Chénopodiaceae (Goodin, 1979), comprend environ 417 espèces. En Afrique du nord, ce genre comporte 15 espèces spontanées et 20 espèces naturalisées soit 07 espèces vivaces, 01 bisannuelle et 09 annuelles (Le Houérou, 1971). Tandis que, parmi 40 à 50 espèces de la totalité des espèces d'*Atriplex* présente dans le monde (Ortiz-Dorda et *al*., 2005), une quinzaine ont été mise en évidence en Algérie (Maire, 1962) ; parmi elles, *Atriplex halimus* L, diploïdes (2n = 2x = 18) et *Atriplex canescens* (Pursh), Nutt, tétraploïdie sont les plus répondus, en particulier dans les habitats qui combinent la salinité relativement élevée du sol avec l'aridité (Nedjimi et *al*., 2006), elles poussent sur les sables maritimes du littoral ou à l'intérieur du pays sur les étendus salées autour des Sabkhas (Edmond, 1963).

1. Définition de l'*Atriplex halimus* L.

C'est une espèce précieuse, elle s'étale presque sur tous les étages bioclimatiques, étage méditerranéen, subhumide, humide, aride, semi-aride, saharien supérieur et inférieur (Houreau, 1992 ; Talamali, 2001): Elle est reconnue par la tolérance au sel, le pouvoir de maintenir l'équilibre écologique, assure aussi la lutte contre la désertification et, en tant que fourrage. Son feuillage persistant, riche en protéines, est très apprécié durant la longue période de sécheresse estivale, alors que les espèces herbacées ont disparu (Chalbi et Demarly, 1991), elle présente également des intérêts économiques et phytothérapeutiques…etc. (Nedjimi, 2013).

A.halimus (noms usuels: *guettaf*, arroche, pourpier de mer) est un arbuste xérohalophytes et nitrophiles de la famille de *Amaranthaceae* (Kadereit *et al.,* 2010), natif d'Afrique du nord où il est très abondant. Il s'étend également aux zones littorales méditerranéennes de l'Europe et aux terres intérieures gypso-salines d'Espagne (Kinet et *al*., 1998).

2. Systématique de l'espèce

La classification de l'espèce *Atriplex halimus* L. dans le règne végétal est la suivante (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes (Phanérogames)
Sous-embranchment	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Sous- classe	Apétales
Ordre	Centrospermales
Famille	Amaranthaceae (Chénopodiacées)
Genre	***Atriplex***
Espèce	***Atriplex halimus*** L.

3. Répartition géographique de l'espèce

L'*A. halimus* est la plante autochtone la plus représentée sur le pourtour méditerranéen ainsi, dans l'Asie occidentale (Al-Turki *et al.,* 2000; Gu et al., 2011). Couvrant 100 000 ha en Syrie, Jordanie, l'Egypt, Arabie Saoudite, la Libye, l'Iraq, Israël, la Jordanie, Algérie, Maroc, Espagne et Tunisie et en Afrique du Sud (Matinez et *al.,* 2003 ; Aouissat et *al*., 2011 et Azam et *al.*,2012) à des altitudes aux alentours de 1000m (Le Houerou, 1992). Une faible pluviométrie annuelle (100 - 400mm) et une évapotranspiration potentielle (0,06 à 0,28) ne limite pas la croissance de cette espèce spontanée (Le Houerou, 2000), ainsi, la résistance à des températures inferieurs à -10°C et -12°C (Le Houerou, 1992).

4. Description botanique de l'espèce

Atriplex l'une des espèces dotée d'un grand polymorphisme lié à sa diversité d'habitat (Le Houérou, 1992). En paticulier, *A. halimus* montre un polymorphisme plus important que celui des autres espèces du même genre (*A. canescens*, *A. portulacoldes* L., *A. prostata*, *A. patula* L.). En effet, de nombreux travaux révelent l'existence d'un polygame d'*Atriplex* au sein d'une station et ou entre stations (Maire, 1962 ; Talamali et coll, 2007). Qui se manifeste tant au niveau de la morphologie des structures végétatives qu'au niveau des structures reproductives (Dutuit, 1999), ainsi qu'un polymorphisme dans la production de la biomasse (Ben Ahmed et *al*., 1996). Elle se développe mieux dans les sols salés, renferme un système racinaire très développé fixant les couches supérieures du sol et peut être utilisée comme moyen de lutte contre la désertification.

A. halimus est un arbuste buissonneux vivace, pouvant atteindre jusqu'à 4m de hauteur (Negre, 1961). La plante adulte est très ramifiée, ayant un aspect blanc argenté, à tige dressé d'une couleur blanche à grisâtre, à racine blanchâtre pivotante en surface pouvant atteindre 3 à 5 fois la longueur de tige (Quèzel et Santa, 1963).

Les feuilles d'*A. halimus* sont assez grandes, de 2 à 5 cm de long, sont alternées, munies d'un pétiole court, ovales, argentées un peu grisâtres et les tiges sont très rameuses, ligneuses, un peu angleuses **(**Franclet, et Le Houérou, 1971 ; Le Houérou, 1992**)**. Tandis que ces racines sont grosses, étalées obliques, puis s'enfoncent verticalement jusqu'à une profondeur variable avec le sol et l'âge de la plante (Negre., 1961). L'*A. halimus* fait partie des 10% d'Angiospermes qui développent des fleurs unisexuées monoïque (Talamali et *al*., 2001, Ozenda, 2004)**.** Cependant, les graines sont peu arrondies à ses extrémités, sa floraison a lieu de Mai à Septembre ; le mois d'Avril jusqu'à Novembre est la période de la fructification (Marie, 1962).

5. Usage de l'*A. halimus*

La haute résistance de cet arbuste à divers stress abiotiques tels que la sécheresse saisonnière, la salinité qui l'aide à faire face aux températures élevées (Qiu et Lu, 2003) en plus la tolérance à des intensitées lumineuses élevées (Le houérou, 1992). Ainsi, la particularité d'accumulation de divers éléments métalliques tels que ; Arsenic (As), cuivre (Cu), plomb (Pb) et le zinc (Zn) et en particulier l'hyperaccumulation du cadmium (Cd), comme il a été démontré dans les travaux de Lotmani et *al*. (2011a) et Mesnoua et *al*. (2016), lui attribuent des propriétés intéressantes dans la phytoremédiation des sols pollués causé par les activités industrielles telles que l'exploitation minière, la combustion de carburants, les engrais et les pesticides (Redondo-Gómez et *al.*, 2011) qui affectent non seulement la productivité des plantes mais aussi, la santé humaine (Demirevska-Kepova et *al*., 2004).

La richesse de cette espèce (les feuilles) en fibres alimentaires (cellulose), protéines, vitamines (B et C) et sels minéraux (sodium, calcium, potassium, magnésium, phosphore…), la digestibilité et rétention d'azote (Tab. 3), lui donne des valeurs nutritionnelles et énergétiques intéressantes pour les bétails comme fourrage et comme aliments des populations locales et steppiques (ex. Djelfa en Algérie), car par son contenu riche en fibres, il facilite la digestibilité, et contribue à l'amélioration de la qualité de produit laitier de chèvres (Alvarez et *al*., 2008).

Tableau 3. Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d'*A.halimus* (Boussaid et *al*., 2001).

Matière sèche (MS) (%)	**La composition chimique des feuilles d'*A.halimus* exprimée en %(MS)**						
	Matière azotée totale (MAT)	**Cellulose brut (CB)**	**Na**	**Ca**	**K**	**P**	**Mg**
34,2	15,1	15,4	4,41	1,77	2,59	0,21	0,32

Cet arbuste dispose en outre de nombreux autres atouts pour la santé humaine dans le domaine phytothérapeutiques, elle est reconnu par ces propriétés ; hypoglycémiante et hypolipidémiante, ainsi que la réduction des maladies cardiaques (Le Houérou, 1992 ; Mirsky et Nitsa, 2001 et Chikhi *et al.*, 2014). En outre, cette espèce est également utilisée dans le traitement de l'anémie et des rhumatismes (Said et *al.*, 2007 ; Aouissat et *al.*, 2011), de l'effet de contrôle des parasites dans des essais vétérinaires (Bayoumi et El-Shaer, 1992), de l'activité antimicrobienne contre les Bactéries pathogènes à Gram positif et négatif (Abd El-Rahman et *al.*, 2006), de l'effet anti-cancéreux (Thomass, et *al.*, 2007) et curative contre l'infection urinaire et la lithiase (Belouad, 2001 ; Emam, 2011).

Chapitre III
Champignons dermatophytes

Chapitre III: Les champignons dermatophytes

Introduction

Les dermatophytes forment un groupe de champignons responsable de mycoses cutanées appelé dermatophytose due au trois groupes de champignons distinct: les champignons filamenteux (les dermatophytes), les levures des genres Candida et Malassezia sp. Exceptionnellement, les moisissures, adaptées à la kératine humaine et animale (Harmsen et *al*., 2002). Dans le langage courant, on les appelle « teignes » et, en médecine humaine, elles sont souvent désignées par le nom latin *tinea*. Chez l'homme, la peau, les phanères (ongles, cheveux et poils) et les tissus souscutanés (granulomes, mycétomes) ou les viscères (maladie dermatophytique), des sites privilèges de ces champignons qualifiés de kératinophiles et kératinolytiques. Contrairement à la plupart des autres champignons pathogènes, Ils sont des parasites obligatoires infectant des individus en bonne santé, et les infections dont ils sont responsables sont contagieuses. Elles peuvent être superficielles intéressant l'épiderme et les muqueuses, profondes ou semi-profondes ou systémiques (Agoumi et *al*., 2003).

1. Origine

L'origine de la contamination par les différentes espèces peut être humaine (antopophiles), animale (zoophiles) ou tellurique (géophiles). La voie de contamination habituelle par les dermatophytes est cutanée ou transcutanée. La contamination d'origine humaine est la plus fréquente, elle peut être directe mais elle se fait le plus souvent par l'intermédiaire des sols, des locaux souillés, par des squames parasitées (salles de bains, salles de sport, piscines…). Des objets tels que les peignes, brosses, foulards, vêtements et chaussures peuvent également transporter des spores (Bouyahya, 2018).

1.1. Espèces anthropophiles

Ce sont des parasites obligatoires de l'homme qui ont une transmission inter humaine, soit par contact direct, soit indirect, par l'intermédiaire d'objets souillés ou la fréquentation des lieux publics contaminés (Bouyahya, 2018), elle provoque des lésions discrètes habituellement bien tolérées ou ignorées et sont très fréquents en pathologie humaine.

La contamination se fait par les spores (arthrospores), très résistantes, qui sont présentes sur les lésions elles-mêmes, mais également dans les débris d'ongles, de squames, de cheveux. Ces spores peuvent survivre des mois voire des années dans le milieu extérieur, en particulier dans l'environnement des malades, ce qui contribue à leur recontamination (badillet, 1996).

La transmission au sein de la famille ou de la collectivité d'enfants nécessite des contacts répétés avec la source d'infection. Des objets contaminés (peignes, brosses, foulard, etc.), sont souvent à

l'origine des épidémies. Les poux, en se déplaçant d'une tête d'enfant à une autre tête, emportent avec eux des spores fongiques et participent à la contamination. Certains sports, comme la lutte favorisant le contact de la tête avec différentes parties du corps, sont aussi des facteurs de dissémination des dermatophytes anthropophiles (Monod et *al*., 2014).

1.2. Espèces zoophiles

Ces parasites des animaux sont transmis accidentellement à l'homme par l'intermédiaire des animaux d'élevage ou de compagnie. Les dermatophytes zoophiles sont des espèces peu ou pas adaptées à l'homme. Ils donnent des lésions plutôt bruyantes (inflammatoires) et mal supportées. La contamination provenant des animaux est cependant rare. Elle se fait de façons accidentelles dans un contexte professionnel, chez les éleveurs, vétérinaires, personnelles des abattoirs (22). Qui sont :

a) *Microsporum canis*, transmis le plus souvent par le chat, mais aussi par le chien, le lapin...)

b) *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, transmis par le cheval, la souris, le hérisson, le hamster,…

c) *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae*, transmis par le cochon d'Inde (Contet-audonnaux et *al.*, 2010).

d) *Microsporum persicolor*, qui parasite spécifiquement les rongeurs tels que la souris.

e) *Trichophyton gallinae* retrouvé chez les Gallinacés (poule, dindon, faisan, …) (Chabasse et *al*., 2009).

1.3. Espèces telluriques

Elles vivent dans le sol et sont transmis à l'homme à l'occasion de travaux de jardinage ou par l'intermédiaire d'animaux. Sur certains sols enrichis en kératine animale (cours de ferme, étables, etc.), on trouve des dermatophytes qui dégradent la kératine déposée par les animaux (poils, fragments de corne, de sabots,plumes…etc.). Peu agressifs, ils sont rarement impliqués en pathologie humaine mais entraînent des manifestations inflammatoires intenses favorisant leur élimination. Ce sont essentiellement *Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum* et *Trichophyton mentagrophytes*. Certaines espèces telles que *Trichophyton ajelloi*, fréquentes dans le sol, ne sont jamais pathogènes (Chabasse, 2009).

Chapitre IV
Candidoses

Chapitre IV: Les Candidoses

1. Candidoses

Les candidoses sont des infections opportunistes fréquentes dont l'incidence a connu une augmentation exponentielle durant les 30 dernières années dues à des champignons levuriformes, du genre *Candida* dont l'espèce *albicans*. Le développement de ces maladies a été largement favorisé par l'évolution rapide des techniques médico-chirurgicales, l'immunodépression consécutive à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi qu'aux nouvelles thérapies immunosuppressives associées aux transplantations et au développement des biothérapies (Tortorat, 2012). Les infections à levures se situent aujourd'hui au premier rang des infections nosocomiales (Bodey *et al.*, 2002, Hage et al., 2002), avec une distribution presque équivalente entre *C. albicans* et *C. non albicans*.

Les infections par les levures (candida) causent deux types de lésions à savoir : Les candidoses superficielles et les candidoses profondes ou invasives encore appelées candidoses systémiques (Tortorat, 2012). La première comprends l'infection des peaux et des muqueuses (Antachopoulos *et al.*, 2007). Elles peuvent être localisées au niveau du tube digestif (Parra-Herran *et al.*, 2010) cutané ou génital (Fidel, 2011).Tandis que, le deuxième type est produit lorsque les levures atteignent les vaisseaux sanguins. Les candidémies sont rares chez les personnes sans facteur de risque. On retrouve plutôt ces infections chez les patients hospitalisés, immunodéprimés ou les patients neutropéniques. Finalement, il est possible de voir apparaître des infections pulmonaires à *Candida*. Il est fréquent d'apercevoir chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés une dissémination des levures de *Candida* du tractus gastro-intestinal vers les poumons (EspinelIngroff, 1997).

2. Genre *Candida*

En pathologie humaine, les levures du genre *Candida* sont les agents étiologiques les plus fréquents d'infections fongiques invasives (IFI). Agent commensal de la peau ou des muqueuses humaines, elles sont habituellement peu pathogènes chez 30 à 70% d'individu sain, mais peuvent provoquer des infections fongiques gravissimes selon le terrain du patient, en association avec certains facteurs de risques. Sont des champignons levuriformes polymorphes se reproduisant par bourgeonnement. C'est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie, diploïde pouvant mesurer de 3 à 15 µm. Elles sont fréquemment retrouvées dans les muqueuses et sur la peau, c'est pourquoi elles sont décrites comme des microorganismes commensaux.

Depuis le début des années 1980, on observe une augmentation de l'incidence de ces mycoses profondes, principalement chez les patients immunodéprimés et les patients en service de

réanimation. L'espèce la plus représentative de ce genre est *Candida albicans* elle fréquemment retrouvée chez l'homme et parfaitement tolérée au niveau de la cavité buccale, sur la peau, dans le système digestif, au niveau du tractus ano-rectal et dans la flore vaginale (Pittet, et al. 1994), qui peut être à l'origine des infections d'origine endogène. Outre, *C. albican*s plusieurs autre espèces de candida notamment *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. tropicalis* est croissante dans les prélèvements cliniques et peuvent jouer un rôle dans les candidoses (Pierre fournier, 2011 ; Tortorat *et al.*, 2012).

- **Classification du genre Candida**

Règne : Champignons.

Division : *Ascomycota.*

Classe : *Saccharomycetes.*

Ordre : *Saccharomycetales.*

Famille : *Saccaromycetaceae.*

Genre : *Candida* (**Krick et *al*., 2008**).

2.1. *C. albicans*

C'est un micro-organisme de la famille des levures que l'on retrouve normalement dans l'organisme humain en quantité relativement limitée. A l'état normal, cette levure vit en harmonie sur les muqueuses de nos organes digestifs, dans notre bouche, notre estomac et nos intestins sans y causer le moindre trouble (Pittet, 1994).

Il s'agit d'une levure cosmopolite, commensale des muqueuses oropharyngées, gastro-intestinales et génito-urinaires. Elle peut occasionnellement coloniser la peau. Levures ovalaires ou rondes au microscope, sur gélose, elles sont blanches, crémeuses et lisses (Eggimann *et al.*, 2003). Elle était longtemps négligée par les communautés microbiologiques et médicales, s'est imposée durant les deux dernières décades comme un problème majeur de Santé publique. Le spectre des pathologies déterminées s'étend des mycoses vaginales (Poulin, 2013). Il s'agit d'un est un champignon diploïde polymorphe capable de changements morphologiques réponse à des changements environnementaux, et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différents biotopes. En allant de la forme levure unicellulaire (blastospores) à la forme filamenteuse (pseudohyphes ou hyphes). La forme blastoconidie est ronde ou ovalaire, mesurant de 2 à 4 µm avec parfois un bourgeon en formation. Ces cellules ont une température optimale de croissance de 37°C.

La forme pseudomycélium mesure de 500 à 600 µm de longueur et de 3 à 5 µm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ses constituants. La forme mycélium vrai correspond à un champignon filamenteux hautement polarisé avec des bords parallèles. La conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée tube germinatif. Cette forme est spécifique de *C. albicans* et *C. dubliniensis* et favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. Sous certaines conditions environnementales, *C. albicans* peut aussi former des chlamydospores, qui sont des structures terminales ou latérales arrondies. Elles sont formées par épaississement du thalle, mesurant deux fois la taille d'une blastospore et possédant une paroi plus épaisse (Dupont, 1985).

En effet, ce dimorphisme peuvent favoriser la dissémination des levures dans les tissus (Hazan, *et al.*, 2002). La formation de pseudomycélium ainsi que de mycélium vrai aboutit à l'élaboration d'un réseau microfibrillaire stable, permettant à *C. albicans* de développer un véritable biofilm qui participe à sa pérennisation sur certains substrats ou dispositifs implantables (Fig. 13).

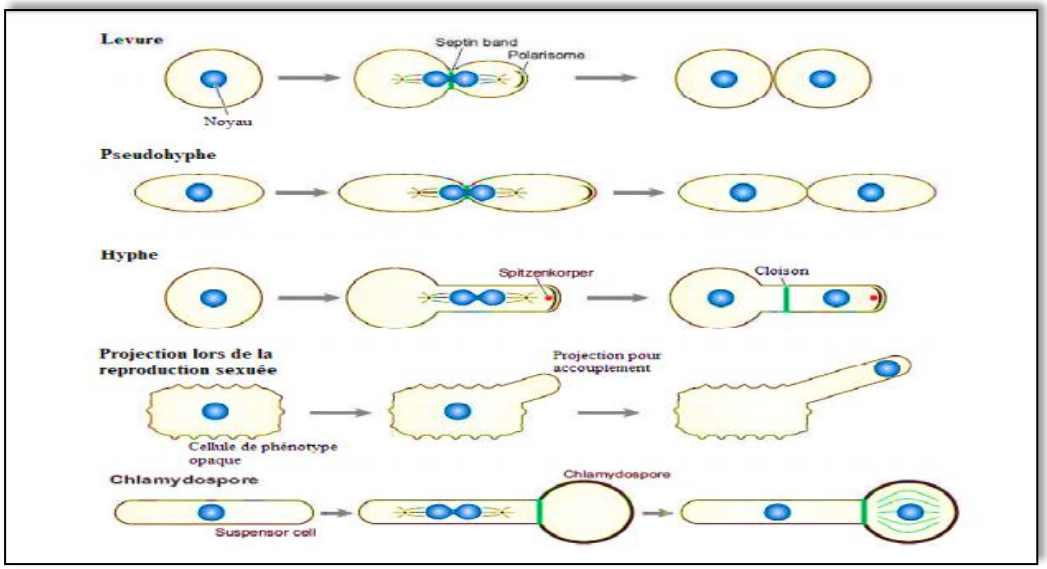


Figure 13. Les différentes morphologies et la croissance de *C.albicans* (Arnaud *et al.*, 2009).

2.2. *C. tropicalis*

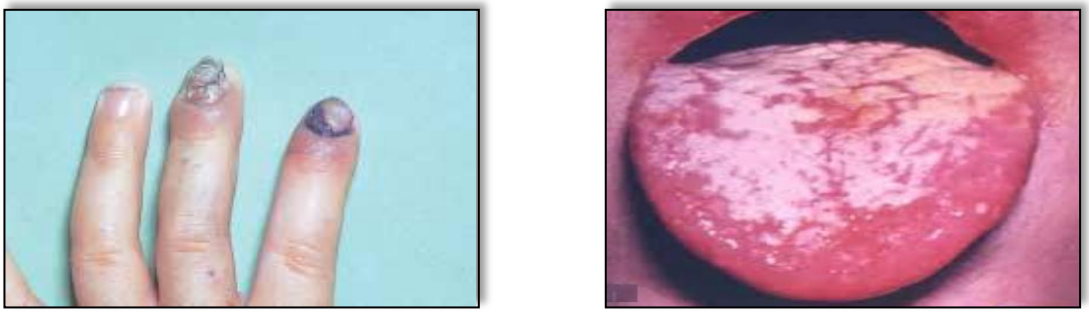
Candida tropicalis est levure saprophyte de la nature (sol, eau, céréales), retrouvée dans le tube digestif et les voies urinaires de l'homme (Weinberger *et al.*, 2005 ; Pierquin, 2010), elle représente 25% des isolats de levures de ce genre en pathologie humaine. Son pouvoir pathogène est comparable à celui du *C. albicans*. Elle est responsable de 4 à 24% des candidémie (Develoux, 2005 ; Desnos-Ollivier, 2008).

Elle a une forme variable, ronde à allongée et ces colonies poussent rapidement. Elles sont crémeuses, blanches, lisses ou légèrement plissées. Elles sont souvent associées à un pseudomycélium (Gloor Ariane, 2008).

3. Symptômes des candidoses

Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Lorsque *Candida* s'infiltre dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40%.

Candida albicans peut donner également une multitude d'autre infections car il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent, il peut être responsable d'infection superficielle cutanée, causer un érythème fessier chez les nouveaux nées, une bronchopneumonie et /ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'inf ections profondes **(**Tortorat, 2012**).**



Candidose unguéale avec périonyxis inflammatoire. Candidose bucale ou muget.

Figure 14. Les maladies de candidose (Tortorat, 2012).

4. Facteurs favorisants des candidoses

L'infection à *Candida* est une infection opportuniste favorisée par un déséquilibre immunitaire influencé par des facteurs extrinsèques ou intrinsèques : Parmi ces facteurs, le taux hormonal (Daniels *et al.*, 2001) , l'âge (Roilides, 2011), le cancer (Alsan *et al.*, 2011), le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Tumbarello *et al.*, 1999), le diabète (Carvalho *et al.*, 2001), les pathologies cardiaques (Darwazah *et al.*, 1999) ou encore la xérostomie (Shinozaki, *et al.*, 2012) et les traitements antibiotiques ou immunosuppresseurs (Xie *et al*., 2011) contribuent à l'apparition de candidoses systémiques. Les pratiques chirurgicales (Hsu *et al.*, 2009) et les accès vasculaires comme les cathéters (Tumbarello *et al*., 1999), les prothèses valvulaires (Romero *et al.*, 2012) ou orthopédiques (Deelstra *et al.*, 2012) ont été aussi montrés comme facteurs prédisposant aux

infections à *Candida*. Par ailleurs, l'humidité, la macération (contacts répétés avec l'eau, occlusion, transpiration, obésité…) et le pH acide sont aussi des facteurs de risque de candidose (Tortorat, 2012).

5. Traitement

Le diagnostic une fois posé, il importe de définir un traitement sur une période plutôt longue que courte, et qui va se mener sur plusieurs fronts : Modification alimentaire (suppression des sucres), régulation de la flore (pré-biotique), plantes médicinales antifongiques, drainantes, fortifiantes et calmantes des démangeaisons associer nécessairement à des traitements chimiques pour rétablir l'équilibre de la flore locale (Tortorat, 2012).

Chez un sujet immunocompétent le traitement fait appel souvent aux antifongiques locaux (amphotéricine B en suspension buvable; nystatine et miconazole en gel buccal). En cas d'atteinte buccopharyngienne ou bucco-oeophagienne, la désinfection du tube digestif peut être obtenue par la prise associée d'amphotéricine B en gélules (6 à 8 par jour en 2 à 3 prises) ou de miconazole en comprimés (6 par jour en 3 à 4 prises). Chez le sujet immunodéprimé un traitement systémique peut être préféré d'emblée ou après échec d'un traitement local préalable. Les antifongiques utilisés sont: le fluconazole; le kétoconazole et l'itraconazole (APC, 2001, Agbo-Godeau et Guedj, 2005).

Partie expérimentale

Chapitre I
Matériels et méthodes

1. Objectif

La valorisation des plantes cultivées et spontanées constitue l'une des orientations de recherche menée au sein du laboratoire de protection des végétaux. *Atriplex halimus*, plante autochtone Méditerranéenne, intéresse le laboratoire aussi bien que pour ses aspects fourragers que phytochimiques. Dans ce présent contexte, l'étude des effets biologiques d'*A. halimus* de différentes provenances constitue l'objectif principal de cette investigation.

Les parties végétales d'*A. halimus* L., utilisées (Tiges et feuilles), ont été analysées. La quantité et la qualité de leurs métabolites secondaires, ainsi que leurs activités biologiques à savoir : Les activités anti-oxydante et antifongique contre les espèces de levures dermatophytes, reconnues par leurs pathogénicités ainsi que leurs grands spectres de résistances aux antibiotiques dotés de leurs effets secondaires sur la santé. Afin que cette source naturelle d'origine végétale sera une alternative aux antioxydants et antibiotiques synthétiques.

2. Matériel végétal et Préparation de la drogue

La plante étudiée a été choisie, essentiellement, sur la base de ses intérêts environnemental, fourrager et médicinal ainsi que sa disponibilité tout aux long de l'année, son adaptation aux différentes conditions environnementales les plus rudes et leur fréquence d'emploi grâce à des enquêtes ethnobotaniques effectuées auprès des herboristes (Chikhi et *al.*, 2014) et des personnes utilisant ou vendant les plantes médicinales.

L'*A. halimus*, employée, a été récoltée aléatoirement en mois d'octobre 2016, à partir de trois zones Algériennes différentes (Fig. 15): Sig (Wilaya de Mascara, 35°31'14'30″N 0°10'09'97″O et 144m d'altitude), Mazagran (Wilaya de Mostaganem, 35°53'17'19″N 0°03'14'76″E et 58m d'altitude) et Biskra (Wilaya de Biskra, 34°55'42″N 5°38'58″E et 198m d'altitude). Les deux premières se situent au nord-ouest et sont distantes de 43 et 4km des chefs-lieux de wilaya d'Oran et de Mostaganem, respectivement. Tandis que la dernière se trouve au sud-est des chefs-lieux. Ces trois sites d'échantillonnages sont reconnus respectivement par, un climat Méditerranéen chaud avec été sec, semi-aride sec et chaud et un climat désertique sec et chaud.

Figure 15. Provenances géographiques de l'*Atriplex halimus* L. (Google maps).

Les feuilles et les tiges de l'*A. halimus* des trois écotypes Algériens, fraichement collectées, ont été nettoyées de tout élément étranger et séchées à l'étuve (T°≤40° C), jusqu'à la stabilisation du poids des échantillons. La matière sèche a été ensuite séparément réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres végétales ont été placées dans des bocaux hermétiquement fermés et soigneusement conservés dans un endroit sec et obscur, pour les travaux ultérieurs.

3. Méthodes

3.1. *Extraction des composés bioactives*

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes qui succèdent. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide. C'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération à froid avec l'eau distillée ou les solvants de différentes polarités, le Soxhlet, la décoction et l'hydro-distillation.., étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels.

Le procédé d'extraction appliqué dans cette investigation est la technique de macération par un mélange hydro-alcoolique (hydro-éthanolique), méthode proposée par Mahmoudi et *al.* (2013) et Bourgou et *al.* (2016), légèrement modifiée. Pour chacun des échantillons, cent grammes (100g) de

matière végétale sèche et finement broyée a été mélangée avec 350ml d'éthanol aqueux (70/30: v/v), pour assurer une extraction maximum des principes actifs de la plante. La procédure a été réalisée à l'obscurité et à la température ambiante pendant trois jours successifs, avec renouvellement du solvant chaque 24 heures.

Après avoir été filtré sous vide à l'aide d'un papier en microfibre de verre de Whatman #1, les trois macéras ont été mélangés. Ensuite, le solvant a été évaporé sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif (Rota-Vapore, Büchi R 210) à une température de 40° C (Fig. 16). Les concentrés ainsi obtenus ont été conservés à -20° C. La lyophilisation constitue la dernière étape pour l'obtention de l'extrait sec (Lyophilisat).

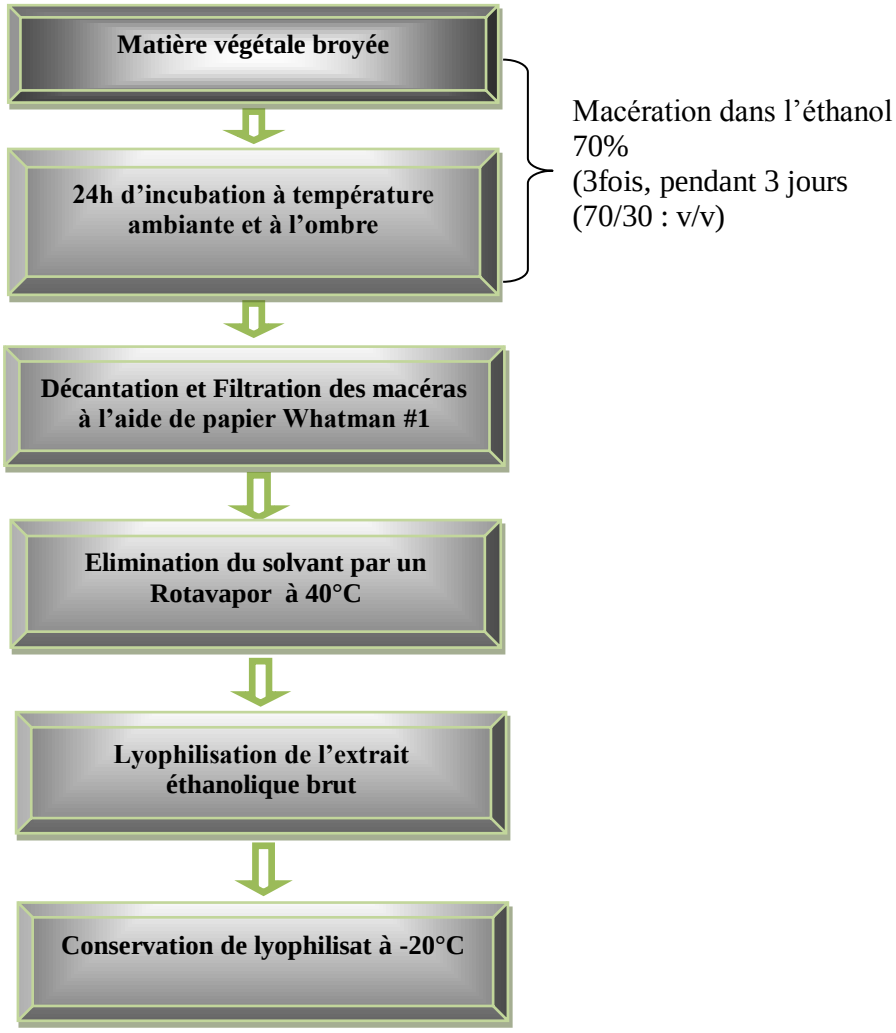


Figure 16. Protocole d'extraction (Mahmoudi et *al.*, 2013 ; Bourgou et *al.*, 2016).

3.2. Analyse quantitative des molécules bioactives

3.2.1. Estimation du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction (R) a été calculé selon la formule de Falleh et *al*. (2008):

$$R\ (\%) = 100\ Mext/Méch$$

Où : R est le rendement en %; Mext est la masse de l'extrait après lyophilisation en g et Méch est la Masse de la matière végétale sec.

3.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux (CPT)

Le principe de l'analyse quantitative des polyphénols totaux est le suivant: le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968 ; Vermerris et *al.*, 2006).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

Ce dosage a été effectué, selon la méthode décrite par Do et *al.* (2014), il permet de connaitre le contenu polyphénolique total d'un échantillon donné. Les extraits éthanoliques des feuilles et des tiges, préparés à une concentration de 1mg/ml, ont été ajoutés à 5ml (dix fois diluée) du réactif de Folin-Ciocalteu et 4ml de carbonate de sodium (7,5%). Parallèlement, dans les mêmes conditions, une gamme d'étalon a été préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variant de 0 à 100µg/m1. Après une heure d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lue à 765nm sur un spectrophotomètre UV (Jenway 6715).

Le contenu phénolique total a été exprimé en mg équivalent d'acide gallique/g de "Lyophilisat" (mg EAG/g LE). La teneur en ce composant par rapport à 1g de matière sèche a été également calculée (mg EAG/g MS) en se référant à la courbe d'étalonnage.

La droite de régression de l'acide gallique nous permet l'appréciation des valeurs des concentrations et des teneurs en polyphénols totaux des deux parties aériennes *d'A. halimus*, pour des absorbances obtenus.

Dans le but d'approfondir notre recherche et de déterminer les différents molécules bioactives présents dans les échantillons testés et qui peuvent être responsables des activités biologiques (Antioxydantes et antifongiques), une étude qualitatives complémentaire aux screening a été procédée par la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

3.2.3. Quatification des flavonoïdes totaux (FT)

La détermination de la teneur et la concentration des flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques des feuilles et tiges a été réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium décrite par Ahn et *al.* (2007). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Elle entraîne la formation d'un complexe jaune qui absorbe à 430nm. Où un volume de 0,5ml d'une solution de $AlCl_3$ 2%-éthanol était additionné à 0,5ml d'échantillon ou d'étalon. Après 10min à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée. La Rutine, à des concentrations croissantes allant de 0 à 1000µg/ml, a été utilisée comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage. La comparaison de la D.O observée par rapport à celles obtenues par l'étalon de concentrations connues permet d'évaluer la concentration et la teneur en flavonoïdes totaux (*TFT*). Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent Rutine par gramme de lyophilisat (mg ER/g LE) et par gramme de matière sèche (mg ER/g MS).

3.2.4. Dosage des flavonols totaux (FLT)

Les flavonols est l'une des classes principales des flavonoïdes. Les flavonols présentent des propriétés antioxydantes qui peuvent être déterminées suivant la méthode décrite par Liu et *al.* (2007). Approximativement, 1ml des extraits ont été mélangés avec 1ml de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (2mg/ml) et 3ml de la solution d'acétate de sodium (50mg/ml). Le mélange a été gardé pendant 2,5h à la température ambiante, puis dosé à la longueur d'onde de 440nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Jenway 6715). Parallèlement, différentes concentrations de Rutine ont été employées comme solution étalon allant de 0 à 100µg/ml.

Les teneurs et les concentrations en flavonols ont été exprimées respectivement en milligramme équivalent standard (Rutine) par gramme de matière sèche (mg ER/g MS) et d'extrait "Lyophilisat" (mg ER/g LE).

3.2.5. Quantifications des Caroténoïdes totaux (C)

Les colorants naturels ou « Pigments » dans la plupart sont d'origine végétale, forment une gamme très étendus de nuances (du jaune au bleu, en passant par le vert et même le noir). La chlorophylle, le lycopéne et le ß-caroténe sont parmi les colorants les plus rencontrés et les plus utilisés dans les industries agroalimentaires. A des doses réglementées, ils sont bénéfiques pour la santé. Certains d'entre eux sont connus pour leurs activités antioxydantes, antimutagènes, voire anticarcinogénes (Kamat et *al.,* 2000 ; Ben Mansour et Latrach-Tlemcani, 2009).

Dans le but de quantifier les caroténoïdes présentes dans les extraits éthanoliques de l'*A. halimus,* la méthode de Sass-Kiss et *al*. (2005) a été choisie; soit 100mg de lyophilisat, ainsi que différentes concentrations de β-carotène (0 à 10µg/ml) utilisées comme référence, ont été

homogénéisés avec 10ml d'un mélange de solvant hexane/acétone/éthanol (2:1:1 : v/v/v). Le surnageant a été ajusté à 10ml d'hexane après centrifugation pendant 15mn à 2250tpm. L'absorbance de la solution a été mesurée à 450nm. Les concentrations en caroténoïdes ont été exprimées en milligramme équivalents β-carotène par gramme d'extrait lyophilisé (mg EβC/g LE). Ajoutant que la teneur de la matière sèche en ces pigments a été également évaluée (mg EβC/g MS).

4. Analyse qualitative des molécules bioactives par CLHP

L'analyse qualitative des composés phénoliques présents dans les extraits a été effectuée à l'Université *Abdelhamid Ibn Badis*, par un système de chromatographie haute performance liquide en phase inverse, couplé à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD, High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector, Shimadzu liquid Prominence-i, LC-2030C 3D), en utilisant une colonne RP C18 (110 Å, de dimension égale à (150 × 2mm DI) et 5µm de porosité. Les composés ont été séparés selon le gradient d'élution A : eau / acide acétique (solvant A) qui sont tous deux acidifiés avec 0,075% d'acide formique (Gourguillon et *al.*, 2016) afin d'éviter l'ionisation de nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité (Stalikas, 2007 ; De Rijke *et al.*, 2006) et le mélange méthanol/acide acétique forme le solvant B, ils sont élués pendant les 5 premières minutes dans un gradient suivant: 2% du solvant B, puis un gradient linéaire de B de 2 à 100% au cours des 69 minutes suivantes, avec un débit d'élution de 0,8ml/mn décrit par Buer et *al.* (2007), et un volume d'injection de 5µl. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur DAD (190-900nm). Ainsi, les données spectrales sont recueillies dans la plage de 200 à 800nm pour tous les pics, Les aires de pics des extraits sont mesurées à une longueur d'onde de 280nm. Alors que leur identification a été faite en comparant les temps de rétention et les spectres UV des pics par rapport à ceux de la littérature.

5. Etude *in-vitro* des activités biologiques des extraits de l'*Atriplex halimus*

5.1. Potentiel antioxydant

La recherche et le développement des extraits végétaux à usage antioxydant et qui aurait des propriétés biologiques pouvant contribuer à limiter ou même éliminer certaines pathologies, ont été toujours la préoccupation des scientifiques depuis les années 1980, en vue de remplacer les antioxydants de synthèse qui sont soumis sur le marché, où leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tous risques de toxicité (De-Reynal et multon, 2009). Dans ce contexte, on s'est intéressé aux antioxydants naturels, particulièrement les composés phénoliques, qui s'expliquent aussi par leurs potentiels *in vivo* vis-à-vis des radicaux libres, via l'alimentation et/ou la pharmacologie.

Ces antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro*, des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules. Il est recommandé donc d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (Prior et *al.*, 2005). C'est pourquoi le choix s'est porté sur l'utilisation de quatre tests chimiques : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$), le piégeage du radical l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique ($ABTS^{\cdot+}$) et le blanchiment du β-carotène (BCB). Récemment, de nouveaux mécanismes comme le pouvoir scavenger des radicaux libre de l'oxyde nitrique ont été expliqués (Boora et *al.*, 2014).

Le pouvoir antioxydant des différents extraits de l'*A. halimus* évalué par ces derniers est comparé à des molécules, dont l'activité anti-oxydante est connue, et qui pour certaines sont au carrefour de nombre de réactions d'oxydo-réduction dans le vivant, sont utilisées ici comme témoins positifs. Il s'agit d'antioxydants d'origine synthétique à savoir : Acide ascorbique, Trolox (Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5, 7,8-tétraméthyl-2H-1 benzopyran-2-carboxylique) et le BHT (Dibutylhydroxytoluène).

5.1.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène décrite par Chaouch et *al*. (2013). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^{+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide. Un volume de 150µl de chaque extrait à différentes concentrations (200-1000µg/ml) a été mélangé avec 1,5ml de la solution du réactif (4mM molybdate d'ammonium, 0.6M H_2SO_4 et 28mM Na_3PO_4). Ensuite, le mélange a été incubé à 95° C pendant 90min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695nm contre un blanc contenant 1,5ml de la solution du réactif et 150µl d'éthanol et incubée dans les mêmes conditions. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme de lyophilisat (mg EAA/g EL).

5.1.2. Activité anti-radicalaire par le test au DPPH

Le DPPH˙ (Fig. 17) 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 à la simplicité de l'analyse. A température ambiante, le radical DPPH˙ (2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyl) présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (diphényle picryl-hydrazine: de couleur jaune). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517nm (Masuda et *al.,* 1999**).**

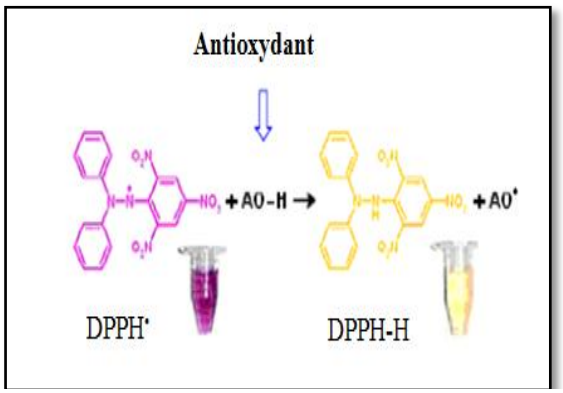


Figure 17. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AO) (Molyneux, 2004).

La méthode décrite par Sanchez-Moreno et *al*. (2002) a été adoptée pour la mesure du pouvoir antioxydant *in vitro*. Cinquante microlitres (50µl) d'extraits éthanoliques ont été mélangés avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004% ; m/v). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde de 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par le Trolox a été également analysée à différentes concentrations (200-1000µg/ml), servant comme courbe d'étalonnage. La capacité antioxydante des échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation:

$$\mathbf{I\ \% = (A_{blanc} - A_{échantillon} / A_{blanc})} \times 100$$

Avec:

$\mathbf{A}_{\text{blanc}}$: Absorbance du blanc et $\mathbf{A}_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

- **Détermination des IC_{50}**

La valeur IC_{50} est la concentration du substrat qui assure la réduction de 50% de l'activité du DPPH. Celle-ci a été déterminée graphiquement (Samarth et *al.,* 2008). Les résultats d'IC_{50} sont exprimés en microgramme équivalent Trotlox par millilitre d'extraits éthanoliques (TEµg/ml).

5.1.3. Piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical $ABTS^{\bullet+}$ en piégeant le radical-cationique de celle-ci, qui présente un spectre d'absorption maximum dans le visible à 645, 734 et 815nm (Re et *al.*, 1999 ; Belkheiri, 2010). En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS forme le radicale $ABTS^{\bullet+}$ de couleur bleu-vert intense. L'addition d'un antioxydant comme donneur d'hydrogène va réduire ce radicale et induit la décoloration du complexe (Fig. 18). Dans ce test, l'ABTS oxydé est intensivement coloré, et l'activité antioxydante est mesurée comme la capacité des composés testés à diminuer l'intensité de la coloration, relativement au Trolox.

Dans cette expérimentation, le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 2,45mM de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ et une solution stock d'ABTS à 7 mM. Le tout a été conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 12-16h. Une dilution de la solution stock avec de l'éthanol concentré a été effectué juste avant l'utilisation, où 60ml du solvant a été additionné à 1ml de mixture jusqu'à la stabilisation de l'absorbance (0.700±0.05) à une longueur d'onde de 734nm (Aarland et *al.*, 2015).

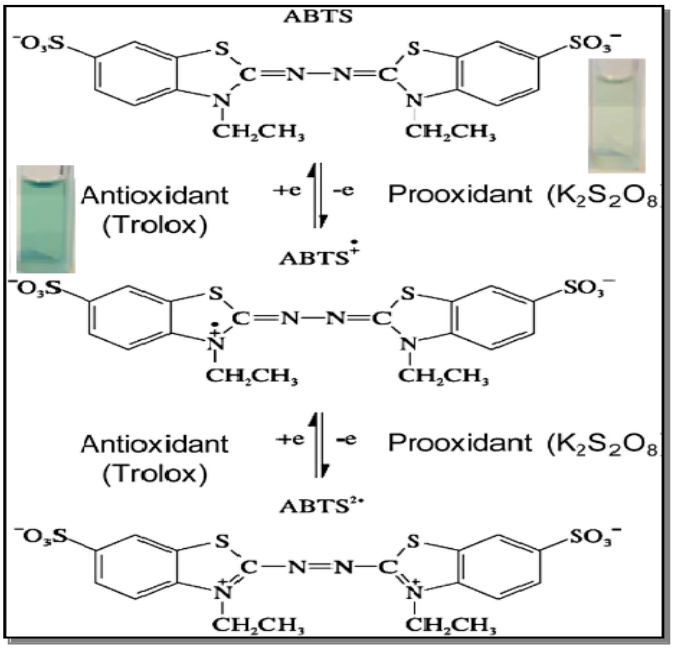


Figure 18. Génération du radicale cation $ABTS^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AOH (Konan et *al.*, 2016).

Un volume (0,9ml) de la solution stock, fraichement préparée, a été ajouté à 0,1ml d'extrait (20 à 100mg/ml) et la lecture a été faite après 15min pour chaque série d'analyses. Le même protocole expérimental a été répété pour le standard (Trolox) préparé à différentes concentrations (10 à 100µM/ml). Enfin, les résultats finaux ont été exprimés en micromoles d'équivalent Trolox par

millilitre d'extrait (TEμmol/ml). Ces derniers permettent de calculer et d'exprimer le pouvoir anti-radicalaire en IC_{50} par la même méthode que l'essai de DPPH. La capacité antioxydante des échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS• suivant l'équation d'écrite par Aarland et *al.* (2015):

Pourcentage d'inhibition (%) = [(Abs $_{témoin}$ - Abs $_{blanc}$)] / (Abs $_{témoin}$)] x 100

Où :

Abs$_{témoin}$: Absorbance du radical $ABTS^{+}$ méthanol **;**

Abs$_{blanc}$: Absorbance de l'échantillon.

5.1.4. Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique (BCB)

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène entrainant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 470nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β-carotène (Yang et *al.*, 2005).

Le test de blanchiment de β-carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits d'*A. halimus* testés est celui de Prache (2011). Une quantité de 2mg de β-carotène a été dissoute dans 10ml de chloroforme. Un millilitre de cette solution a été versé dans une fiole contenant préalablement 400mg de Tween 40 et 20µl d'acide linoléique. Le chloroforme de cette solution a été évaporé au Rotavapor, puis un volume de 100ml d'eau fortement oxygénée a été ajouté et le mélange résultant a été agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion β-carotène/acide linoléique (150µl) a été additionnée (10µl) à des solutions éthanoliques de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse BHT à différentes concentrations (20-100mg/ml). Après agitation, l'absorbance a été mesurée immédiatement à 470nm, ce qui correspond à t = 0min contre un blanc contenant l'émulsion sans β-carotène. Les tubes bien fermés ont été placés dans un bain marie à 50° C pendant 120min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait a été mesurée à 470nm à t = 120min. Pour le control positif, l'échantillon a été remplacé par le BHT. Le control négatif est constitué de 200µl de méthanol au lieu de l'extrait où de l'antioxydant de synthèse. L'activité antioxydante (%) des extraits a été évaluée en termes de blanchiment de β-carotène en employant la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition (%) = [(A_A(120) – A_C(120))/ (A_C(0) – A_C(120)] x 100

Où:

A_A (120): Absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min ;

A_C (120): Absorbance du contrôle à 120 min

AC (0): Absorbance du contrôle à 0 min.

Les résultats finaux des taux d'inhibition (%) sont exprimés en équivalent BHT par millilitre d'extraits (EBTµg/ml), en se référant à la courbe d'étalonnage. Cette activité a été également exprimée en IC_{50}, comme décrit précédemment.

6. Activité antifongiques

Les tests antimicrobiens employés ont pour but d'évaluer la capacité des extraits éthanoliques des deux parties aériennes (Feuilles et tiges) de chacun des écotypes choisi à inhiber la croissance des champignons dermathophytes testés. Cette étude permet de déceler l'écotype et l'organe les plus efficaces contre *C. albicans* et *C. tropicalis.* Aimablement fournies, respectivement par la banque des données de l'institut pasteur d'Alger (Algérie) et l'institut Pasteur (laboratoire d'hygiène d'Oran) (Tab. 4). Ces dernières, responsables des infections dermiques, ont été conservés dans des milieux de conservation à +4° C et à l'obscurité, pour leur utilisation ultérieure.

Tableau 4. Espèces pathogènes testées.

Les souches dermaophytes	**Références**
Candida albicans	ATCC 10231
Candida troplicalis	ATTC 13803

ATCC: American Type Culture Collection

6.1. Pureté des souches et activation des souches fongiques

Pour l'ampleur de l'exactitude du travail, une vérification de leur pureté a été réalisée par la coloration simple. Cette étape est suivie par des examens microscopique et macroscopique. Une pré-culture des souches fongiques a été préparée afin d'obtenir une culture jeune en phase exponentielle de croissance. La revivification des levures testées a été réalisée sur milieu Sabouraud préalablement préparé. A l'aide d'une pipette pasteur, les souches étudiées ont été d'abord prélevées chacune de leur milieu de conservation, puis ensemencées dans 10ml de bouillon nutritif et incubées à 30° C pendant 24h. Enfin, chaque souche a été activée par culture en surface sur un milieu de croissance spécifique (Sabouraud) à 30° C durant 24h.

6.2. Préparation des solutions phénoliques

Les six extraits éthanoliques ont été testés à différentes concentrations à savoir : 20, 40, 60, 80 et 100mg/ml, et désignés par les symboles suivants (C_1, C_2…C_5). Ces dernières ont été préparées dans de l'eau distillée stérile. Les échantillons ont été stérilisés par microfiltration sur papier filtre

(0.45µm). Pour s'assurer de la fiabilité des résultats, un test de confirmation de stérilisation des extraits sur milieu Sabouraud a été effectué.

Pour le témoin, l'eau distillée stérile (C_0) a été utilisée. Il est à noter que les extraits ont été préalablement stérilisés.

6.3. Evaluation de la sensibilité des souches microbiennes *vis-à-vis* des extraits éthanoliques

Deux méthodes ont été retenues pour déterminer, *in-vitro*, l'effet antifongique des extraits. Il s'agit de la méthode dite de disques non imprégnés ou test de diffusion sur gélose et la méthode dite de contact direct. L'amphotéricine B (10µg/ml) a été également testée afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes. Tous les tests ont été effectués en triplicata.

6.3.1. Méthode de diffusion sur Agar-agar (Aromatogramme)

La technique d'aromatogramme qui se base sur le même principe d'antifongigramme est une méthode analogue pour les levures et les bactéries (Joffin et Leyral, 2001). Celle-ci est utilisée comme une étape initiale à des études plus approfondies, car elle permet d'aboutir à des résultats qualitatifs. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés dans différentes substances à tester (Rebecca et *al.*, 2011). Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de germes à étudier. Chaque substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose avec la création d'un gradient de concentration entre le disque et la distance de migration du composé (Joffin et Leyral 2001, Bergheul, 2018) et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance testée. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. Autour des disques, une zone circulaire indemne de colonies a été observée, appelée zone d'inhibition. Ceci qui s'explique par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide, en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans cette technique, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky et *al*., 1976 ; Fauchère et avril, 2002).

A partir de la pré-culture de 24h, les souches sont ensemencées à nouveau dans un milieu Sabouraud liquide et incubées à 30° C pendant 18-24h, de telle sorte à prendre les cultures en phase exponentielle dans le but de tester l'effet inhibiteur des solutions préalablement préparées dans des tubes stériles sur la croissance des souches étudiées.

Les souches ont été ensuite ensemencées par un étalement en surface sur milieu Sabouraud gélosé préalablement coulé en boites de Pétri. Des disques de papier filtre stériles (à 120° C pendant 20min) et non imprégnés, de diamètre 5 à 6mm (Pyun et Shin, 2006 ; Boulekbache-Makhlouf et *al.*, 2012) sont trempés dans les solutions à différentes concentrations, puis placés à la surface du milieu

gélosé à raison de 5 disques par boite. Les boîtes de Pétri ont été conservées à 4° C pendant 2h puis incubées pendant 24 et 48h.

Dans les boites témoins, les disques ont été imprégnés dans de l'eau distillée stérile utilisée comme témoin négatif. En parallèle, un test d'antibiogramme avec L'amphotéricine B (10µg/ml) a été utilisé comme une référence de test de sensibilité des levures (témoin positif).

Après 24h, les boites de Pétri ont été examinées par la mesure de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle graduée (mm).

Les résultats ont été ensuite interprétés avec une échelle faite par l'institut pasteur, semblable à celle des antibiotiques, en déterminant si l'espèce est sensible (>15mm), intermédiaire (15 à 25mm) ou résistante (<15mm) *vis-à-vis* des extraits testés. Selon Biyiti et *al.* (2004), un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10mm.

5.3.2. Principe de la méthode dite de contact direct

Nous procédons de la même façon que dans la méthode précédemment décrite à savoir que les essais sont effectués sur des souches prises en phase exponentielle. En plus, le nombre initial (UFC/ml) des souches doit être également connus.

Les souches du genre *Candida* sont mises en contact direct avec les différentes concentrations des extraits testés

Les différentes concentrations (C_1, C_2, C_3, C_4, C_5) ont été mises en contact avec la dilution décimale 10^{-6} (21×10^6UFC/ml) pour *C albicans* et la dilution 10^{-5} pour *C tropicalis* (103×10^5UFC/ml) à raison de 50µl/50µl dans des tubes Eppendorf stériles (Al-Bayati, 2008).

Les boites sont incubées pendant 24h à 30°C. Après 24h d'incubation, le dénombrement se fait par le calcul du nombre de colonies présentes sur chaque boite. Ce nombre est multiplié par la dilution pour obtenir l'estimation du nombre de colonies en présence des extraits et comparé à la valeur initiale à T_0. .

- ***Estimation de la croissance fongique***

La croissance fongique est estimée en log (N) sachant que N représente le nombre d'unités formant les colonies par ml (UFC/ml). Elle est déterminée par le dénombrement des colonies après traitement par les extraits. Le log (N) estimé est comparé à celui du témoin.

- ***Estimation du taux d'inhibition de la croissance fongique***

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance fongique sont aussi exprimés en pourcentage (%) par rapport à la croissance de l'agent pathogène enregistré sur le témoin selon la formule suivante :

$$\textbf{Taux d'inhibition (\%)} = [(\log (N_{T0}) - \log (N_{TN})/ \log (N_{T0})] \times 100.$$

Avec :

Log (N_{T0}) : Croissance cellulaire au temps T_0 (témoin).

Log (N_{TN}) : Croissance cellulaire des traitements après 24h d'incubation.

7. Analyse statistique des données

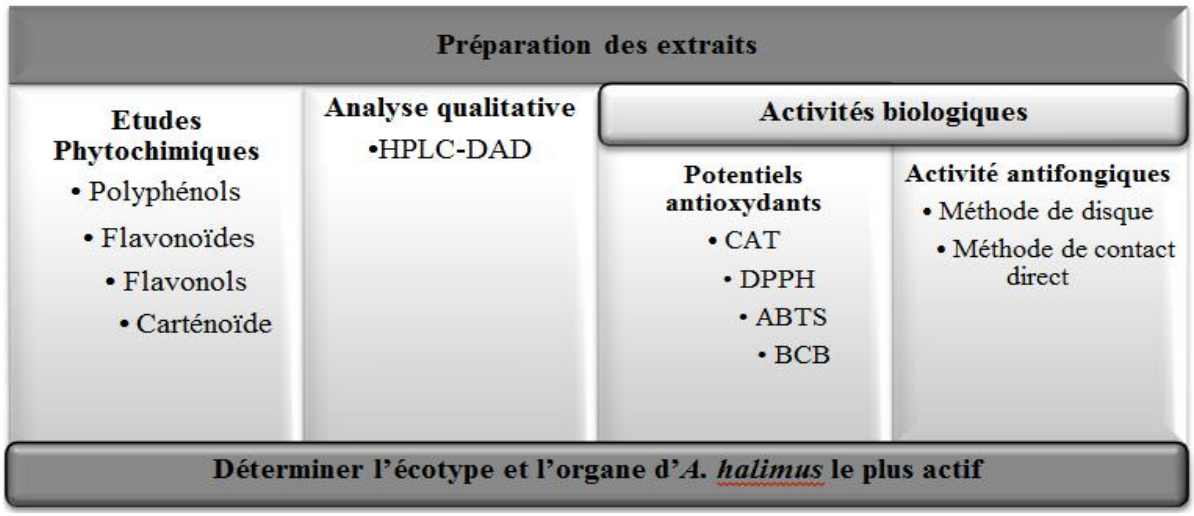
Toutes les analyses expérimentales (étude phythochimique et les activités biologiques des extraits des deux organes de l'*A. halimus* issus des trois localités) ont été réalisées en triplicata, ainsi que leurs résultats par une analyse de variance par le test ANOVA en employant le logiciel statistique *Stat box* (Version 6.4) ces derniers ont été représentés sous forme de moyenne ± Ecart type.

Les résultats sont considérés statistiquement non significatifs lorsque $p>0,05$ et significatif au risque de 5% quand $p\leq 0,05$. Le coefficient de corrélation de Pearson (r) a été aussi évalué par l'utilisation de l'outil Exel 2010. Il consiste à la comparaison de l'intensité de la relation entre les composés phénoliques, des différents extraits éthanoliques des trois écotypes étudiés d'*A. halimus* et les méthodes d'activité antioxydante (CAT, DPPH, ABTS et enfin le teste de BCB).

Chapitre II
Résultats et discussion

Introduction

L'évaluation des activités biologiques des plantes et plus particulièrement celle d'*A. halimus* L., but de notre recherche, nécessite la détermination des composants bioactifs (métabolites secondaires) présents dans leurs matrices par une succession d'étapes qui se résume dans : l'extraction, quantification et identification des molécules actives. Dans ce contexte, le procédé d'extraction par macération (Hydro-éthanoliques) est utilisé pour déterminer le contenu des feuilles et tiges de cette espèce végétale spontanée de trois régions Algériennes, dont les résultats sont présentés comme suit:



1. Analyse quantitative des molécules bioactives

1.1. Aspects, couleurs et rendements des extraits

Le tableau 5, représente les caractères physiques et le taux de productivité de chaque extrait éthanoliques brut lyophilisé par rapport à la poudre séché des feuilles et tiges de trois écotypes d'*A. halimus* L.

Tableau 5. Aspects, couleurs et rendements des extraits éthanoliques des feuilles et tiges des Différents écotypes d'*A. halimus* L.

Extraits hydro-éthanoliques	Couleur	Aspect	Rendement en %
FBis	Vert	Pâteux, huileux	15,30
TBis	Vert	Pâteux	13,25
FMaz	Vert claire	Lyophilisé	21,25
TMaz	Vert jaunâtre	Lyophilisé	5,21
FSig	Vert foncé	Pâteux, huileux	24,87
TSig	Vert	Pâteux huileux	7,81

F:feuille ; T: tige ; Bis: Biskra ; Maz: Mazagran

Les résultats sont relatifs à la comparaison entre les différents extraits hydro-éthanoliques non seulement dans le rendement mais aussi dans les propriétés physiques de ces derniers à savoir la couleur et l'aspect. Les observations visuelles des six échantillons se caractérisent par une couleur verte à vert foncée avec un aspect pâteux/huileux et parfois poudreux. D'après les résultats, il a été obtenu un rendement en extrait brut variant en fonction de l'origine de la plante et la nature de l'organe végétal étudié. Toutefois, les taux des extraits issus des feuilles des différents écotypes sont véritablement plus élevés par rapport à ceux des tiges. Néanmoins, une variabilité remarquable en extrait des trois écotypes a été notée, car le plus important est celui issu de l'écotype de Sig (24,87%) comparativement à ceux obtenus à partir des feuilles de Mazagran (21,25%) et de Biskra (15,30%). Par contre, un rendement relativement faible a été enregistré concernant des tiges de Biskra (13,25%), suivi de Sig (7,81%) et de Mazagran (5,21%). L'écart noté entre les échantillons est probablement dû au pourcentage d'eau dans le solvant; le mélange peut extraire des produits chimiques polaires et non polaires (Do, 2014). Bien que, le résultat de l'écotype de Sig est supérieur à ceux obtenus par Benhamou et *al.* (2014), où le rendement en extrait hydo-méthanolique de la même espèce végétale collecté du sud Algérien (Bechar) est de l'ordre de 24 et 7% pour les feuilles et les tiges, respectivement. Cette différence peut être, probablement, due aux méthodes et aux conditions d'extraction. Les différences obtenues peuvent être expliqué, selon Trabelsi et *al*. (2010); Mussato et *al*. (2011) ainsi que Mohammedi et Atik (2011), par l'utilisation de solvants mixtes (éthanol ou méthanol aqueux), aboutissant à un fort enrichissement des extraits en polyphénols et ce par apport aux solvants bruts. Ceci induit une augmentation significative du rendement d'extraction. Ce comportement est également expliqué par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires. Par conséquence, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction (Mussato et *al.*,

2011). Il était difficile de comparer ces résultats avec des travaux antérieurs car, à notre connaissance, aucune donnée sur les trois écotypes d'*A. halimus* n'a été publiée.

1.2. Teneurs et concentrations des métabolites secondaires (Polyphénols totaux"PT", flavonoides totaux "FT", flavonols totaux "FLT" et les caroténoïdes totaux "CT").

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement, en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), soit lui permettant de résister aux diverses agressions du milieu biologique (organismes pathogènes), et participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheïx et *al*, 2005).

D'un point de vue application, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et indirectement sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheïx et *al*, 2005). La détermination de la concentration des polyphénols totaux, flavonoïdes, flavonols ainsi que les caroténoïdes d'*A. halimus* a été réalisée à partir des courbes des étalonnages établies par l'acide gallique, la rutine et la ß-carotène, respectivement.

1.2.1. Composés phénoliques totaux (CPT)

La teneur et la concentration des polyphénols totaux de chacun des extraits de feuilles et tiges d'*A. halimus* sont déterminées par l'application de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage « y= 0,0074x » (Fig. 19).

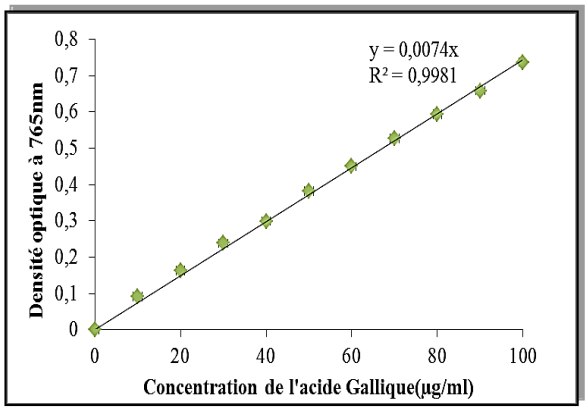


Figure 19. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

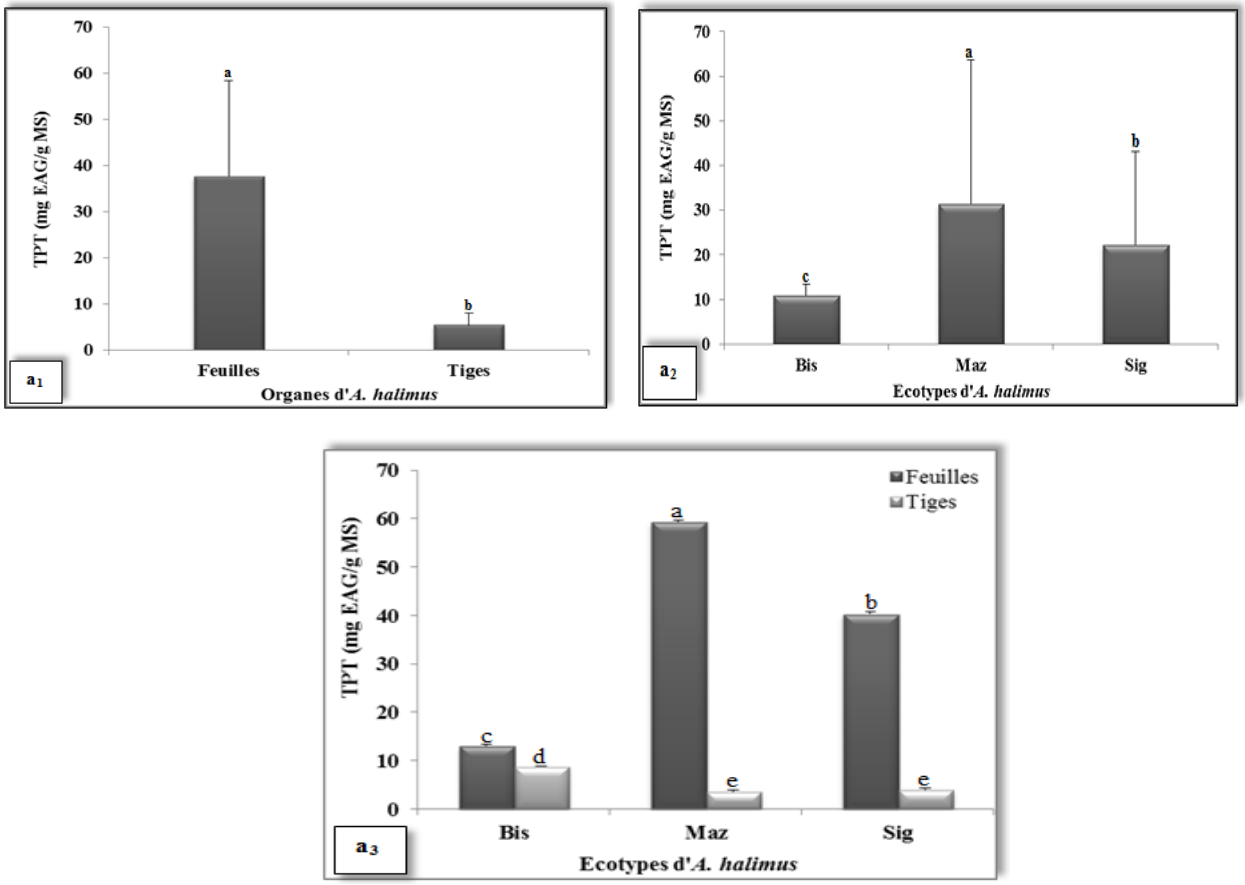


Figure 20. Teneurs (**a_1, a_2, a_3**) des extraits éthanoliques en polyphénols totaux des feuilles et tiges *d'A. halimus*, issus des trois régions algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

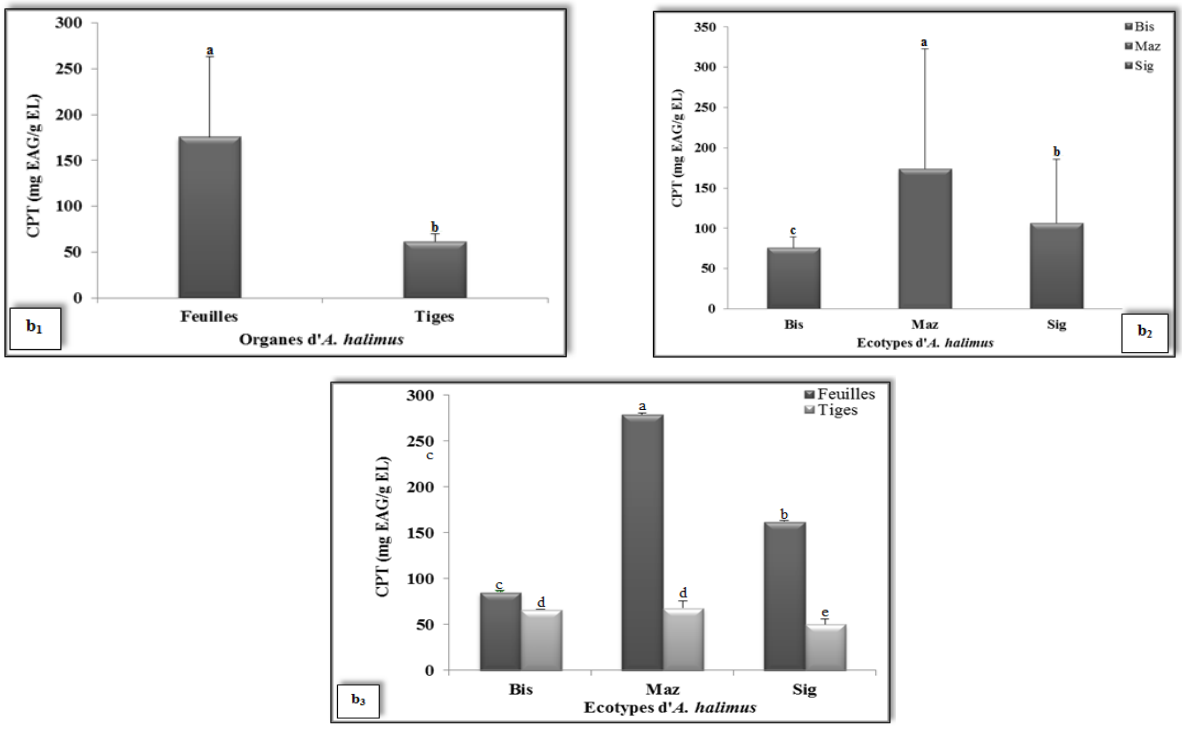


Figure 21. Concentrations des polyphénols totaux (**b_1, b_2 et b_3**) des extraits des feuilles et tiges *d'A. halimus*, issus des trois régions algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

Les analyses statistiques des données montrent des différences significatives en composés polyphénoliques totaux entre les trois écotypes d'*A. halimus* (Bis, Maz et Sig), et les organes étudiés (feuilles et tiges) (annexe 1, Tab. 9 -11 ; 10 et 13). En effet, les teneurs moyennes, tous organes confondus, relevées sur les écotypes consignés dans la figure $20a_2$, classées dans un ordre décroissant, se chiffrent à : 31,45±32,22 (Maz), 22,14±21,02 (Sig) et 10,92±2,45 mg EAG/g MS (Bis). Alors que leurs concentrations, de l'ordre de : 173,72±149,35 - 106,31±79,05 et 75,81±13.31mg EAG/g EL, sont observées respectivement sur les échantillons provenant de Mazagran, Biskra et Sig. (Fig. $21b_2$). Dans le même contexte (Fig. $20a_1$, Fig. $21b_1$), le facteur organe indique des moyennes largement différentes (feuilles=37,58±20,82mg EAG/g MS - 175,59±87,42 mg EAG/g EL; tiges=5,43±2,62mg EAG/g MS - 61,64±8.73 mg EAG/g EL).

Comparativement à ceux de Biskra (13,04±0,25 mg EAG/g MS - 85,23±1,61mg EAG/g EL) (Fig. $20a_3$, Fig. $21b_3$), les extraits de feuilles de Mazagran (59,36±0,22mg EAG/g MS - 279,33±1,17 mg EAG/g EL) et Sig (40,34±0,33mg EAG/g MS - 162,21±1,48mg EAG/g EL) semblent être plus riches en composés phénoliques totaux, D'une manière générale, ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues par Benhammou *et al.* (2014) et Chikhi et *al*. (2014), sur les extraits aqueux et hydro-méthanoliques des feuilles de la même espèce végétale issue de Bechar et Tlemcen avec respectivement 12,47 et 10,12±0,24mg EAG/g MS. En revanche, les extraits issus des tiges provenant de Biskra sont plus concentrés en ces composants (8,80±0,08mg EAG/g MS) par rapport à ceux de Mazagran et Sig ayant montrés des teneurs comparables (3,35±0,36 - 3,94±0,40mg EAG/g MS). Les quantités de composés phénoliques totaux constatées dans les lyophilisats de Mazagran et Biskra (68,11±6,94 - 66,42±0,62mg EAG/g EL, respectivement) sont plus élevées que ceux de Sig (50,41±5,18mg EAG/g EL). Ces derniers résultats sont en accord avec Benhammou et *al*. (2013). Il a été constaté aussi que la quantité de ces métabolites secondaires présents dans les extraits éthanoliques des tiges de Biskra est supérieure à celle des extraits hydro-méthanoliques des tiges de Bechar (Benhammou et *al*., 2014). Cependant, le profil des polyphénols tend à varier avec l'espèce et son origine, car les études menées par Vilela et *al*. (2014) ; Benhammou et *al*. (2013), sur d'autres espèces halophytes (*Alimione portulacoides* L. du Portugal et *Anabsis articulata* de Bechar), indiquent des teneurs plus élevées dans leurs extraits de tiges comparativement à ceux testés.

Quel que soit l'origine de l'espèce végétale étudiée, l'accumulation des composés phénoliques dans les feuilles, contrairement aux tiges, s'explique par le fait que les feuilles constituent un réservoir de synthèse de polyphénols. La répartition inégale dans les différents organes d'une même plante a été rapporté par plusieurs auteurs (Fellah et *al*., 2007 ; N'Guessan et *al*., 2011 ; El-haci et *al*., 2012). En outre, la quantité disponible varie selon un certain nombre de facteurs : les conditions

environnementales comme le degré de salinité et de sécheresse (Kousri et *al*., 2011 ; Falleh, 2012), la localisation géographique (Ebrahimzadeh et *al*., 2008), le stade de maturation et la période de cueillette (Theerawitaya, 2014). Les variations précédentes sont dues selon Ebrahimzadeh et *al*. (2008) aux parties végétales testées et au facteur génétique. Dans cette études, la modulation dans les teneurs en polyphénols entre les spécimens utilisés et celle d'autres expérimentations, est probablement influencée par la méthode d'extraction (Hasmida et *al.*, 2014, Bouzouina, 2016) et le solvant utilisé (différence de polarité) (Mohammedi et Atik, 2011 ; Jain et *al*., 2014, Sanda et *al*., 2015).

1.2.2. Flavonoïdes totaux (FT)

La teneur et la concentration des flavonoïdes totaux de chacun des échantillons est révélée par l'emploie de la formule (y= 0,0017x) obtenus à partir de la courbe d'étalonnage établie par la rutine (Fig. 22).

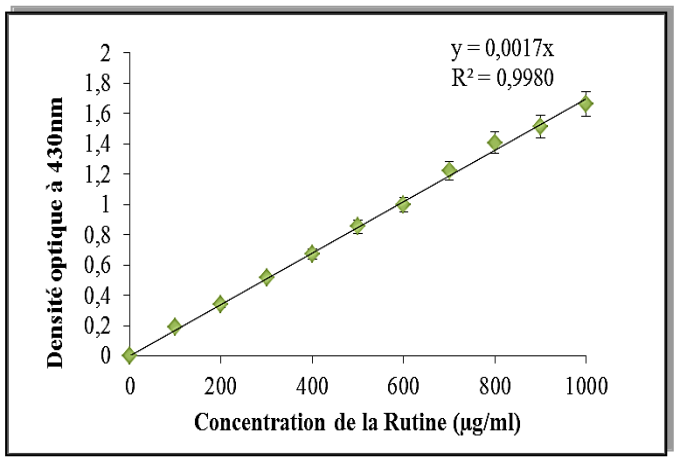


Figure 22. Courbe d'étalonnage de la Rutine

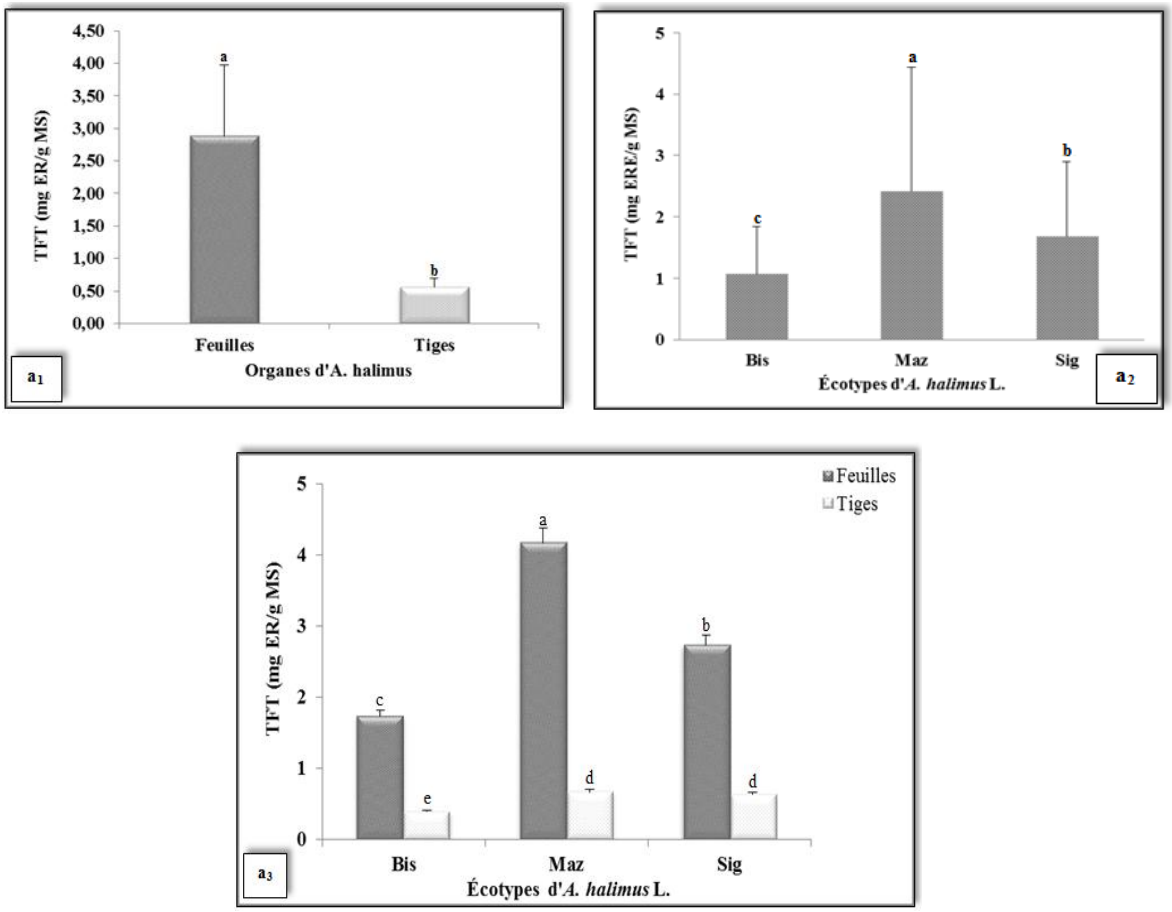


Figure 23. Teneurs des flavonoïdes totaux **(a_1, a_2 et a_3)** des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

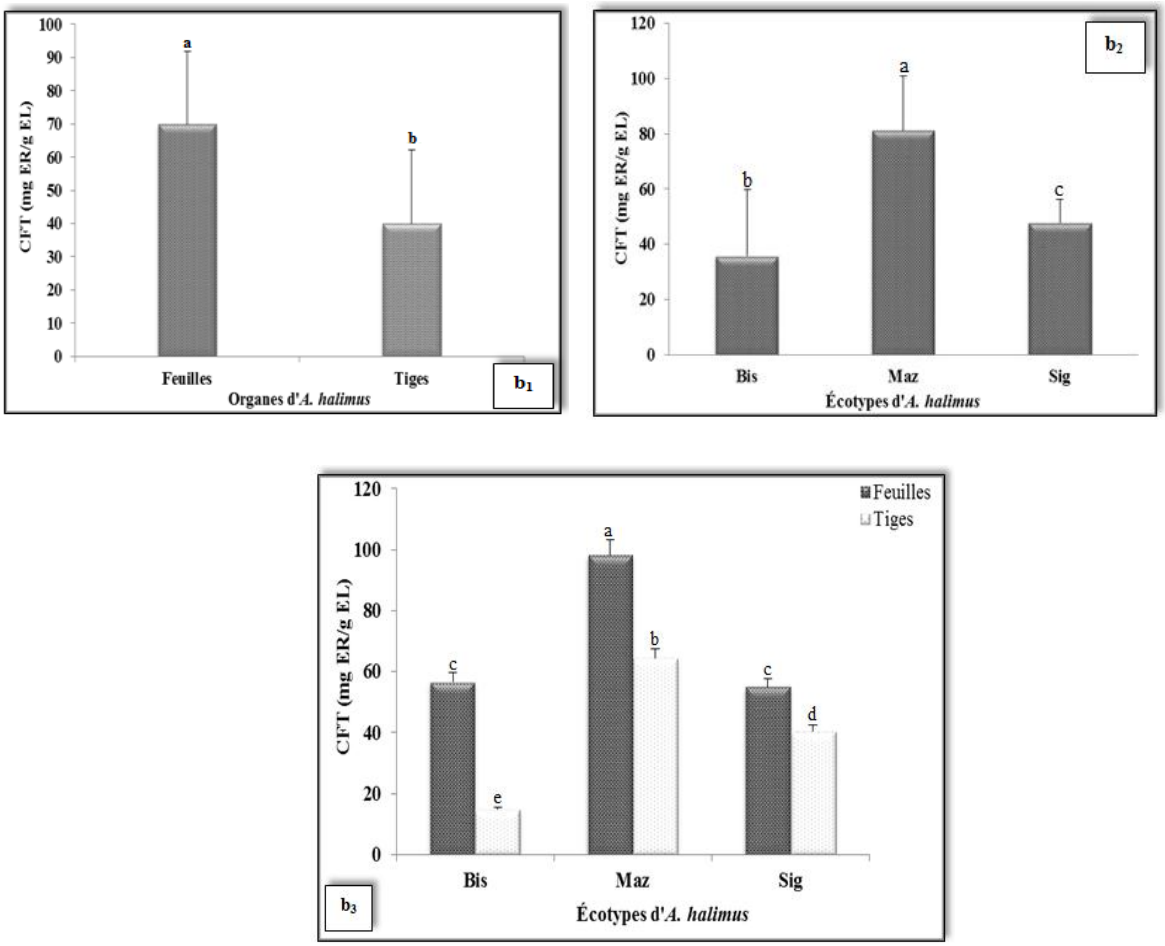


Figure 24. Concentrations des flavonoïdes totaux **(b_1, b_2 et b_3)** des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur 5%(*)].

Les résultats des flavonoïdes présentés dans les figures 23 et 24 montrent une variation considérablement remarquée entres les différentes provenances d'*A. halimus*, de même entre les organes (annexe. 1, Tab. 9 et 12). Comme les composés phénoliques totaux, les teneurs et les concentrations des flavonoïdes (2,88±1.10mg ER/g MS et 69,97±21,87mg ER/g EL, respectivement) sont plus importantes dans les feuilles par rapport aux tiges (0,57±0,13mg ER/g MS, 39,90±22,14mg ER/g EL). Les valeurs les plus élevées ont été notées par les feuilles de Mazagran avec une teneur de l'ordre de 4,17±0,06mg ER/g MS et une concentration de 98,20±1,35mg équivalent rutine dans un gramme d'extrait sec, suivies de celles de Sig (2,74±0.01mg ER/g MS, 55,02±0,12mg ER/g EL) et de Biskra (1,74mg ER/g MS et 56,71±1,46mg ER/g EL) (Fig 23a_3, Fig 24b_3). Parallèlement, de faibles quantités de flavonoïdes ont été détectées au niveau des tiges des trois régions qui n'excédaient jamais les 0,67mg ER/g MS). Les extraits lyophilisés (Fig 24$b_{3)}$ des tiges de Mazagran (64,35± 0,36mg ER/g EL) et Sig (40,47±0,31mg ER/g EL) apparaissent plus concentrés en flavonoïdes que ceux de Biskra (14,86±0,80mg ER/g EL).

1.2.3. Flavonols totaux (FLT)

La concentration et la teneur en flavonols totaux des extraits sont estimées par apport à une courbe de régression d'étalonnage de la rutine (Fig. 25).

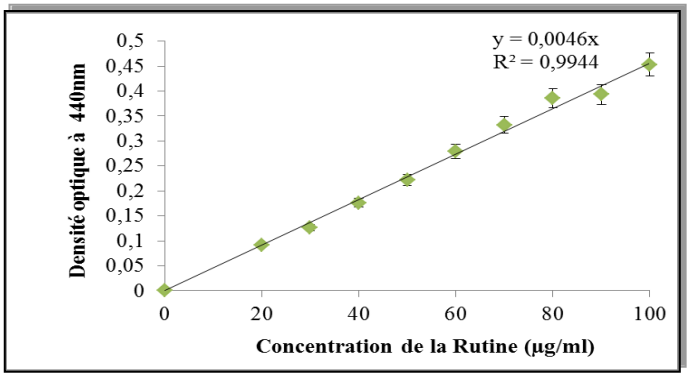


Figure 25. Courbe d'étalonnage de la rutine.

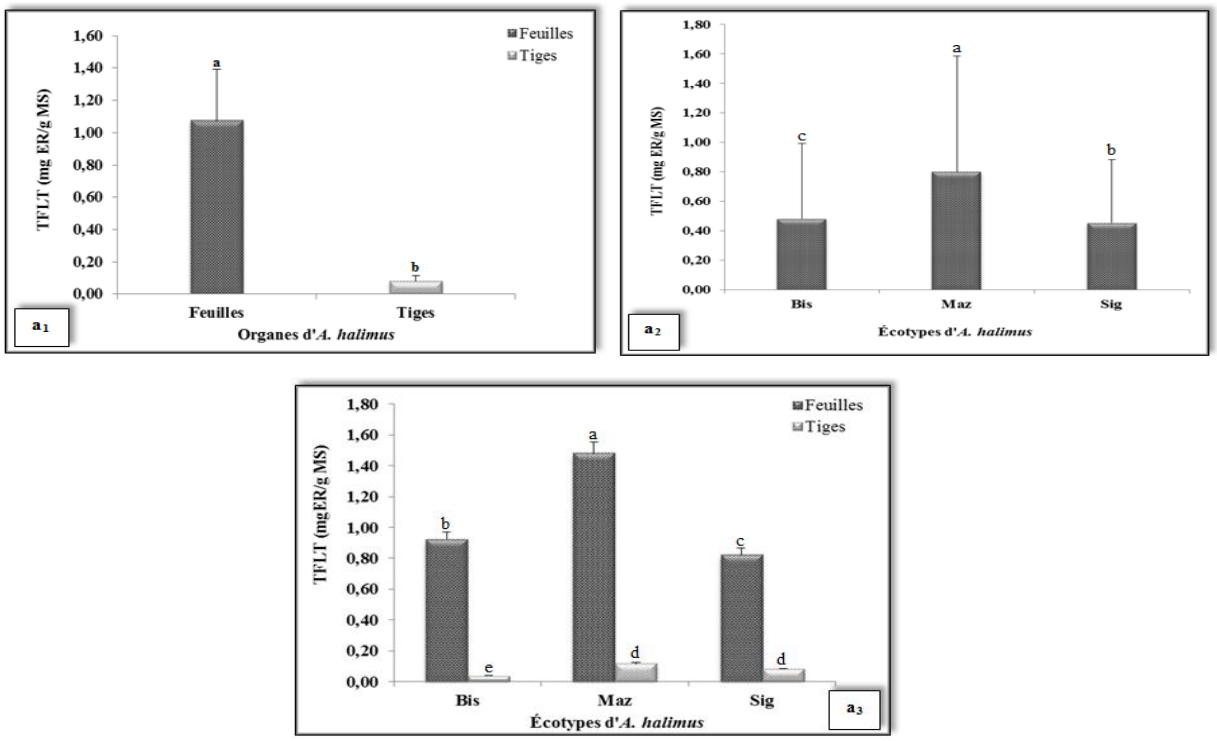


Figure 26. Teneurs **(a_1, a_2 et a_3)** des flavonols totaux dans les extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

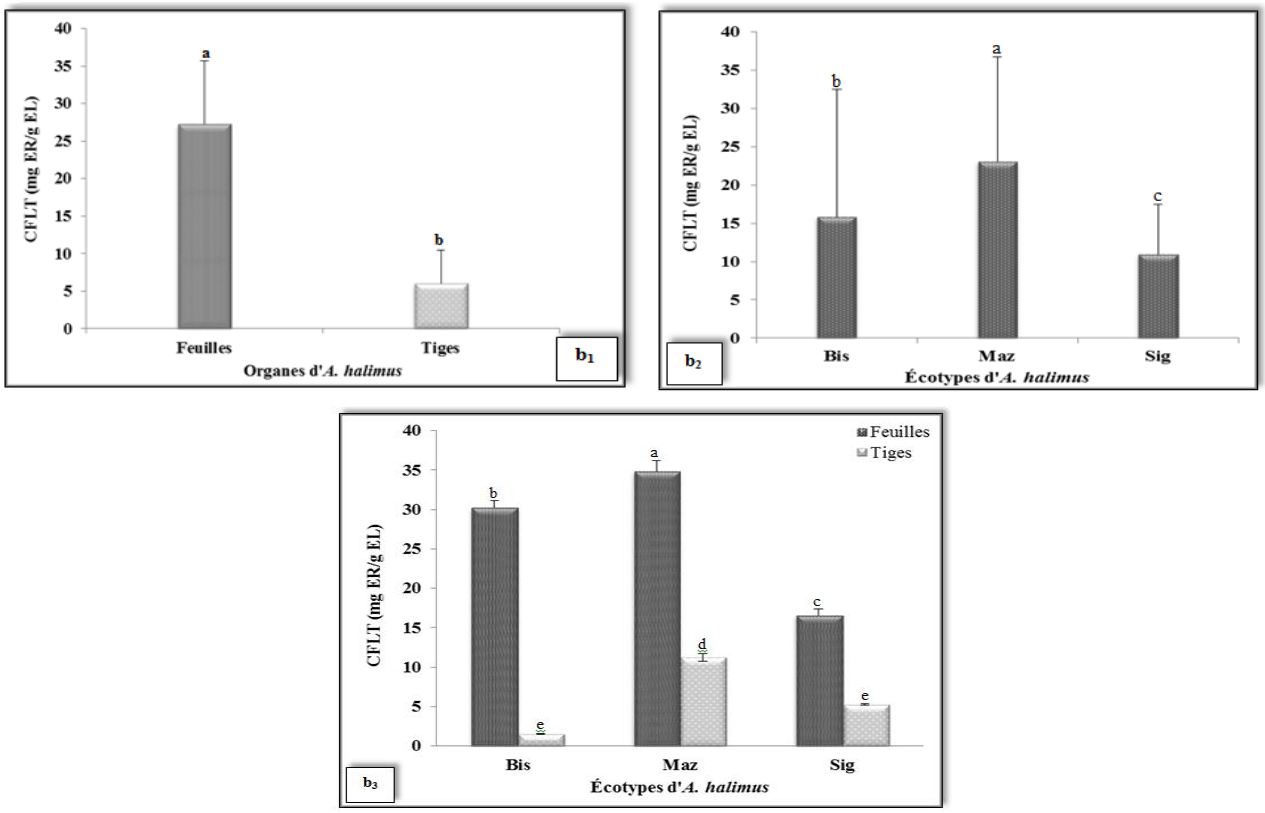


Figure 27. Concentrations **(b_1, b_2 et b_3)** des flavonols totaux (FLT) dans les extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algériennes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

En examinant les résultats présentés dans les figures 26 et 27, il paraît nettement que la localisation de ces composants est essentiellement située dans les feuilles des trois écotypes (1,08±0,32mg ER /g MS - 27,22±8,49 mg ER /g EL). Par écotypes, il a été enregistré des teneurs et des concentrations variables, soit 1,48±0,05mg ER/g MS, 34,87 ±1,32mg ER/g EL pour Mazagran, suivi par celles de Biskra (0,92±0,03mg ER/g MS - 30,20±0,92mg ER/g EL). Alors que celles de la région de Sig, relativement les moins importantes, se chiffrent à 0,82±0,04mg ER/g MS (teneur) et 16,59±0,77mgER/g EL (concentration). Inversement aux feuilles, des concentrations et teneurs faibles en flavonols ont été notées : 0,08±0,035 mg ER /g MS - 6,01±4,37 mg ER /g EL, respectivement (Fig. 26a_1 et 27b_1). En outre, les flavonols de Biskra (teneur= 1,54 ±0,07mg ER/g EL –concentration= 0,04 mg ER/g MS) se sont montrées les moins abondants. Cependant, les tiges de Mazagran et Sig accumulent respectivement 0,12±0,01–0,08mg ER/g MS et leur extraits lyophilisés 11,23±0,52 et 5,28±0.10 mg ER/g EL.

En raison de l'emploie de différentes méthodes d'extraction, de solvants variés, ainsi que les standards d'étalonnages, la comparaison des résultats de quantification des flavonoïdes et des

flavonols totaux par apport à ceux de la littérature ou obtenus par des études antécédentes est difficile.

1.3. Caroténoïdes (TCT)

La quantification des caroténoïdes totaux des extraits étudiés est évaluée par l'application de la formule de régression linéaire de ß-carotène (y=0,118x) (Fig. 28).

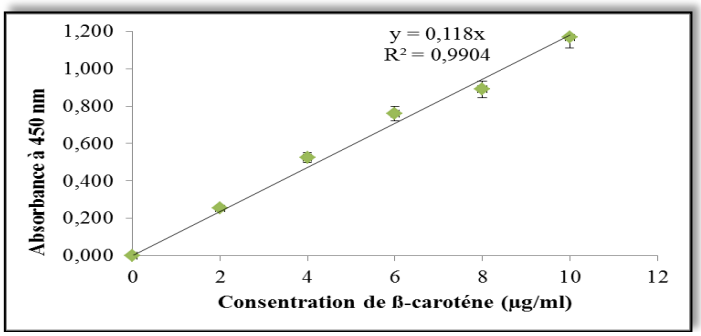


Figure 28. Courbe d'étalonnage de ß-carotène

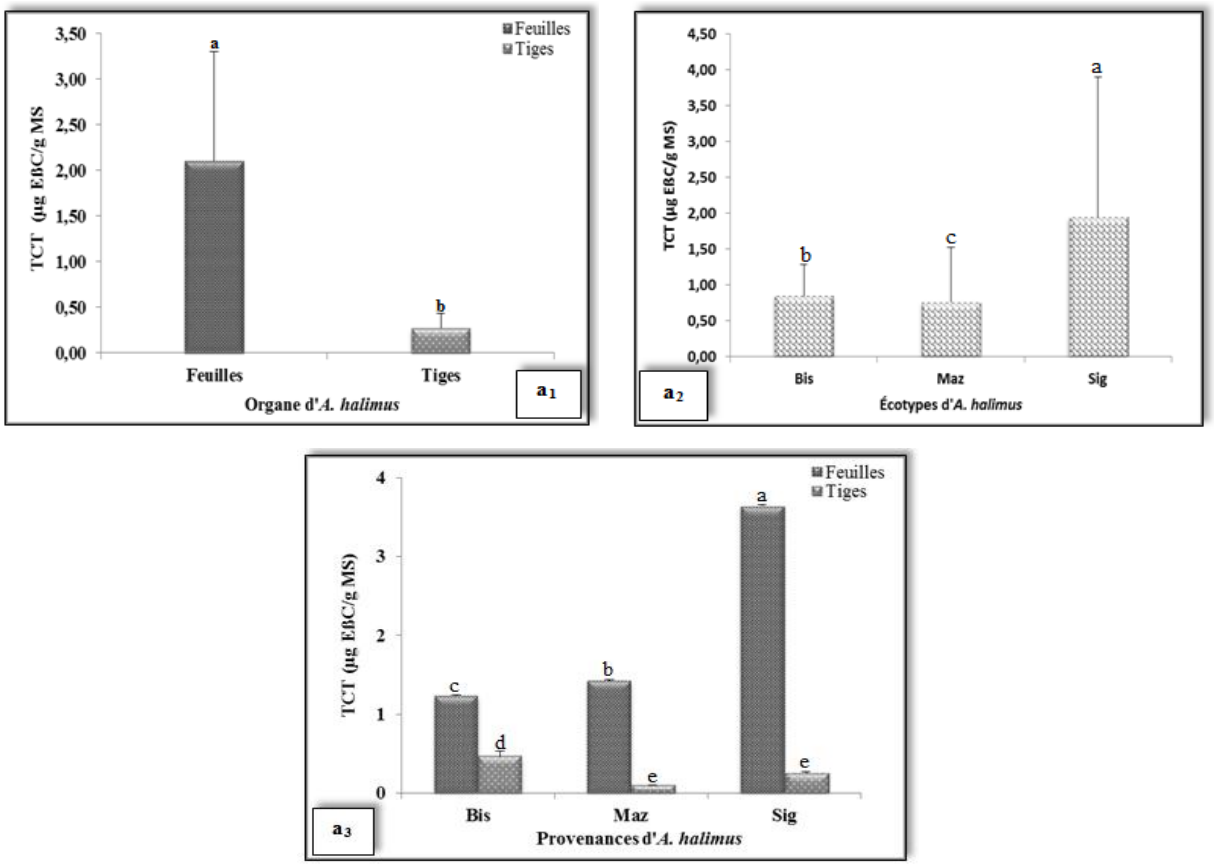


Figure 29. Teneur (**a_1, a_2 et a_3**) des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algérienne en caroténoïdes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

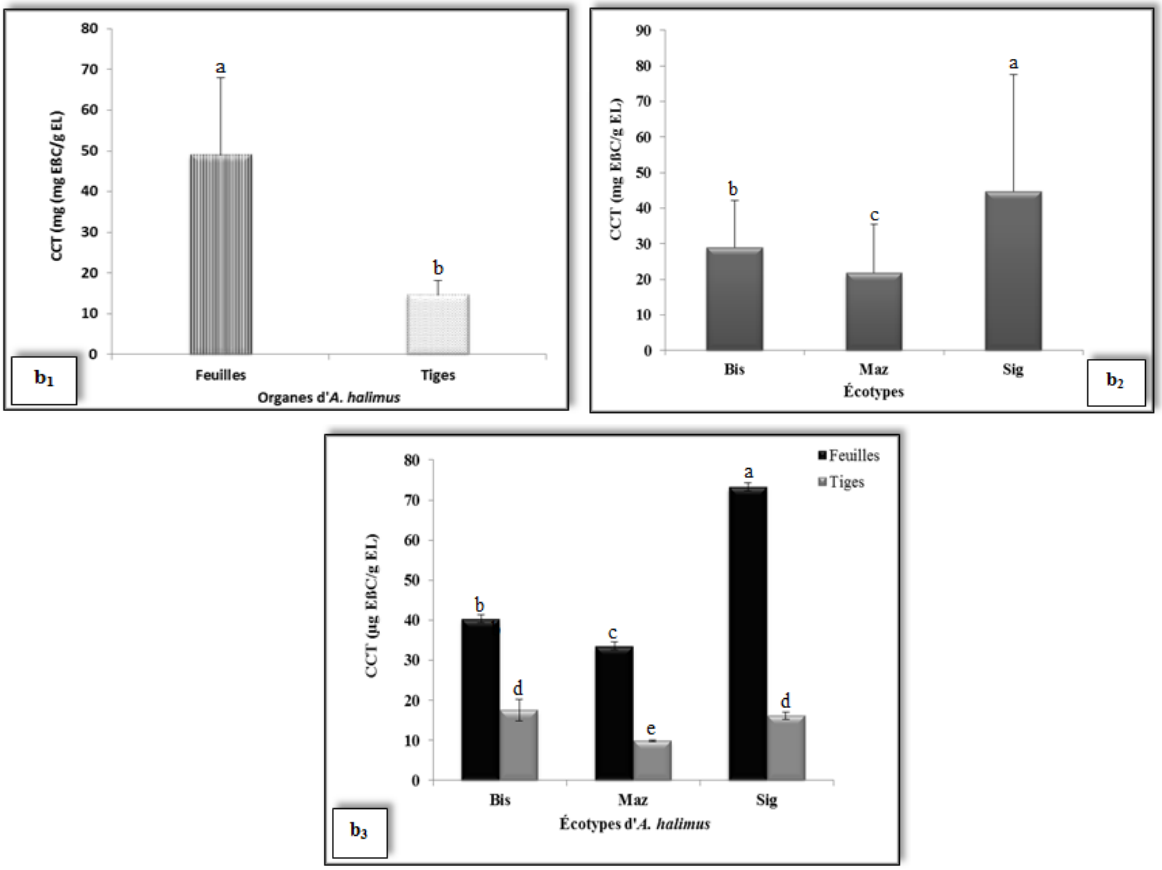


Figure 30. Concentration (**b_1, b_2 et b_3**) des extraits des deux parties aériennes *d'A. halimus* issus des trois régions Algérienne en caroténoïdes [Test d'ANOVA risque d'erreur de 5%(*)].

En se basant sur les résultats de quantification des caroténoïdes totaux des différents extraits étudiés, consignés dans les figures 29 et 30, des différences significatives entres les écotypes (annexe 1, Tab. 10 et 13) ont été aussi constatées. Dans les extraits de feuilles de Sig, un gramme de matière sèche et un gramme de lyophilisat contiennent respectivement, en équivalent ß-carotène, 3,64µg et 73µg. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par les écotypes de Biskra et de Mazagran, où des teneurs de l'ordre de 1,23±0,01 et 1,43±0,01µg EßC/g MS, et des concentrations de 41et 33µg EßC/g EL ont été enregistrées, respectivement.

Les plus faibles teneurs et concentrations en ces pigments ont été observées dans les tiges (Fig $29a_1$ et $30b_1$) avec des valeurs variant d'un écotype à l'autre. En effet, les extraits de Biskra et Sig enregistrent 0,47±0,07 – 0,25±0,02µg EßC/g MS et 17±3,00 - 16µg EßC/g EL, respectivement. Ces provenances renferment des quantités légèrement importantes par apport à celle de Mazagran (0,10 µg EßC/g MS - 10µgEßC/g EL) (annexe 1, Tab 11 et 14).

Dans cette étude, les résultats varient fortement d'un écotype à un autre, et aussi au sein du même écotype à la suite de la mise en place de mécanismes d'adaptation des feuilles à leur

environnement. Car l'équipement pigmentaire foliaire est conditionné par divers facteurs (la luminosité, la température et autres facteurs environnementaux). Ajouté à cet effet le stade de développement des feuilles (Féret, 2009) qui constitue l'un des plus importants facteurs influençant la teneur en caroténoïdes. Cette suggestion est clairement apparente dans ces résultats, car les feuilles de Biskra et Sig sont les plus riches en ce composant par rapport à ceux de Mazagran.

Féret (2009) explique que lorsque la feuille arrive à maturité et commence à fournir les éléments nécessaires à la croissance de la plante, l'appareil pigmentaire contrôle ses propriétés optiques dans le domaine visible en raison de la forte concentration en chlorophylle et caroténoïdes. Une fois cette phase de maturité passée, la feuille débute la sénescence et une partie des éléments de la feuille est mobilisée vers les organes de stockage. La teneur en caroténoïdes diminue moins vite durant la sénescence, car ceux-ci sont plus stables (Biswal, 1995). Ceci peut expliquer la quantité révélée dans les feuilles de Biskra. Les caroténoïdes participent alors très activement dans ce stade de sénescence à la photo-protection de la feuille (Merzlyak et Gitelson, 1995).

Il est à signaler que la quantification de ces pigments dans les deux organes de cette espèce halophyte n'a pas été évoquée par d'autres recherches scientifiques. Cependant, sur les extraits méthanoliques des tiges d'une autre espèce « *Anabasis articulata* », le travail mené par Benhammou (2013) montre des teneurs largement importantes, soit 0,27mg/g MS. Les comparaisons observées sont probablement dues aux différences entre les méthodes et les conditions d'extraction, ainsi que les solvants utilisés (Bouzouina et *al*., 2016).

2. Identification et analyse qualitative des molécules bioactives par CLHP-DAD

L'identification des métabolites secondaires, dans les extraits de l'*A. halimus* par le procédé HPLC-DAD et à une longueur d'onde de 280nm, a révélé la présence en total de 25 molécules bioactives. La comparaison de leurs temps de rétention (tR) ainsi que leurs lamda max (λ_{max}) avec ceux rapportés dans la bibliographie décèle l'existence une différence qualitative dans les profils de ces composés phénoliques (Fig. 31). L'identité et les structures moléculaires proposées sont rapportées dans les tableaux 6 et 7. Cette analyse a révélé différentes classes des composés phénoliques, dont cinq acides phénoliques incluant quatre acides hydroxybenzoïque (Acides Gallique, vanillique derivative, acide *p*-Hydroxybenzoïque et acide Benzoïque dérivative) et un acide hydroxycinnamique (Acide quinique dérivative), en plus de vingt flavonoïdes identifiés et regroupés en trois classes distinctes :

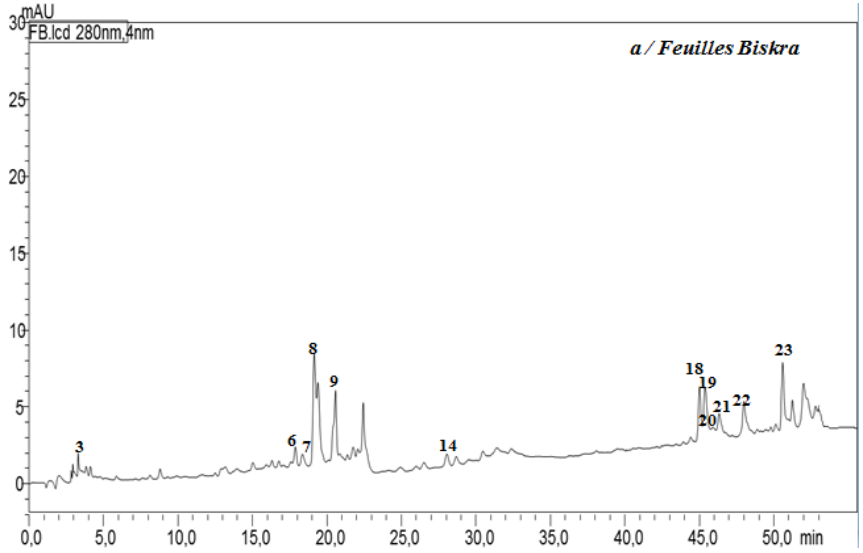
1) Les flavones, en particulier les *O* et *C*-glucosides représentés par l'Apigénine et Luteoline ;
2) Les flavonols, dérivés d'aglycones ; Quercetine, Isorhamnétine, Kaempférole ;
3) Les flavanones qui sont composées de Naringénine, Hespéridine avec ces glucosides.

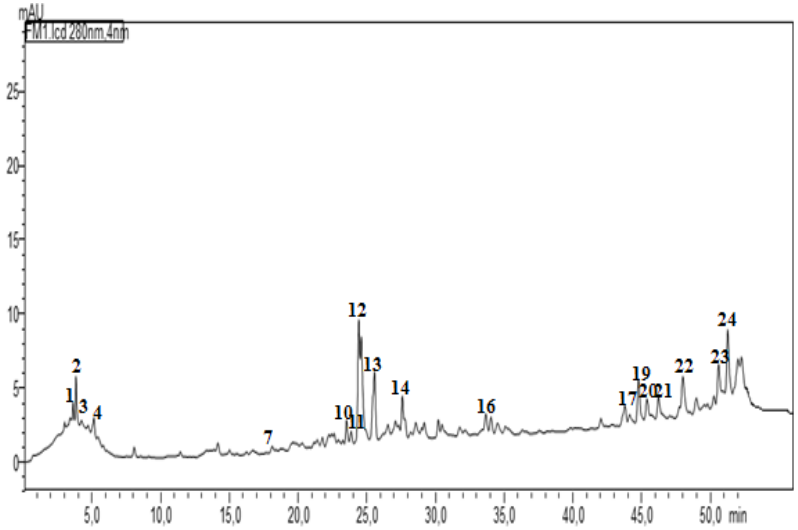
Les extraits de feuilles présentent des profils polyphénoliques plus complexes (Vilela et *al.*, 2014) avec 25 composés dont 20 flavonoïdes et 5 acides phénoliques, par apport aux extraits de tiges ayant montré l'absence des acides phénoliques et avec seulement neufs flavonoïdes différents, dont deux flavanones (pics 17 et 21), quatre flavonols (pics 18, 19, 22 et 23) et deux flavone (pic 20 et 24). Cette répartition varie selon l'écotype testé. Alors que certains pics comme 19, 21,22 et 23 sont communs pour tous les extraits (feuilles, tiges). Comparativement aux feuilles de Biskra, les résultats obtenus montrent une dominance qualitatives des extraits de feuilles de Sig et de Mazagran, par la présence des acides phénoliques suivants : Acide gallique, dérivé d'acide vanilique, acide *p*-hydroxybenzoïque et dérivé d'acide benzoïque, représentés respectivement par les pics 1, 2, 4 et 5 et élués à des temps de rétention de 3,57-3,7-5,54 et 6,79mn, à l'exception de l'acide hydroxycinnamique (dérivé de l'acide quinique) qui a été identifié à 4,15mn dans les extraits de feuilles des trois provenances (Biskra, Sig et Mazagran). Entre outre, l'abondance des flavonols glycosylés comme la quercetine-7-*O*-neohesperidoside (Pic 19), Kaempférol-3,7-*O*-diglucoside et Kaempférol-3-glucoside (Pic 22 et 23), dans les différents échantillons a été remarqué quel que soit la partie végétale étudiée et son lieu de récolté. En revanche, d'autres flavonols ont été identifiés seulement dans les feuilles de Mazagran et Sig ; Glucoside de l'isorhamnétine (Isorhamnetin-3-*O*-(2″,6″ dirhamnosyl)-glucoside et des glucosides de quercétine (Quercetin-7-O-glucoside-3-*O*-rutinoside (Rutine), quercitine-3-glucoside (Isoquercitrine) en pics 12, 13 et 14 et élués à 25,14 ; 25,54 et 27,55mn, respectivement. Cependant, les feuilles de Biskra sont caractérisés par la présence de la quercétine 3-*O*-(2″,6″ dirhamnosyl)-glucoside et isorhamnétine-3-O-rutinoside (Narcissine) en pics 8 et 9 et détectés à 19,39 et 20,56mn, respectivement. En plus, les écotypes de Sig, Mazagran et Biskra semblent aussi être caractérisés par la présence des flavones de structures différentes. En effet, les *O*-glycosyle flavone, Lutéoline-7-*O*-rutinoside (Véronicastroside) (pics 7 et 10 ; tR= 18,08 - 23,51 ; λ_{max}= 221-272 et 350, respectivement) et *O*-*C*-glycosyle flavone : l'Apigénin-6,8-di-*C*-glucoside (Vicénine-2) (pic 20 ; tR=45,49 ; λ_{max}= 227-326) caractérisent les feuilles. En plus, de l'apigénine-7-*O*-néohéspéridoside (Rhoifoline) (pic 6), la Luteolin-6,8-di-*C*-glucoside (Lucénine-2) (pic 15) et l'apeginine (pic 25) ont été aussi, détecté dans les feuilles de Sig à 17,34 - 31,34 et 52,02mn, respectivement. Néanmoins, apigénine-7-*O*-glucoside (pic 24) éluée à 51,28mn est le *O*-glycosyle flavone caractéristique des tiges des trois provenances de l'*A. halimus* en dehors des feuilles de Mazagran et Sig. L'apigénine (6 et 25) à des temps de rétention variables (17,34, 52,02mn) ont été révélées dans la matrice des tiges de Biskra. L'identification qualitative des composés bioactives des échantillons indique également, la présence de 3 molécules de flavanones: hespéridine (pic 21, λ_{max}= 281-327 à 46,55mn), naringenine-7-*O*-glucoside (Prunine) (pic 11, λmax= 291-332 à 23,84) et naringénine (pic 17) sont présents dans les feuilles de Mazagran. Par contre, les

extraits de Sig (tiges et feuilles) et Biskra (tiges) indiquent la présence de la naringénine (pic 17) à 44,28mn. L'hespéridine (pic 21) a été également identifié dans les feuilles de Biskra à 46,55mn.

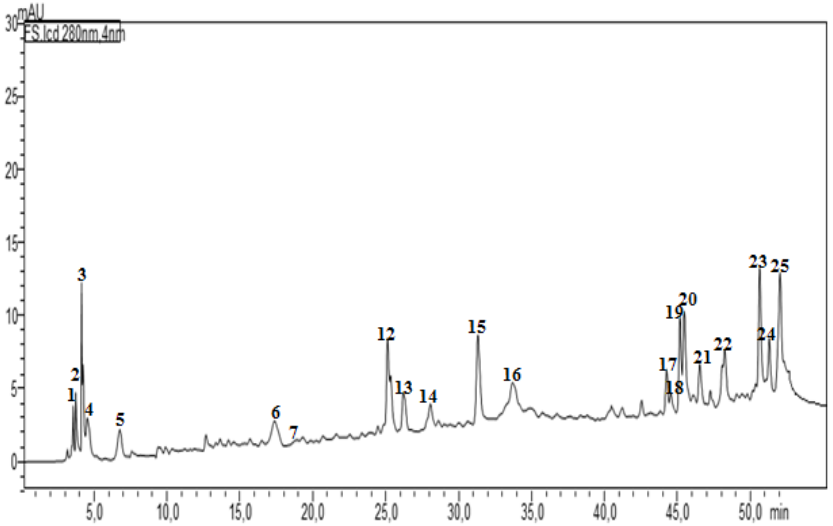
Ces résultats confirment les travaux d'Emam (2011). Celui-ci a montré la richesse de l'*A. halimus* d'Egypte (Wadi-surd) en flavonoïdes et particulièrement en flavonols, flavanones, flavones et isoflavone glycosides, mais typiquement différents à ceux détectés dans ce projet, à l'exception de la Vicénine-2 et l' Hespéridine ainsi que l'acide gallique. Par contre, les recherches menées par Al-Jaber et *al.* (1991), sur une autre espèce halophyte (*A. farinosa*) indiquent les mêmes molécules que celles ayant été identifiées chez *A. halimus*. Ainsi, Bylka et *al.* (2001) met en évidence la présence de flavonols aglycones tels que kaempférol, quercétine, isorhamnétine, parfois patulétine, spinacétine et Tricine. Cependant, le Kaempférole-3-*O*-sulphate-7-*O*-arabinopyranoside et quercétine 3-*O*-sulphate-7-*O*-arabinopyranoside ont été isolés dans les feuilles d'une autre espèce d'*Atriplex* (*A. hortensi*).

En vue de ces résultats, les différences quantitatives et qualitatives des composés phénoliques, en particulier des flavonoïdes et des acides phénoliques entres les différents écotypes et organes d'*A. halimus* sont peut-être dues aux facteurs relatifs à l'écosystème (Climat, nature du sol, pluviométrie, etc.). Ainsi, les caractéristiques des zones géographiques de provenance des échantillons, les périodes d'échantillonnage et les différentes méthodes d'extraction employée.





b/ Feuilles Mazagran



C/ Feuilles Sig

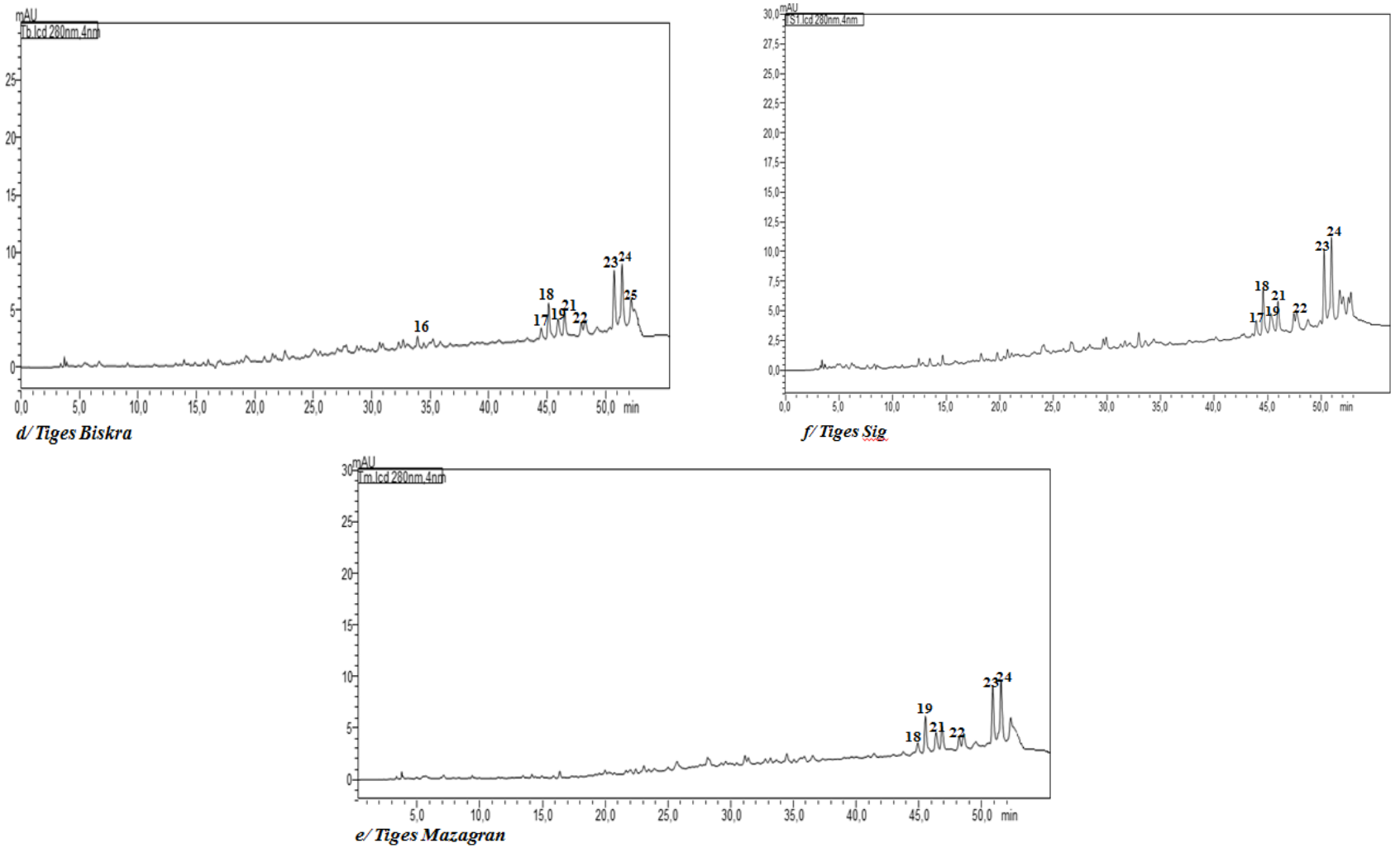


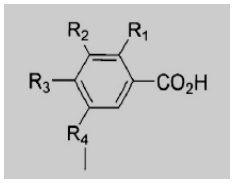
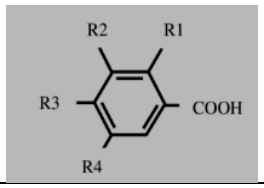
Figure 31. Profils phytochimiques des extraits éthanoliques d'*A. halimus* des feuilles et des tiges de Biskra (a, d), de Sig (c, f) et de Mazagran (b, e) par la méthode de chromatographie à haute performance (HPLC-DAD) à 280 nm.

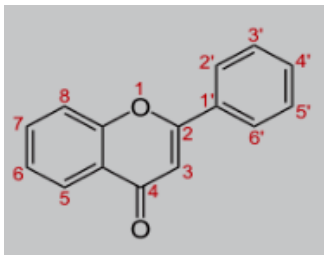
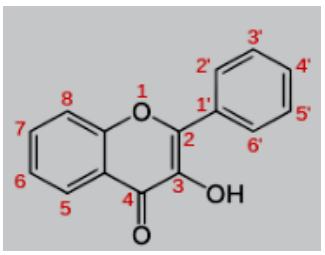
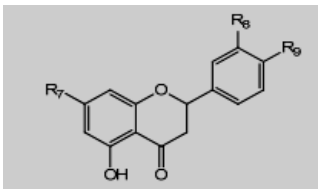
Tableau 6. Identification des métabolites secondaires des extraits de l'*A. halimus* par la méthode HPLC-DAD.

Pic	tR	λ max	Molécules biochimiques proposées	Formules chimiques	extraits caractéristiques	Référence
1	3,57	277	Acide Gallique	$C_7H_6O_5$	FSig FMaz	Medina-Medrano et *al*., 2017
2	3,7	260	Acide 4-hydroxy-3-methoxybenzoïque (acide vanillique derivative)	$C_8H_8O_4$	FSig FMaz	Lin et Harlny, 2013 Arimboor et *al*., 2008
3	4,15	260	1, 3, 4, 5-tétrahydroxycyclohexanecarboxylique (acide Quinique dérivative)		FSig, FMaz FBis	Hung-Ju,2012
4	4,54	261	Acide *p*-Hydroxybenzoique	$C_7H_6O_3$	FSig FMaz	Arimboor et *al*., 2008
5	6,79	254	Acide benzoïque derivative	$C_7H_6O_2$	FSig	
6	17,34	230 338	Apigénine 7-*O*-neohesperidoside (Rhoifoline)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	FSig FBis	Wang et *a*l.,2016
7	18,08	221 272	Lutéoline-7-*O*-rutinoside (Véronicastroside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	FSig FBis FMaz	Simirgiotis et *al*., 2015, Brito et *al*.,2014
8	19,39	254 355	Quercetin 3-*O*-(2″,6″ dirhamnosyl)-glucoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	FBis	Jang et *al*., 2018
9	20,56	254 354	Isorhamnétine 3-*O*-rutinoside (Narcissin)	$C_{28}H_{32}O_{16}$	FBis	Hung-Ju et *al*.,2012
10	23,51	350	Lutéoline-7-*O*-rutinoside (Véronicastroside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	FMaz	Simirgiotis et *al*., 2015, Brito et *al*.,2014
11	23,84	291 332	Naringénine-7-*O*-glucoside (Prunine)	$C_{21}H_{22}O_{10}$	FMaz	Yiguang, 2016
12	25,14	255 353	Isorhamnetine3-*O*-(2″,6″ dirhamnosyl) glucoside		FSig FMaz	Olennikov *et al.*,2017
13	25,54	253 354	Quercetine-7-*O*-glucoside-3-*O*-rutinoside (Rutine)	$C_{33}O_{40}H_{21}$	FMaz FSig	Brito et *al*.,2014
14	27,55	296 353	Quercitine-3-glucoside (Isoquercitrin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	FSig FBis FMaz	Costa et *al.*, 2011 Brito et *al*.,2014

15	31,34	227 264	Lutéoline 6,8-di-*C* glucoside (Lucenin-2)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	FSig	Brito et *al*.,2014
16	33,71	228 336	Apéginine	$C_{15}H_{10}O_6$	FSig FMaz TBis	Simirgiotis et *al*.,2015
17	44,28	228 283	Naringénine	$C_{15}H_{12}O_5$	Fsig TSig FMaz TBis	Jang et *al*., 2018
18	45,2	201 286 326	Kaempférol 3-*O* acyl-diglycoside		TMaz TBis, FBis TSig, FSig	Wang et *al*.,2016
19	45,38	274 326	Quercétine-7-*O*-neohesperidoside	$C_{27}H_{30}O_{11}$	TMaz, FMaz TBis, FBis TSig, FSig	Wang et *al*.,2016
20	45,49	227 326	Apigénine-6,8-di-*C*-glucoside (Vicenine-2)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	FSig FBis FMaz	Emam, 2011
21	46,55	281,327	Hespéridine	$C_{28}H_{34}O_{15}$	TMaz, FMaz TBis, FBis TSig, FSig	Emam, 2011, Lin et *al*.,2012
22	48,25	228 274 369	Kaempférol-3,7-*O*-diglucoside	$C_{27}H_{30}O_6$	TMaz, FMaz TBis, FBis TSig, FSig	Ibrahim et *al*., 2015
23	50,63	229 286 366	Kaempférol-3-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	TMaz, FMaz TBis, FBis TSig, FSig	Ibrahim et *al*., 2015
24	51,28	271 366	Apigénine-7-*O*-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	TMaz, FMaz TSig, FSig TBis	Plazonić et *al*.,2009
25	52,02	228 334	Apéginine	$C_{15}H_{10}O_6$	FSig	Brito et *al*.,2014

Tableau 7. Structures chimiques des molécules bioactives identifiées.

Acides phénoliques					
Acide hydroxybenzoïque	**Molécules bioactives**	**Substituants**			
		R1	**R2**	**R3**	**R4**
	1	H	OH	OH	OH
	2	H	OCH_3	OH	H
	4	H	H	H	OH
	5	H	H	H	H
Acide hydroxycinamique 	3	OH	OH	OH	OH

Flavonoïdes							
Flavones	**Molécules bioactives**	**Substituants**					
		R5	**R7**			**R4'**	
	6	OH	O-néohes			OH	
	7-10	R5	R7	R3'		R4'	
		OH	*O*rut	OH		OH	
	16-25	**R5**	**R7**			**R4'**	
		OH	OH			OH	
	20	**R3**	**R6**	**R8**	**R3'**	**R4'**	
		H	*C*-glu	OH	*C*-glu	OH	
	15	**R6**	**R7**	**R8**	**R3'**	**R4'**	
		Glu	OH	Glu	OH	OH	
	24	**R5**	**R7**		**R4**		
		OH	Glu		OH	/	
Flavonols	8	**R5**	**R7**	**R3'**	**R4'**	**R3**	
		OH	OH	OH	OH	Rham-Gluc	
	9	**R3**	**R5**	**R7**	**R3'**	**R4'**	**R3**
		OCH_3	OH	OH	OCH_3	OH	Rut
	12	OCH_3	OH	OH	OCH_3	OH	Rham-Glu
	13	**R5**	**R7**	**R3'**	**R4'**	**R3**	
		OH	Glu	OH	OH	Rut	
	14	OH	Glu	OH	OH	Glu	
	19	OH	Néo	OH	OH	OH	
	22	**R3'**	**R5'**	**R3**	**R7**		
		H	H	OH	*O*-digluc		
	23	H	H	Glu	H		
Flavanones	17	**R7**	**R8**	**R9**	/		
		OH	H	OH	/		
	11	Glu	H	OH	/		
	21	Rut	OH	OCH_3	/		

3. Les activités biologiques de la drogue *A. halimus*

3.1. Potentiel antioxydant des extraits de l'*A. halimus* L.

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (Aruoma, 1996). La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux (Thomas, 2011). Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs (Prior et *al*., 2005): soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physicochimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser plusieurs méthodes dites « d'inhibition » car il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon (Frankel, 2000 et Prior et *al*., 2005). C'est pourquoi, différents tests de mesure de pouvoir antioxydant sont effectuées pour confirmer une activité antioxydante. De ce fait, quatre tests chimiques (CAT, DPPH, ABTS et BCB) basés sur la décoloration des échantillons suivis par une lecture d'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

Ces méthodes diffèrent par leurs réactions chimiques (différents radicaux sont utilisés pouvant avoir différentes cibles) et par leur méthode de calcul. Ainsi, aucune comparaison ne peut être faite entre les différents tests concernant les résultats en valeurs absolues, les comparaisons sont essentiellement faites à partir des classements (ou rang) des échantillons entre eux. Il n'existe à l'heure actuelle aucune standardisation permettant de comparer les résultats entre eux. En effet, l'utilisation de plusieurs indices permet une validation des résultats, et la quantification annexe d'antioxydants spécifiques tels que les polyphénols serait un bon marqueur (Saura-Calixto et Goni, 2006).

3.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits bruts est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique par gramme de l'extrait lyophilisé (µg EAA/g EL) à partir d'une courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide ascorbique comme référence (y=0,0025x) (Fig. 32). A la différence des autre testes, la CAT permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines (C, E….etc) (Prieto et *al.*, 1999).

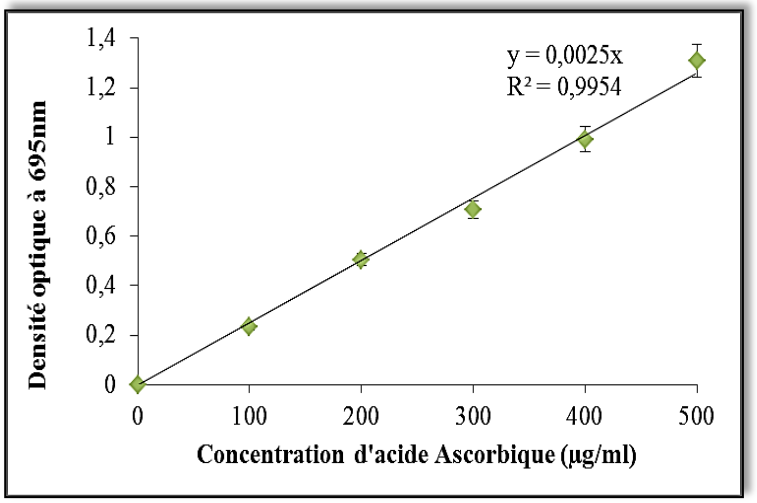


Figure 32. Courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique

L'estimation de la capacité antioxydante totale (CAT) révèle une variabilité en fonction des écotypes et des organes de l'*A. halimus* testés, (Annexe 4, Tab 23). La figure 33 (A et B) note un pouvoir antioxydant proportionnel aux concentrations des extraits. À la concentration de 1000µg/ml, différentes activités maximales ont été enregistrées par les extraits de Biskra et de Mazagran 136,27±0,41, 91,07±0,83 µg EAA/g EL (feuille) et 147,20±1,06, 122,67±4,13µg EAA/g LE (tiges) qui ont montrés une efficacité comparativement à ceux de Sig soient, 61,20±2,08µg EAA/g EL (feuilles) et 92µg EAA/g LE (tiges).

Ces résultats sont probablement dus aux concentrations élevées des composés phénoliques dans les feuilles et les tiges de Biskra et Mazagran car la corrélation entre le CAT et les composés bioactifs quantifiés auparavant pour tous les extraits de l'*A halimus* (CPT_S, FT_S, FLT_S et les CT_S) (Tab. 8) montré que cette activité est fortement liée à la présence des caroténoïdes et des flavonoïdes dans r=0,711 et 0,642. Par ailleurs, les teneurs en polyphénols (r=0,448) et en flavonols (r=0,522) conditionnent modérément cette capacité. Néanmoins, le travail mené par Benhammou et *al*. (2014) sur la même espèce a démontré que le pouvoir réducteur de cette plante issus de la région Algérienne

de Bechar est supérieur à nos échantillons où les capacités antioxydantes des extraits méthanoliques est de 7,72 mg EAA/g MS pour les feuilles et 11,50 mg EAA/g MS pour les tiges.

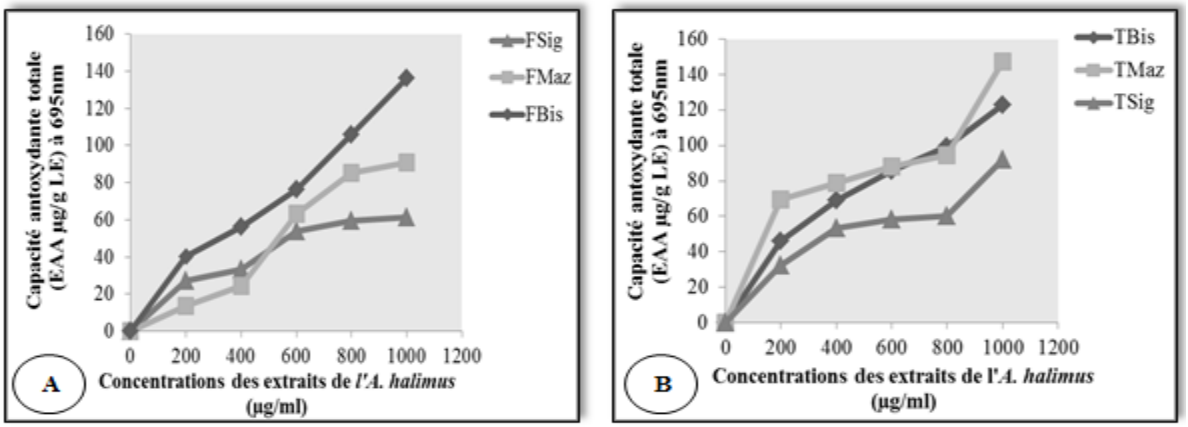


Figure 33. Capacité antioxydante totale des extraits des feuilles(A) et tiges (B) d'*A. halimus*.

Tableau 8. Relation entre les activités Antioxydantes des différents extraits de l'*A halimus* L. et leurs composés bioactives par le calcule de coefficient de Pearson (r).

Activities Antioxidantes	CPT	CFT	CFLT	CCT
DPPH	0,506	0,548	0,546	0,151
ABTS	0,137	0,284	0,496	0,337
BCB	0,464	0,682	0,687	0,732
TAC	0,448	0,642	0,522	0,711

3.1.2. Activités anti-radicalaires

3.1.2.1. Test de piégeage du radicale libre de DPPH

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plantes (Laguerre et *al*., 2007). A la lumière des résultats de l'activité antioxydante des échantillons ainsi que le standard évalués par le test de DPPH ont été représentés dans les figures 34 et 35. Il ressort que tous les extraits semblent être actifs et dose-dépendants vis-à-vis le radicale libre de DPPH. Toutefois, cette capacité réductrice varie non seulement entres les écotypes mais aussi entres les organes (feuilles et tiges). Cette dernière est traduite par une décoloration après un temps de réaction (Fig. 36).

Quel que soit l'écotype étudié, un effet dose dépendance a été remarqué. En effet, les pourcentages d'inhibition évoluent proportionnellement avec la concentration de l'extrait appliquée. Le plateau obtenu correspond à l'inhibition totale du DPPH$^{\bullet}$ présent dans le milieu réactionnel.

D'après les résultats, à la même concentration maximale (100mg/ml), les extraits de Biskra se sont révélé les plus actifs avec des pourcentages d'inhibition de 78,50 et 67,64% pour les feuilles et les tiges, respectivement. Comparativement, que ce soit pour les feuilles (64,49%) ou les tiges (64,29%), des activités d'inhibition égales ont été enregistrées par l'écotype de Mazagran. Par ailleurs, les plus faibles taux d'inhibition ont été obtenus par les feuilles et les tiges de l'*A. halimus* de la région de Sig avec respectivement 33,79 et 37,27%.

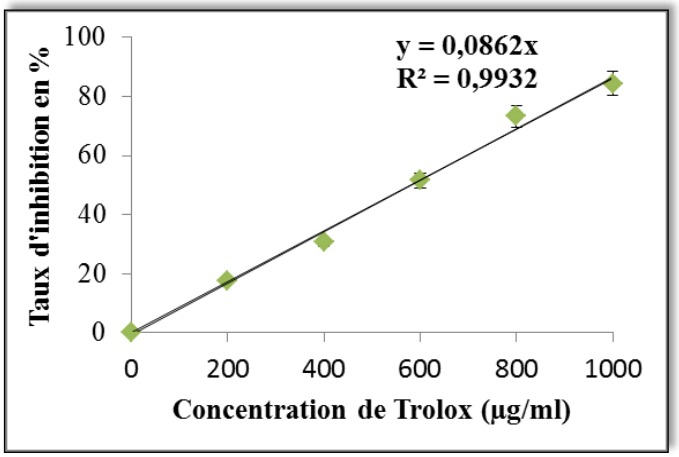


Figure 34. Pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH par Trolox

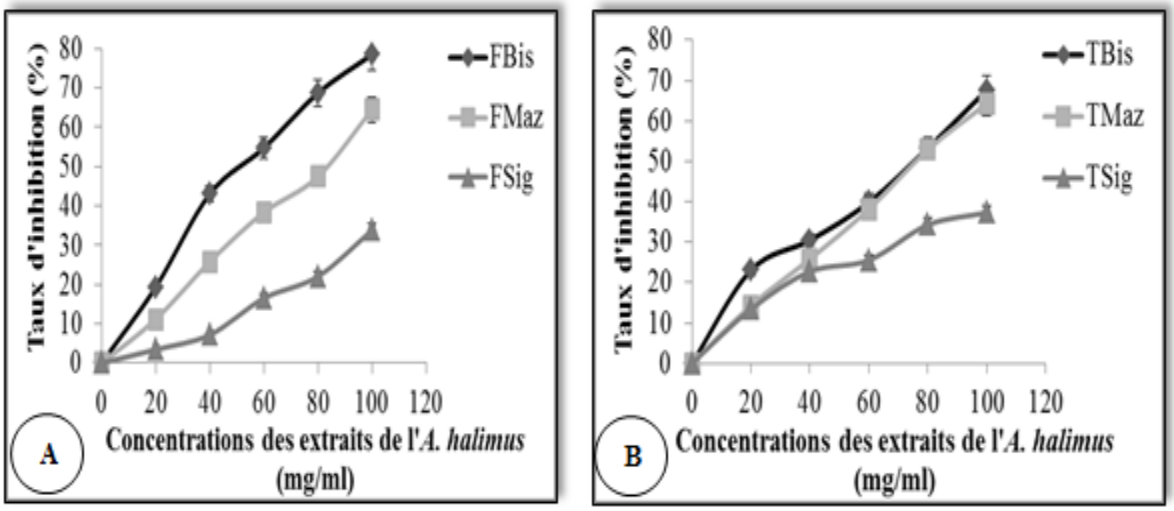


Figure 35. Pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH en fonction des concentrations des extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus.*

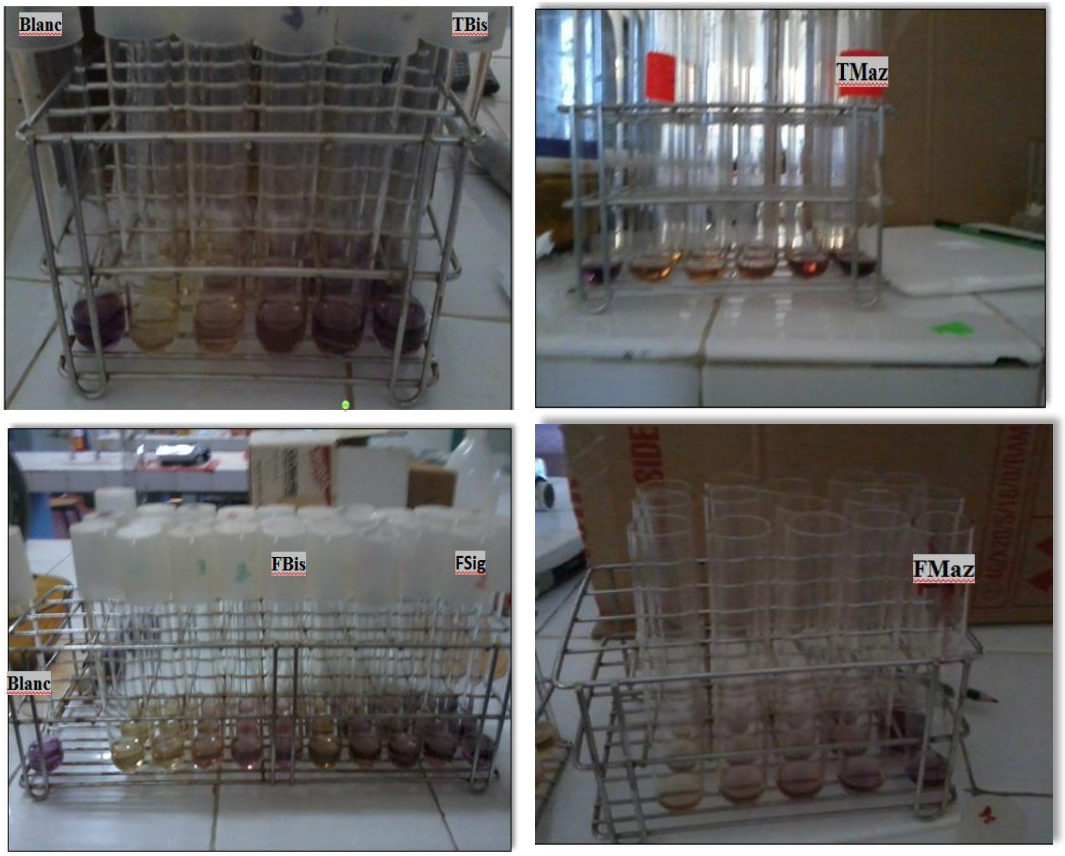


Figure 36. Réduction des extraits de l'*A halimus* du radicale libre de DPPH (Photo originale).

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH$^{\bullet}$ est exprimé par la concentration inhibitrice à 50% (CI_{50}). Celle-ci correspond à la concentration des polyphénols nécessaires pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH$^{\bullet}$. Une CI_{50} faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée (Molyneux, 2004).

Afin de comparer les capacités antioxydantes des extraits de l'*A halimus* testés et l'antioxydant de synthèse (Trolox), il était nécessaire de calculer le CI_{50} en µg ET/ml. Les résultats sont récapitulés dans la figure 37.

Les données montrent une différence significative ($F_{2.1}$=68,33, p=0) (annexe 2, Tab. 26) entre les différents extraits (écotypes, organes) et la substance de référence (Trolox). Les extraits des tiges de Biskra (497,46±37,53µg ET/ml) et Mazagran (501,85±45,91µg ET/ml) montrent des capacités à neutraliser le radicale libre de DPPH$^{\bullet}$ supérieures à celle de trolox (579,94±0,7 µg ET/ml). De plus, les extraits issus des feuilles de Mazagran ont aussi révélé une activité proche du standard. En revanche, la plus faible activité a été donnée par les extraits de feuilles de Biskra (845,64±10,75 µg ET/ml). Exceptionnellement, vu les faibles taux d'inhibition (33,76 et 37,27 %), les CI_{50} des extraits de Sig (feuilles et tiges) n'ont pas pu être déterminées. Ces données permettent de classer les extraits

par rapport aux standards selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant : TBis > TMaz > Trolox ≥ FMaz > FBis (annexes 2, Tab. 25).

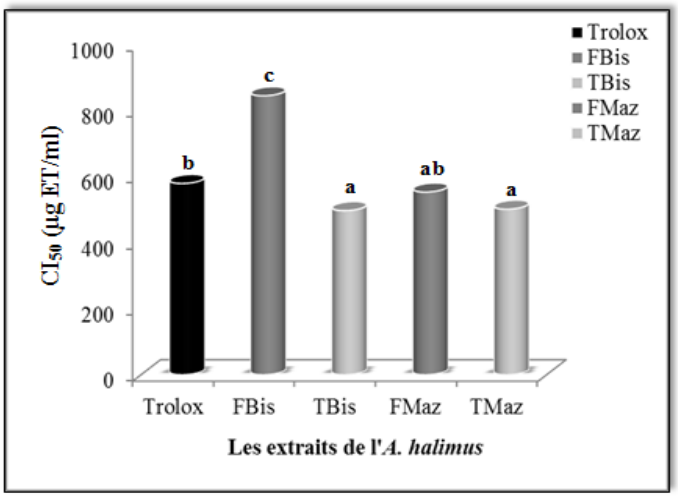


Figure 37. Valeurs de CI_{50} des extraits de l'*A. halimus* et du trolox par le piégeage du radicale libre du DPPH (*p*=0).

Les capacités anti-radicalaires remarquées pour les tiges de Biskra et Mazagran peuvent être attribuées à la présence des flavonoïdes, flavonols et des composés phénoliques totaux. En effet, d'après les résultats enregistrés dans le tableau 8, des corrélations moyennes avec le test de DPPH (r=0,548, 0,546 et 0,501) a été détectée, contrairement aux caroténoïdes ayant montrés une faible corrélation (r=0,151). Ce indique la participation d'autres molécules bioactives dans l'exercice d'un effet scavenger plus important. De ce fait, la variation du pouvoir antioxydant des différents extraits pourrait s'expliquer par leur richesse différentielle en polyphénols et plus particulièrement de la nature des composés, car l'activité scavenger du radical DPPH dépend de la structure et la polarité des polyphénols, la présence d'hydrogène phénolique et le nombre de groupements donneurs d'hydrogène (Dawidowiez *et al.*, 2006), notamment les groupements OH en 3', 4' sur le noyau B et/ou un OH libre des flavonoïdes (Amic *et al.*, 2003). Bylka et *al.* (2001) suggérent que ce pouvoir est accordé à l'abondance des flavonols (keampferol, quercetin) dans plusieurs genres de l'espèce *Atriplex halimus*.

Les extraits hydro-éthanoliques testés apparaissent plus actifs que ceux de Benhammou (2009). Ainsi, les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges présentent des activités inferieures à l'acide ascorbique employé comme standard dont l'IC_{50} a été chiffrée à 31,83, 50,58 et 0,11mg /ml, respectivement. Par contre, la comparaison avec d'autres espèces halophytes et xero-halophytes, les échantillons de feuilles apparaissent moins efficaces vis-à-vis du radical libre de DPPH. Les extraits méthanoliques des feuilles de *Limoniastrum monopetalum* et *Frankenia thymifolia* sont de l'ordre de

162µg/ml et 99µg/ml, respectivement (Megdiche et *al*., 2011). Alors que ceux issus des feuilles et tiges de *Sesuvium Portulacastrum,* leur CI_{50} a été fixée à 90 et 190µg/ml (Slama et *al*., 2015).

3.1.2.2. Test de piégeage du radicale-cation libre d'ABTS

Le test est basé sur le mécanisme d'oxydo-réduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Au cours de ce test, le sel de l'ABTS perd un électron pour former un radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation $ABTS^{+}$, ce qui entraine la décoloration de la solution. Le cas et aussi applicable pour les différents extraits ainsi que la molécule de référence (Fig. 38).

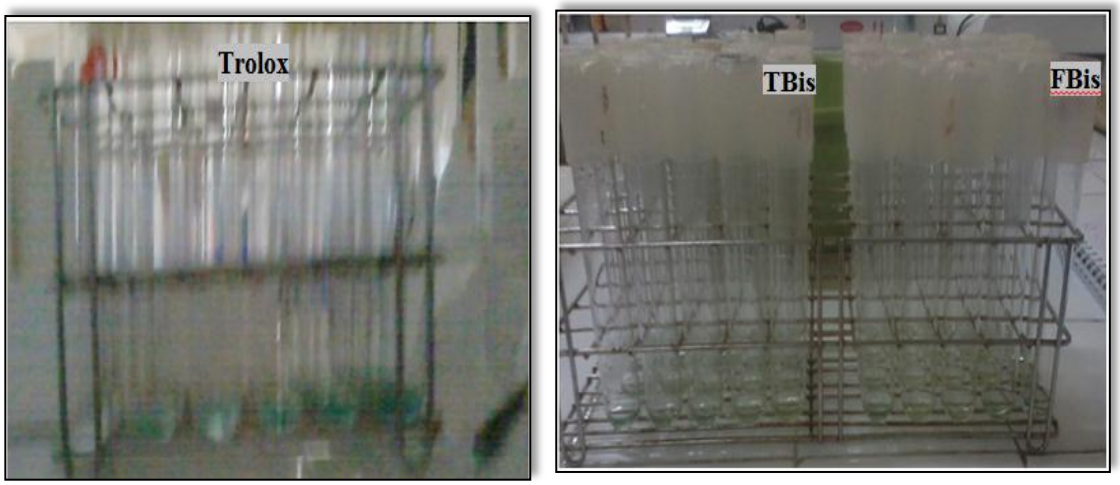


Figure 38. Réduction des extraits de l'*A. halimus* et de trolox du radicale libre de $ABTS^{\bullet}$ (Photo originale, 2019).

Comme le DPPH, les résultats illustrés dans la figure 39 montrent une capacité antioxydante dose-dépendante des extraits étudiés. A la concentration maximale (100mg/ml), les extraits de Biskra révèlent aussi une forte activité avec des taux d'inhibitions supérieurs à 90% (feuilles) et 62% (tiges), suivi par celui des feuilles de Sig montrant ainsi un effet scavenger dépassant 73%. Alors que dans les mêmes conditions, les extraits de Mazagran (feuilles et tiges) et Sig (tiges) sont apparus moins efficaces contre le radicale-cation ABTS avec des taux d'inhibition chiffrés à 43,18 - 45,56 et 39,84%, respectivement (Annexe.2, Tab.24)

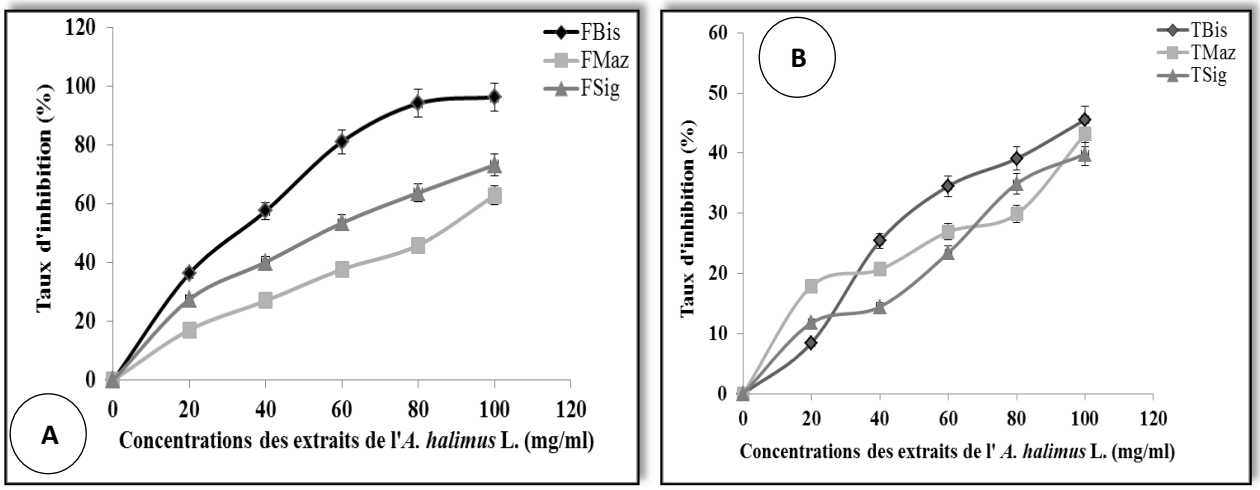


Figure 39. Pourcentage d'inhibition du radicale libre de l'ABTS$^{+\bullet}$ en fonction des concentrations des extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus.*

D'après la méthode, l'aptitude de réduire 50% de l'ABTS $^{\bullet+}$ montrée par les extraits de tiges de Sig et Biskra est équivalente à celle de l'antioxydant de synthèse (CI_{50} trolox = 59,76µmol/ml) (Fig. 40 et 41), à l'exception des extraits de Mazagran et celui des tiges de Sig n'ayant pas atteint 50% de réduction de cette molécule (annexe 2, Tab. 25).

Il est vraisemblable que les flavonols (r=0,496) sont les principaux contributeurs de cette activité (Tab. 8). L'absence de travaux sur l'évaluation de l'activité antioxydante de l'*A halimus* par la méthode ABTS rend la comparaison avec d'autres investigations impossibles. Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est positivement corrélée avec la structure phénolique. Généralement, les composés phénoliques avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim et *al*., 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de pinedo et *al*., 2007). Ainsi que, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure dépendant (Rodriguez-Bernaldo et *al*., 2009).

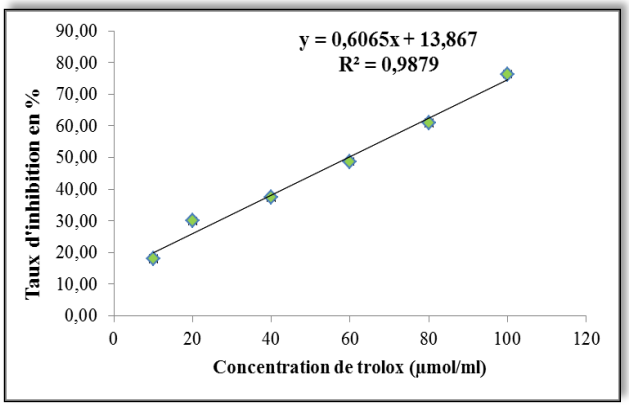


Figure 40. Pourcentage d'inhibition du radicale libre de l'ABTS$^{+\bullet}$ par le standard trolox

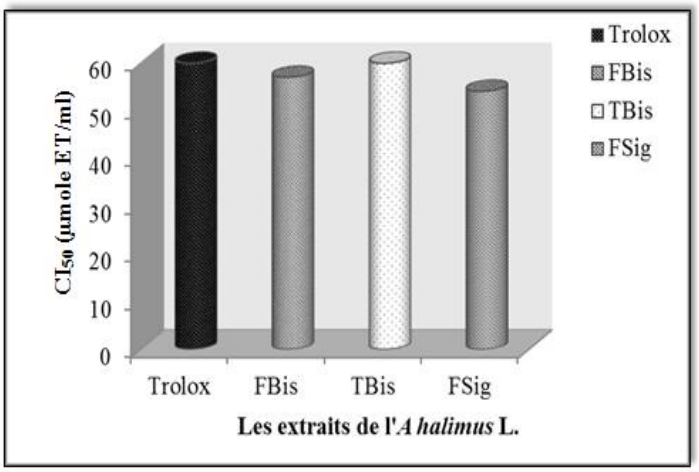


Figure 41. Valeurs de CI_{50} des extraits de l'*A. halimus* et du trolox par le piégeage du radicale libre de l'ABTS (p>0.05).

3.1.3. Inhibition du blanchiment de ß-catoténe

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par les polyphénols et les flavonoïdes ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β-carotène qui est fondé sur la perte de la couleur jaune de β-carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. La présence de différents antioxydants peut gêner l'ampleur du blanchiment du β-carotène en neutralisant le radical libre de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système (Kadri, 2011). Cette méthode est employée couramment parce que le β-carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important. En outre, le β-carotène est employé comme agent de coloration dans les boissons, et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits (Kadri, 2011). De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de l'*A halimus*.

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique et le blanchiment de b-carotène des extraits et la molécule de référence BHT sont représentés dans la figure 43 (A et B). Ainsi, les CI_{50} une fois calculés ont été représentés dans la figure 44 dans le but d'apprécier l'efficacité et comparer les différents extraits par apport à l'antioxydant de synthèse (BHT).

D'après les pourcentages d'inhibition d'oxydation et le blanchiment du *ß*-catoténe. Il apparait que les différents extraits des feuilles provenant des trois régions algériennes ont un pouvoir inhibiteur de peroxydation lipidique remarquable en comparaison avec les extraits des tiges, Toutefois ces taux sont variables entre les écotypes qui ont été classés dans l'ordre d'efficacité suivant : FSig (88,98%) >FBis (86,34%) >FMaz (76,99%) > TSig (59,46%) ce qui indique que les feuilles de Sig et Biskra sont plus actives que ceux de Mazagran. Cependant, les tiges des Sig et

Biskra ont révélé une capacité moyenne avec des taux d'inhibition 56,46, 56,02% correspondantes pour chacun des écotypes, toutefois, les tiges de Mazagran ont la plus faible activité (45,81%).

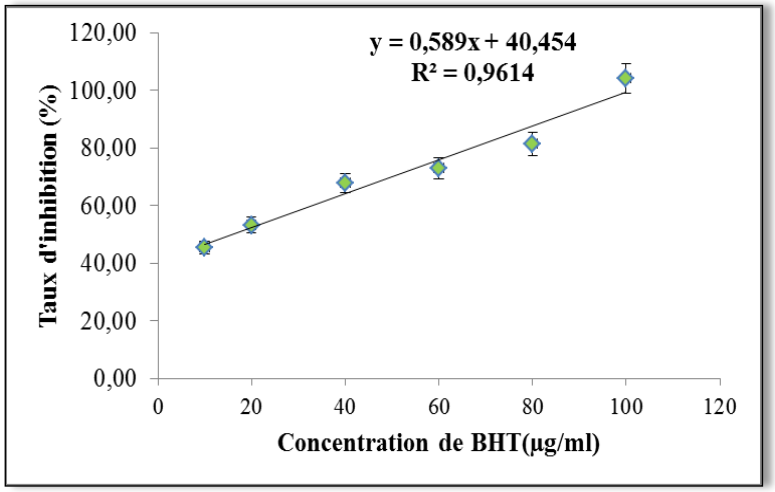


Figure 42. Pourcentage d'inhibition de blanchiment de ß-carotène par BHT.

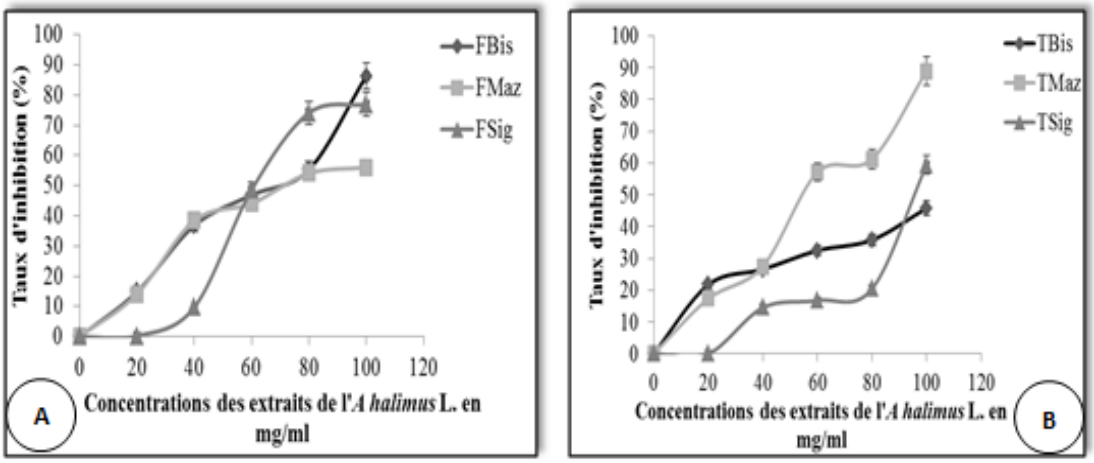


Figure 43. Pourcentage d'inhibition de blanchiment de ß-carotène en fonction des concentrations des extraits des feuilles (A) et tiges (B) des trois écotypes de l'*A. halimus.*

Ce test a encore confirmé l'efficacité des extraits des tiges de Biskra, prouvé précédemment par les essais anti-radicalaires de DPPH et ABTS, cet échantillon a donné la même puissance que le BHT dans la prévention du blanchiment de ß-caroténe où les valeurs d'CI_{50} enregistrées sont de 17,38 et 15,38 µg EB/ml respectivement (annexe. 2, Tab. 25), la comparaison des autres extraits avec l'antioxydant de synthèse a démontré une activité intermédiaire des extraits de feuilles de Biskra (28,28±1,31µg EB/ml) (Fig. 44). Cependant, une faible capacité des extraits de Sig (feuilles et tiges) et de Mazagran (tiges) comme il est illustré dans les figures précédentes.

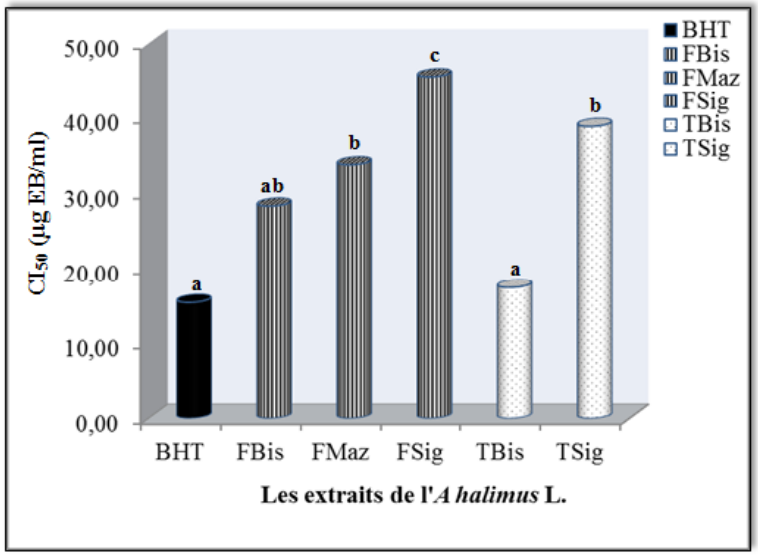


Figure 44. Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-éthanoliques de l'*A. halimus* L. et du BHT vis-à-vis le blanchiment du ß-carotène (p<0.05).

Cette activité antioxydante semble être influencée par la teneur en caroténoïdes (r=0,732), 68% de cette capacité et aussi dus aux flavonols et flavonoïdes, tandis que seulement 47% de cette activité est attribué à la teneur des extraits en polyphénols totaux (Tab. 8). Ces derniers résultats sont conformes aux travaux de Bylka (2001) et Cai (2006). La grande corrélation avec les caroténoïdes en comparaison avec les autres composants est probablement due à la haute spécificité de ce test pour les composés lipophiles (Gachkar et *al.*, 2007, Kubola et *al.*, 2008) tel que les acides gras insaturés (palmitoleïques, oléiques et acides linoléique) identifiés chez *A. halimus* (Emam, 2011). Il est à signaler que les caroténoïdes sont des bons piégeurs de radicaux libres grâce à la longueur de chaînes polyinsaturées (Krinsky, 1994). L'action antioxydante des caroténoïdes dépendrait également de la présence de vitamine E. tandis que la relation modérée, qui a été remarquée entre cette activité et la présence des flavonoïdes, est expliqué par le fait que, ces composants bioactives ont la capacité de terminer la réaction en chaine de la peroxydation des lipides par le piégeage du radical peroxyle LOH (Takahama, 1983).

En effet, les résultats obtenus par ce test peuvent être attribués au fait que, la plante *A halimus* est riche en antioxydants apolaires puissants, permettant d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique couplée à la β- carotène car le test de blanchissement du β-carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau d'où les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes et ils se concentrent au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β- carotène (Frankel et Meyer, 2000).

D'après les résultats obtenus par les différents tests d'activité antioxydante à savoir ; ceux des milieux réactionnels polaires (CAT, DPPH et ABTS) et apolaires (décoloration de la β-carotène), il ressorts que l'extrait des tiges de Biskra possède un pouvoir antioxydant important et /ou identique aux Trolox et BHT, antioxydant synthétique utilisé dans l'industrie agroalimentaire, comme conservateur des aliments. Cette capacité anti-radicalaire est étroitement associé à la nature et aux propriétés structurales des molécules, ainsi le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles attachés au noyau aromatique de ces composés polyphénoliques isolés de l'*A. halimus*, en particulier, les flavonoïdes (flavonols, flavanones et flavones), identifiés par la méthode HPLC-DAD (Tab. 8 et 9). Ces derniers possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Dans le cas de flavones et flavonols, la conjugaison des cycles A, B et C, permet une bonne stabilisation du radical phénoxy (Musialik et *al*., 2009). La plupart des travaux réalisés montrent que les molécules de flavonoïdes possèdent des doubles liaisons entre les carbones C2- C3 et à la fonction carbonyle en C4 du cycle C (Fig.45), sont plus actives que celles qui sont dépourvues de l'une, ou de l'autre, ou des deux (Balasundram *et al*., 2006). C'est le cas de la quercétine (flavonol), qui a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à la taxifoline (flavanonol) (Burda et *al*., 2001), et à la catéchine (flavanol) (Rice-Evans et *al.*, 1996). En revanche la *O*-glycosylation, *C*- glycosylation ou la *O*-méthylation de groupements hydroxyles conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante des flavonols (Dai et Mumper, 2010). La modification de la planéité du flavonoïde par l'effet stérique, et par suite sa capacité à délocaliser les électrons prouves être à l'origine de la réduction de cette capacité. Bien qu'il ne soit pas possible d'établir un lien direct entre le nombre de substituants méthoxyles, hydroxyles et l'activité antioxydante d'un flavonoïde, on peut noter que la méthylation d'un hydroxyle du cycle B est particulièrement défavorable à l'activité antioxydante (Musialik et *al*., 2009). Cependant, les faibles teneurs et concentrations des composés bioactives dans les tiges par apport aux feuilles révélés par les dosages spectrophotométries, ainsi, la dominance des flavonoïdes glucosés à l'exception de certains métabolites ; Apéginine, Naringénine et Hespéridine présent dans les tiges, conduisent a suggéré que ce pouvoir est probablement dû aux réactions synergiques émanant des liaisons existantes entre eux et/ ou des composants présents dans les extraits de plantes qui peuvent y avoir entre les métabolites secondaires (Hayouni et *al.*,2007 ; Chaouche et *al*., 2013).

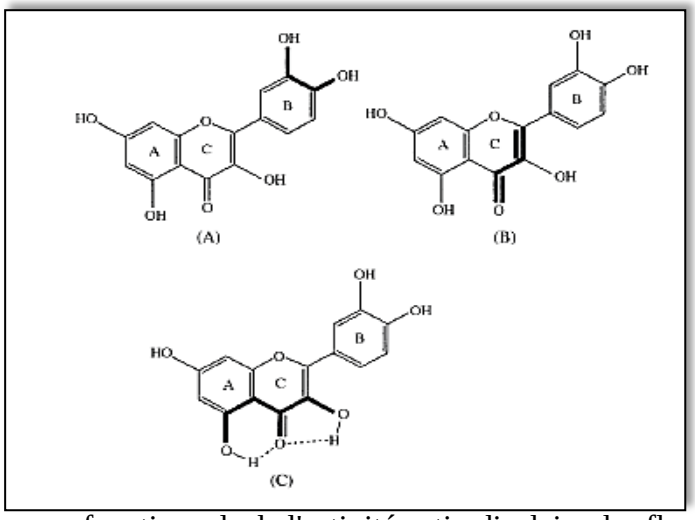


Figure 45. Groupes fonctionnels de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes (Soobrattee et *al*., 2005).

Cette activité dépend également de plusieurs facteurs citons ; la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant (Kadr et *al*., 2011 ; Pukalskas, 2012 ; Bouzouina et *al*., 2016) ainsi que, la structure des molécules bioactives présentes dans cette espèce végétale (Karamac, 2005; Popovici, 2009). Selon Theerawitaya et *al.* (2014); Hussain et *al*. (2015) et Wang et *al.* (2015); les conditions environnementales des sites d'échantillonnages, la période et le stade de développement de la plante ainsi que la nature de l'organe végétal, influent sur l'accumulation des espèces réactive d'oxygène (ERO) au sein de la plante qui explique la variabilité quantitative et qualitatives des métabolites secondaires synthétisés et par conséquence la densité de l'activité antioxydante.

4. Activité antifongique des extraits d'*A. halimus*

La résistance aux traitements anti-infectieux n'est pas limitée aux bactéries. On observe en particulier une nette augmentation de la proportion d'espèces résistantes au sein des champignons et levures, en particulier le genre Candida – entre autres *C. albicans, C. tropicalis*,… (Aouadi et *al*., 2013 ; Maurand et *al.,* 2018). L'augmentation de la résistance fongique aux médicaments classiques et le fait que la plupart des médicaments antifongiques n'ont qu'une activité fongistatique justifie l'emploie de nouvelles stratégies de lutte contre les infections fongiques par la recherche de nouvelles sources naturelles antimicrobiennes. A cet effet, le potentiel antifongique des extraits phénoliques des feuilles et tiges d'*A. halimus* issus de trois régions algériennes a été étudié par deux méthodes distinctes; la méthode d'aromatogramme ou de diffusion sur gélose et la méthode de contact direct.

4.1. Evaluation de la sensibilité de *souches fongiques vis-à-vis* des extraits hydro-éthanoliques

4.1.1. Méthode d'aromatogramme

La méthode de diffusion sur gélose est l'une des méthodes appliquée pour la détermination du potentiel antimicrobien et antifongique en particulier contre *Candida albicans* et *tropicalis* préalablement activés et purifiés (Fig. 46) Après utilisation des différents extraits a différentes doses, le diamètre des zones d'inhibition indique le degré de sensibilité des germes en cause, car un extrait est considéré comme actif lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 10mm (Biyiti et *al.*, 2004 ; Tekwu et *al.*, 2012). Les résultats sont représentés dans l'annexe 3.

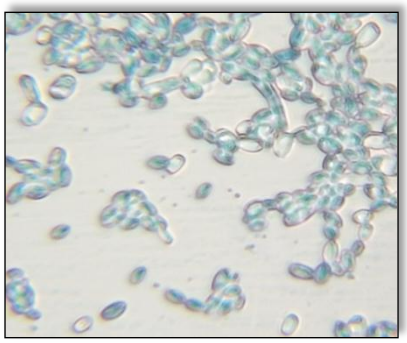
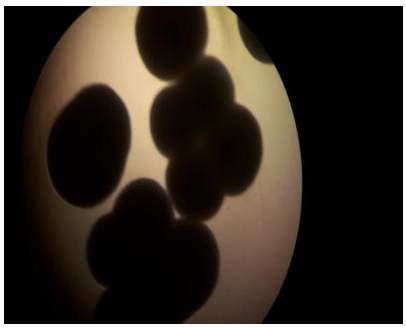
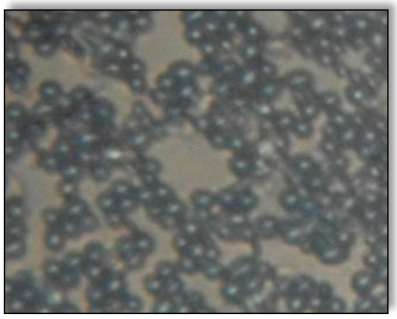
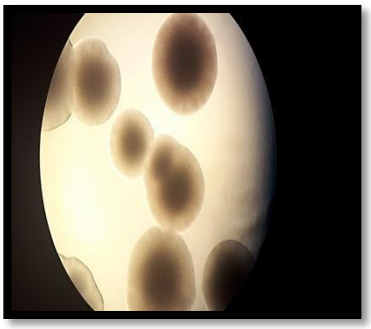
Levures testée	Aspect microscopique 40X	Aspect macroscopique 10X
C. albicans		
C. tropicalis		

Figure 46. Caractère morphologique d'identification du genre *Candida* (Ould kaddour A, 2016).

a) C. albicans

Une différence significative (Tab. 35, annexe 3) a été révélée entre les différents extraits ($F_{2,1}$=372,34 ; p=0).

Selon les figures 46 (A et B), un spectre d'activité antifongique limité, des différents extraits, a été noté contre *C. albicans*. Les valeurs des zones d'inhibition enregistrées à la concentration maximale utilisées sont supérieures à 10mm, ce qui explique la sensibilité de cette souche aux extraits d'*A. halimus*. Cependant, la souche en cause présente une certaine sensibilité vis-à-vis des extraits de feuilles et tiges de Mazagran ainsi que les feuilles de Biskra à des concentrations de 60, 80

et 100mg/ml avec des zones d'inhibitions de 12 – 11 et 10,66, respectivement et 10 mm pour celle de Biskra à 100mg/ml (Fig. 47). Les autres extraits se sont révélés inactives car les diamètres d'inhibition ont été estimés inférieurs à 10mm, largement distancés par apport à l'antibiotique de référence (19mm) (Fig. 48 et 49).

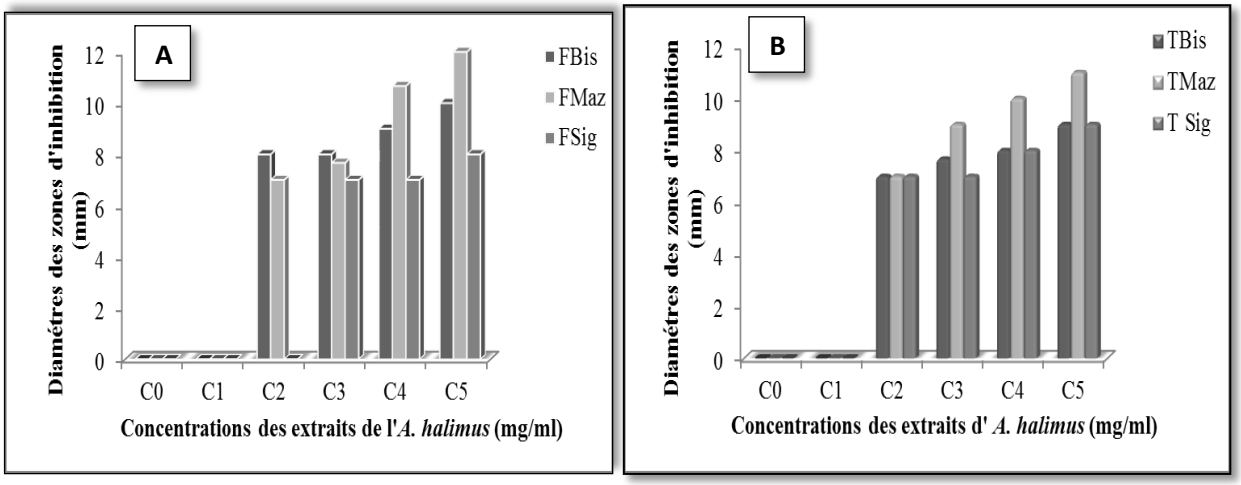


Figure 47. Effet des extraits des feuilles (A) et des tiges (B) des trois provenances de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode d'aromatogramme (*p*=0).

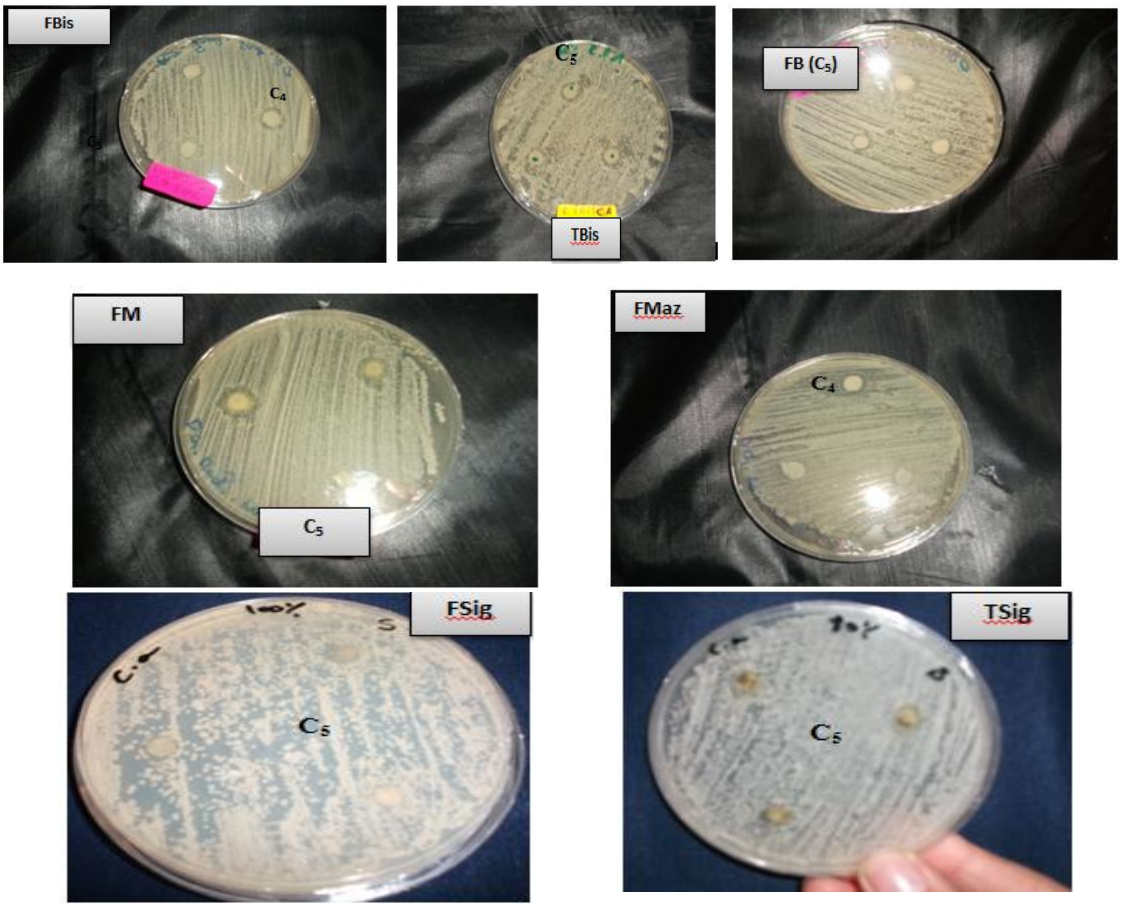


Figure 48. Effet des extraits de l'*Atriplex halimus* sur la croissance de *Candida albicans* (Ould kaddour, 2016).

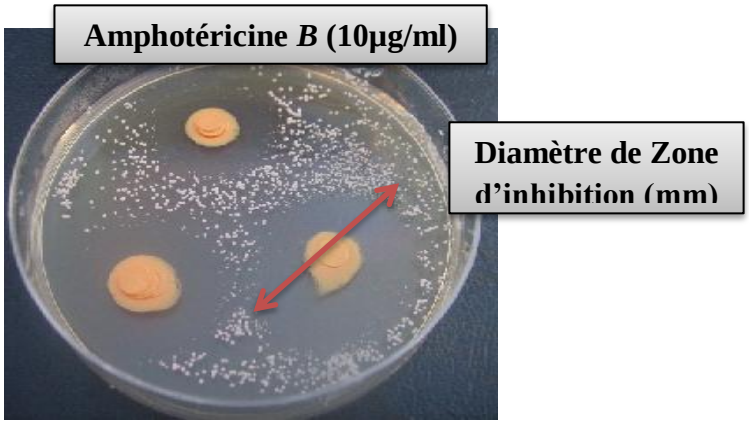


Figure 49. Effet d'amphotéricinne *B* sur la croissance de *Candida albicans* (Ould kaddour, 2016).

b) C. tropicalis

Les extraits bruts d'*A. halimus* des trois écotypes ont réagie différemment contre le germe testé ($F_{2,1}$= 463,39 ; p=0) (Tab. 36, annexe). Les extraits de Mazagran (feuilles, tiges) ont également présentés un faible effet antifongique contre cette espèce. Comparativement à l'Amphotéricine *B* (19 mm), les résultats indiquent que l'accroissement des concentrations des extraits (60, 80 et 100 mg/ml) n'influence guère la croissance de *C. tropicalis*. De ce fait, une sensibilité intermédiaire vis-à-vis des extraits testés a été montrée avec des diamètres d'inhibition de 11mm au maximum. Alors que les feuilles et les tiges de Sig et de Biskra sont moins affectant, les zones d'inhibition de 10mm de diamètre (Fig. 50). Par ailleurs, aucun effet n'a été constaté pour les concentrations variant entre 20 et 40 mg/ml (Fig. 51).

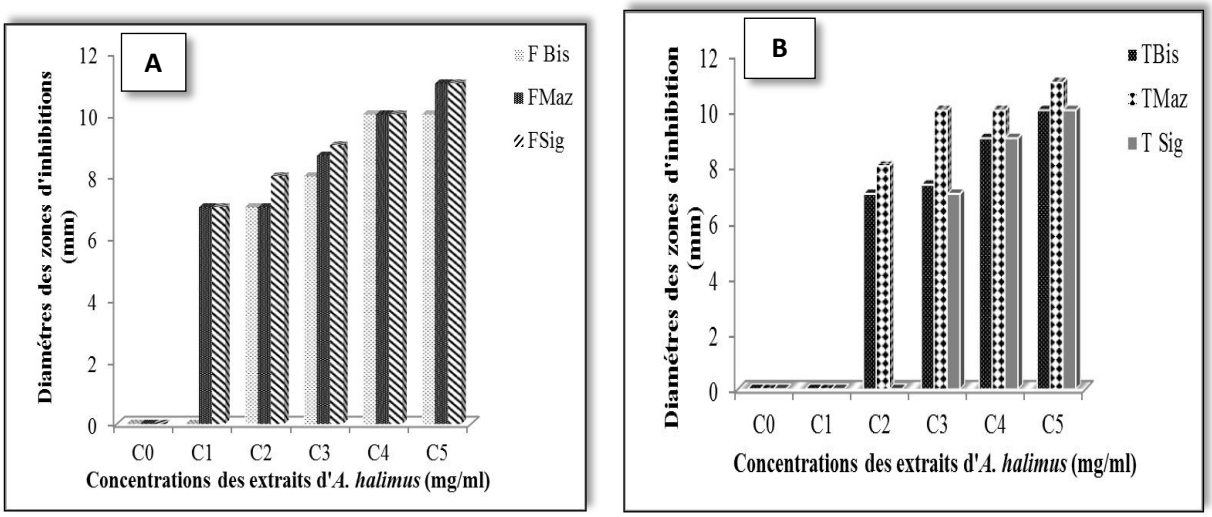


Figure 50. Effet des extraits des feuilles (A) et des tiges (B) des trois provenances de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode d'aromatogramme (p=0).

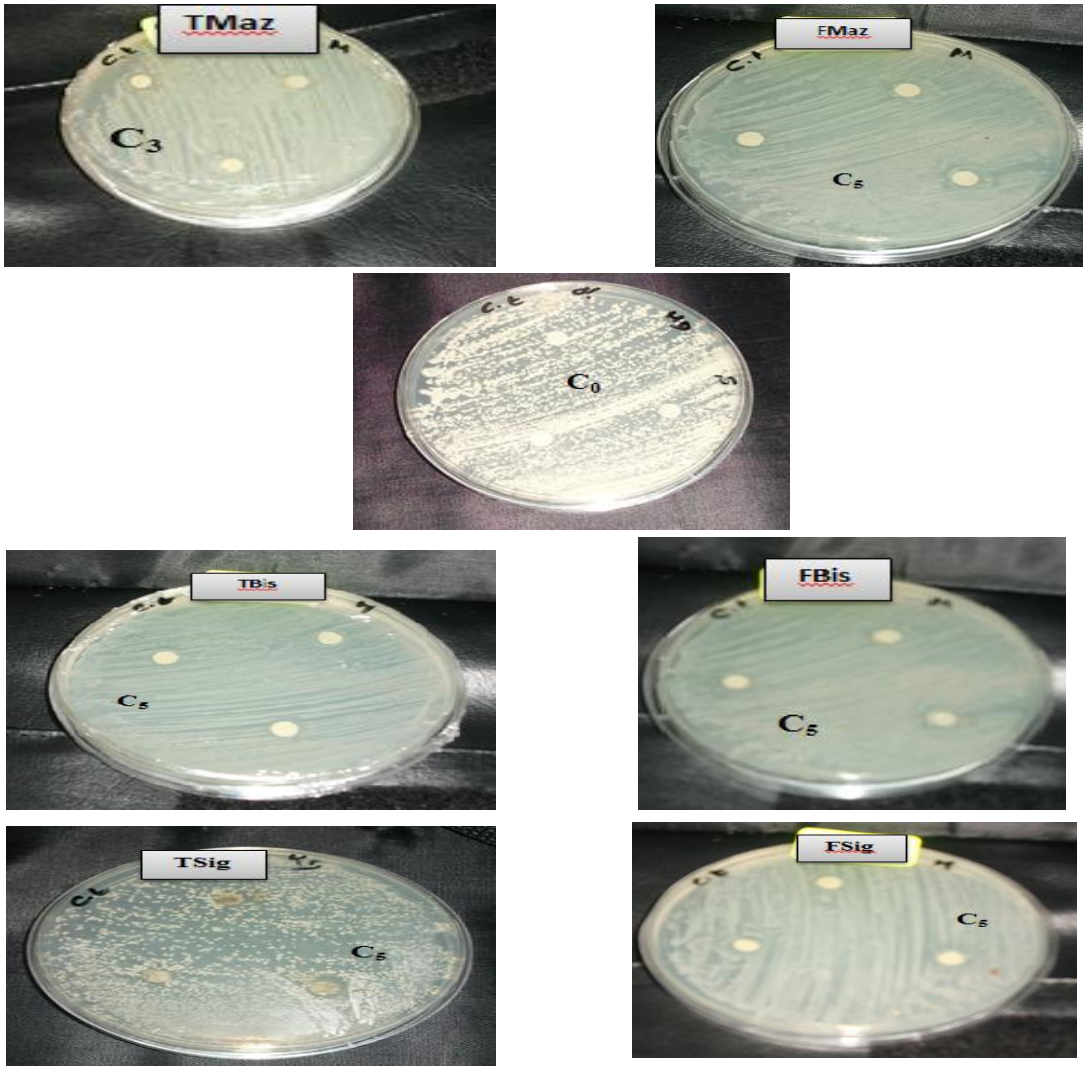


Figure 51. Effet des extraits de l'*Atriplex halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* (Photo originale)

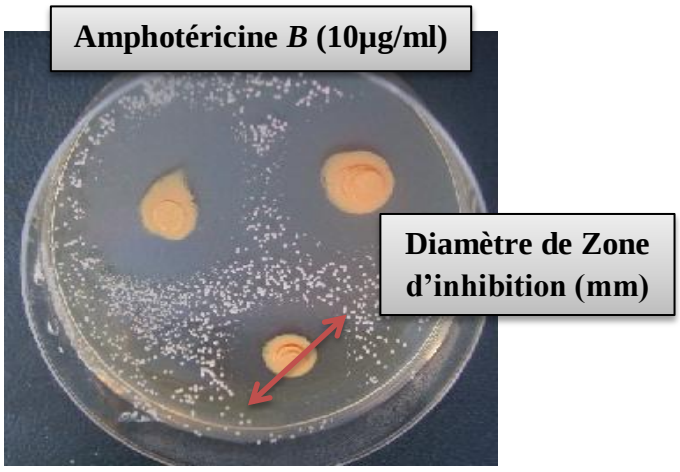


Figure 52. Effet Amphotéricine *B* sur la croissance de *C. tropicalis* (Ould kaddour, 2016)

4.1.2. Méthode de contact directe

a) C. albicans

L'évaluation faite par cette méthode se base sur le contact direct des extraits polyphénoliques de l'*A. halimus* avec la souche en cause. Les résultats obtenus, indiquent une stabilité de la croissance de *C. albicans* à une concentration minimale de 20mg/ml des faibles taux d'inhibitions quelles que soit l'écotype et l'organe testé.

Néanmoins, l'augmentation des concentrations des extraits entraine une diminution du nombre de levure car l'effet inhibiteur des extraits des feuilles et des tiges de Biskra n'apparaissent qu'à partir de 40% où le taux d'inhibition est de 9,02% vs 4,92. Par contre aucun effet inhibiteur été observé par le reste des extraits. En effet, la diminution de la croissance fongique est doses dépondantes. Toutefois, cet activité inhibitrice varie selon les organes végétales et les écotypes choisies ($f_{2.1}$=279455,6, p=0) (Tab. 37, annexe. 3), une importante diminution de croissance de *C. albicans* été constaté par les extraits des feuilles de Biskra (6,66 - 6,22- 4,74 et 3,73UFC/ml) avec des taux d'inhibition de 15,03 vs 35,11 vs 49,04% qui correspond aux concentrations de 40, 60, 80 et 100mg/ml. De même, les tiges de Biskra, le nombre de levure allant de 6,92 au 4,39UFC/ml avec des taux d'inhibitions de 4,92 et 40,03%, respectivement. Les extraits de Sig ont également montré leurs effets *vis-à-vis* la souche testée comme il est illustré dans la figure 53, les feuilles et les tiges de cet écotype ont une activité antifongique identique à des concentrations de 60 et 80mg/ml avec des taux d'inhibitions de 10,11 et 20,08% respectivement, qui correspond à un nombre de germe de 6,58 et 5,85 UFC/ml en comparaison avec le nombre initial de 7,32UFC/ml. Cependant, l'effet marquant des tiges de Sig (40,03%) par apport aux feuilles (30,05%) est observé à 100mg/ml.

D'après ces résultats, la souche testée est plus sensible aux extraits de Biskra (feuilles) et Sig (tiges), par apport à ceux de Mazagran (feuilles et tiges) qui semblent être moins actives contre cette espèce.

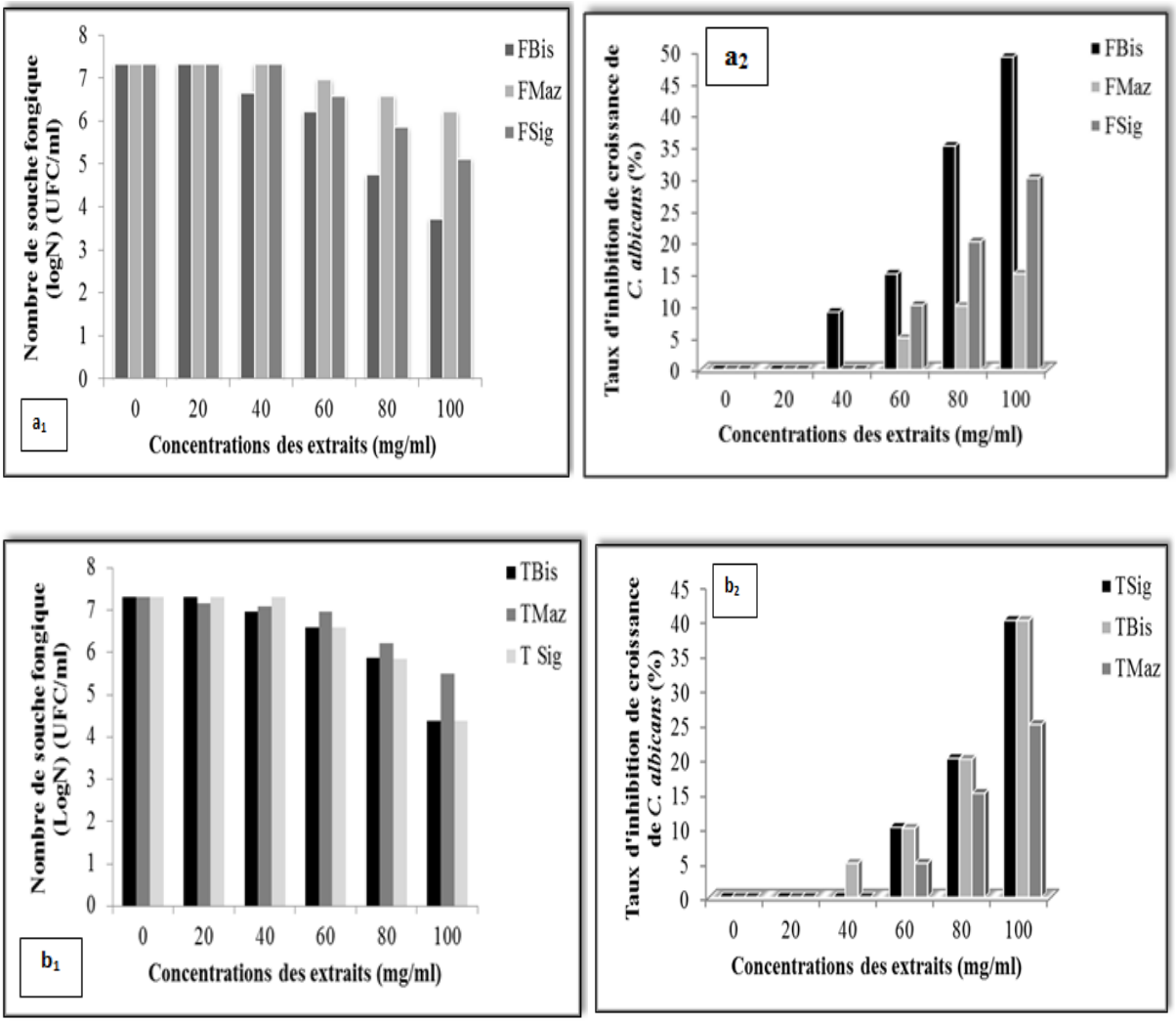


Figure 53. Effet des extraits des feuilles (a_1, a_2) et des tiges (b_1, b_2) de l'*A.halimus* sur la croissance de *Candida albicans* par la méthode de contact direct.

b) C. tropicalis

Les résultats de contact direct de la souche et des différents extraits testés sont représentés dans la figure ci-dessous. De façon générale nous constatons d'après les études statistiques qu'il y a une variation significatif de la capacité antifongique entre les écotypes ($F_{2.1}$=99190,32, p=0) et les organes d'*A halimus* ($F_{2.1}$=340122,9, p=0) contre *C. tropicalis* (Tab. 38, annexe. 3). Une stabilité de la croissance de cette levure été observé a des concentrations minimales des différents extraits (20, 40, et 60mg/ml). A l'exception des tiges de Sig, l'accroissement des concentrations de l'extrait (40, 60, 80 et 100mg/ml) ont provoqué l'élévation du taux d'inhibition dans un ordre de 10,13 – 10,11 - 30,10 et 40,09% par rapport aux extraits de Biskra et Mazagran. En revanche, les feuilles de Sig et Biskra semble être légèrement actives où seulement 15% du nombre initiale de *C. tropicalis* été réduit après à une concentration maximale de 100mg/ml en comparaison avec celles de Mazagran.

A la lecture de ces résultats, il apparait que l'extrait des tiges de Sig présente une activitée antifongique plus prononcé contre cette espèce de champignon par rapport à l'ensemble des extraits testés.

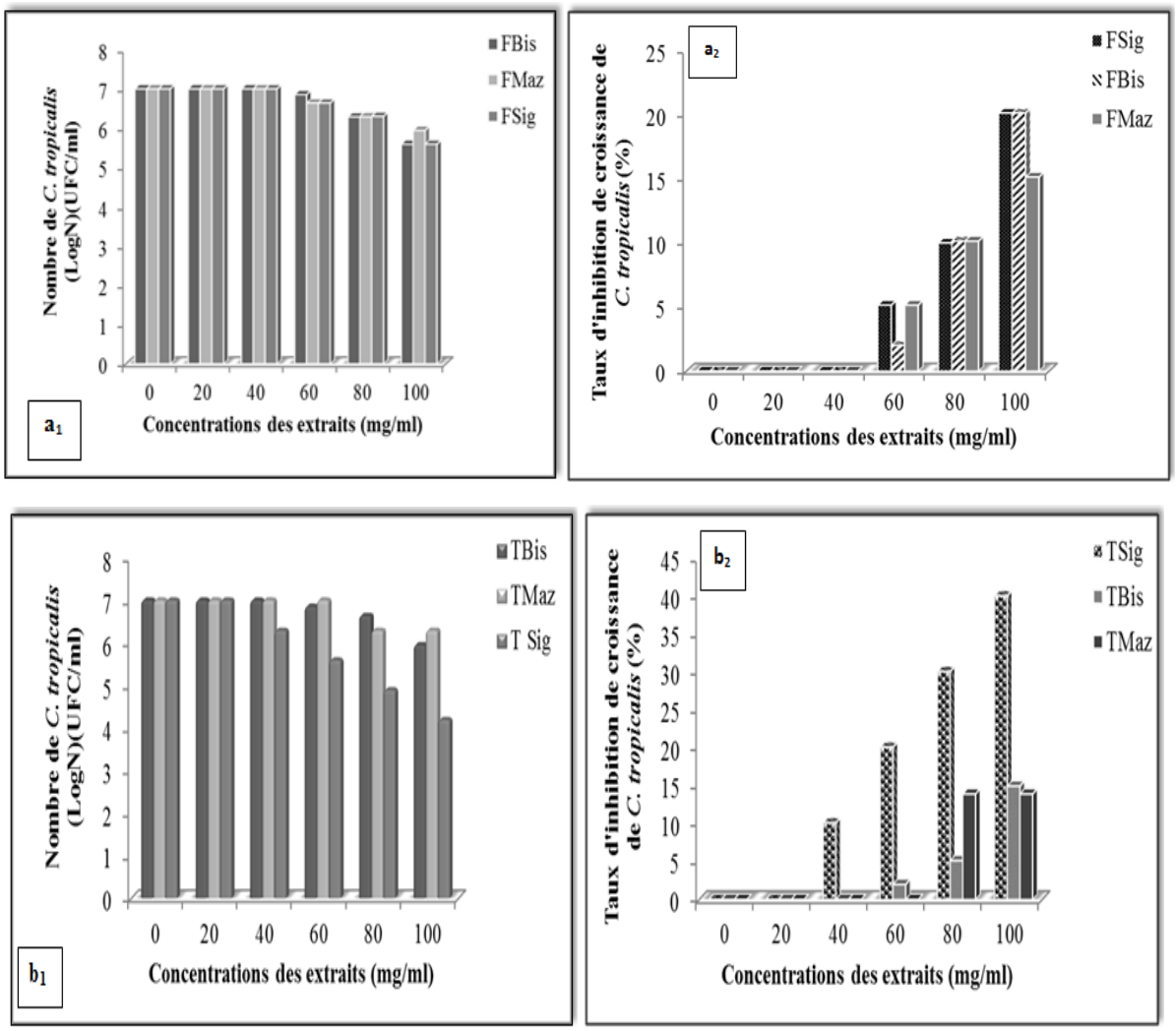


Figure 54. Effet des extraits éthanoliques des feuilles (a_1, a_2) et des tiges (b_1, b_2) de l'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode de contact direct (p=0).

A la lumière de ces données statistiques enregistrées par les deux méthodes d'évaluations utilisées dans cette étude, les deux souches ont montrés une faible sensibilité car l'activité antimicrobienne des extraits et particulièrement ceux de Sig et Biskra n'étaient perceptible qu'à 100mg/ml comparativement à l'amphérocine B qui présente en action sur les souches testées avec une valeur de CMI égale à 2,5µg/ml de. En comparent nos résultats avec la littérature on constate que les extraits d'*A. halimus* sont inactifs contre ces champignons dermatophytes qui sont responsables de certaines affections fongiques cutanées. D'après Lewis et Ausubel (2006), l'activité inhibitrice de la croissance microbienne d'une molécule bioactive est déterminée par des valeurs de CMI s'échelonnent de 0,1 à 1mg/ml et dans un intervalle de 0,01 à 10µg/ml sont importantes pour les

antibiotiques d'origines microbiennes et qui provoquent l'inhibition de la prolifération microbienne. En effet, l'inefficacité des extraits d'*A. halimus* contre ces souches dermiques comparativement a l'antibiotique de référence est liée non seulement à l'absence des molécules antifongiques spécifiques dans les extraits employer, même avec l'identification des acides phénoliques et des flavonoïdes, dont leurs distributions varies selon les organes et les écotypes choisie pour cette étude. En plus, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type d'extrait, ainsi que, la méthode d'extraction et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires qui sont des facteurs influencent la capacité d'inhibition des microorganismes (Cushnie et Lamb, 2011). Toutefois, la structure membranaire des deux souches y compris l'épaisseur de la paroi externe peuvent être à l'origine de cette résistance et qui semble être dû soit à : l'Evacuation de la substance antifongique au milieu externe de la cellule par le système d'efflux (Calabrese et *al.,* 2000), l'inhibition de pénétration de la substance à l'intérieur de la cellule (Morschhauser, 2002), l'altération d'autres enzymes de la même voie métabolique (Semelcki et *al.*, 2006). Ainsi, l'inhibition de la transformation de l'antifongique en forme active et l'altération de la cible (surproduction, modification, voire, disparition de la cible). Ajoutant, le caractère morphologique de dimorphismes de *Candida* qui lui confère la propriété de résistance au changement des conditions environnementales extrêmes ainsi que physico-chimique comme il a été signalé dans la partie bibliographique.

Il été difficile de comparé les résultats de l'effet antifongique d'*A. halimus* par d'autres études antérieurs car aucune recherche n'a été fondé à notre connaissance sur ces espèces fongiques. Cependant, les travaux de Abd El-Rahman et *al*. (2006), ont exhibé l'activité antibactérienne des extraits de méthanol et de l'hexane de cette espèce végétale contre des espèces bactériennes pathogènes à Gram positifs et à Gram négatif.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'investigation scientifique menée sur l'*Atriplex halimus* est articulée sur l'influence des zones d'échantillonnage sur le rendement, la quantité et la qualité chimique des composés phénoliques extraits des feuilles et des tiges. L'intensité des pouvoirs antioxydant et antifongique et leur relation avec les composés phénoliques présents dans les extraits éthanoliques des deux parties aériennes constitue les paramètres clés de ce projet.

L'estimation quantitative montre une variation entre les organes végétaux. Ainsi, les feuilles des trois écotypes notent des taux élevés en rendement brut avec une accumulation importante de composés phénoliques (Polyphénols, flavonoïdes, flavonols) et de caroténoïdes. Cependant, une influence de la provenance de l'espèce a été également constatée. Les valeurs enregistrées pour les extraits de Mazagran et Sig sont plus remarquables que ceux de Biskra. De même, une abondance en acides phénoliques et en flavonoïdes, représentés par des structures simples acylés et glycosidés en particuliers (flavonols, flavanones et flavones), ont été décelés par l'analyse qualitative (HPLC-DAD). Les tiges marquent la présence seulement de neufs flavonoïdes, avec une attribution variable entre les écotypes. Ce qui a contribué à la variation de l'activité antioxydante entre les organes des différents extraits. Par conséquent, par apport aux tiges, les extraits de feuilles révèlent une capacité antioxydante importante avec doses dépendances par les tests de CAT, DPPH, ABTS et le test de blanchiment de ß carotène. Cette particularité est en relation avec la diversité structurelle des biomolécules présents dans les deux organes, vu que les feuilles sont caractérisées par la présence des acides hydroxybenzoïques et de l'acide hydrocinamique, ainsi que, de la lutéoline-7-*O*-rutinoside (flavone), apigénine-6,8-di-*C*-glucoside (Vicenine-2) (flavone) et la quercitine-3-glucoside (Flavonol) dans les feuilles par apport aux tiges (la kaempférol 3-*O* acyl-diglycoside (flavonol) et l'apigénine-7-*O*-glucoside (flavone).

Toutefois, des écarts considérables entre les extraits (feuilles et tiges) des trois écotypes et les antioxydants de synthèse (Trolox, BHT) ont été remarqués. Les extraits de tiges de Biskra décèlent une capacité non seulement anti-radicalaire (DPPH, ABTS) supérieure au trolox, mais aussi une activité similaire au BHT dans l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à la β-carotène, comparativement aux extraits de Sig et Mazagran (feuilles et tiges) qui sont apparus moins voir inefficace que les standards, même avec leur forte teneur en composés phénoliques. Cette propriété est en rapport avec la présence de l'Apéginine et Naringénine en particulier. Ceci indique une activité antioxydante non dépendante de la concentration des composés phénoliques. Le pouvoir antioxydant est en corrélation étroite avec la structure moléculaire de ces dernières. Néanmoins, une activité synergique des molécules est également observée. En effet, le nombre des groupements

hydroxyles libres, le degré de méthylation, de glycosylation et l'acylation constituent les facteurs déterminant le pouvoir antioxydant.

En revanche, il a été constaté, par les deux méthodes d'évaluation, une faible activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* et *C. troplicalis*, en comparaison à l'antibiotique de synthèse. La sensibilité des souches n'a été appréciée qu'a des concentrations élevés des extraits (60, 80 et 100 mg/ml) avec des zones d'inhibitions ne dépassant les 12mm et des taux d'inhibition moyens. Chez *Atriplex halimus* , à l'absence des biomolécules fortement antimicrobiennes typiques ou spécifiques dans les différent extraits, mais aussi à l'imperméabilité de la paroi des levures testés aux molécules bioactives détecté dans les différent extraits. Ajoutant, le caractère morphologique de dimorphismes des germes qui peuvent être à l'origine cette résistance.

En outre, la méthode et le solvant employés pour l'extraction, la période et les conditions d'échantillonnage, les conditions environnementales des trois écotypes, ainsi que les caractères génétiques de ces derniers sont les facteurs influençant non seulement la composition phytochimique (quantitative et qualitative) mais aussi la propriété biologique. En effet, l'*Atriplex halimus* peut constituer une alternative naturelle comme antioxydant dans les industries agro-alimentaires, la phytothérapie et même l'alimentation du bétail pour prévenir les dommages qui peuvent être causés par les stress oxydatifs.

Ce présent travail, ouvre de nouvelles perspectives de recherches permettant d'expliquer la relation entre le pouvoir antioxydant et antimicrobien ainsi, l'application sur des modèles vivants pour ce faire il sera donc nécessaire d'être orienté le travail vers :

- ✓ Développer d'autres procédés d'extraction pour avoir le maximum de molécules phytochimiques existants dans la matrice des différents organes végétales de l'*Atriplex halimus;*
- ✓ Diversifier les zones et les périodes d'échantillonnages;
- ✓ Isoler les molécules contenues dans les extraits actifs de *l'A. halimus;*
- ✓ Tester les molécules isolées, *in vivo,* sur différents modèles biologiques, afin de trouver d'autres applications thérapeutiques, comme anticancéreux et anti-inflammatoire ou en agro-alimentaire et même antimicrobienne.
- ✓ Étudier la cytotoxicité de ces molécules afin de confirmer ou d'infirmer l'activité attribuée à cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aarland RC, Morales Sanchez C, Parra Bustamante F, Villa Hernandez JM, Diaz Leon and Sanchez FA, 2015. Pharmacological and phytochemical study of medicinal plants used in Mexican folk medicine, *Indian J Traditknowle*, 14(4): 550-557.

Abd El-Rahman, HH, Mohamed MI, Gehad AEA, Awadallah IM, 2006. Ameliorating the Anti-nutritional factors effet in Atriplex halimus on sheep and goatsby ensiling or polyethylene glycol supplementation. *Int. J. Agr Biol* ; 8(6): 766- 769.

Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Laouar M, 2004. Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral: diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Cah. Options. Mediterr*, 62: 29-41.

Agbo-Godeau S, Guedj A, 2005. Département de pathologie de la muqueuse buccale, service de stomatologie et chirurgie maxillofaciale : Oral mycosis, *EMC-Stomatologie* (1) :30-41.

AGOUMI A Aarab, H et Tigli H, 2003. Précis de parasitologie médicale. Collection MEDIKA; Editions : Horizons.Vol (1): p385.

Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T, 2007. *Food Chem*, 101: 1383-1392.

Al-Bayati FA, 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (3): 403–406.

Alibert J, Ranjeva R, Boudet MA, 1977. Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg.*, 15: 279-301.

Alsan, M M, Issa, NC, Hammond S P, Milner D A., DeAngelo Jr, , Baden D J, Baden L R, 2011. *Candida albicans* cervical lymphadenitis in patients who have acute myeloid leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia,* 11: 375-377.

Al-Turki TA, Omer S, Ghafoor A, 2000. A synopsis of the genus *Atriplex* L. (Chenopodiaceae) in Saudi Arabia. *Feddes Repert*, 111: 261-293.

Alvarez S, Mendez P, Díaz C, Briggs H, Fresno M, 2008. Forage from the Canary Isles (Spain) adapted to arid lands. *J. Anim. Vet. Adv*, 7: 359-363.

Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N, 2003. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica ACTA*, 76(1): 55–61.

Ana Plazonić, Bucar F, Maleš Ž, Mornar A, Nigović B and Kujundži N, 2009. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules,* 14: 2466-2490.

Anderson CM, Halleberg A, Hogberg T, 1996. Advances in the development of pharmaceutical antioxydants. *Adv.drug Res*, 28: 65-180.

Antachopoulos C, Walsh TJ, Roilides E, 2007. Fungal infections in primary immunodeficiency's. *European journal of pediatrics,* 166: 1099-1117.

Aouadhi C, Ghazghazi H, Hasnaoui B, Maaroufi A, 2013. Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim*. 25 (73).

Aouissat M, Walker DJ, Hcini K, Belkhodja M, Correal E, 2011. Osmolyte concentrations in *Atriplex halimus* L. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Adapted to salinity and low temperature (*Chenopodiaceae*). *Anales Biologia*, 33: 117-126.

Arimboor R, Sarin Kumar K, Arumughan C, 2008. Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippopha¨e rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47: 31-38.

Arnaud M B, Costanzo M C, Shah P, Skrzypek M S, Sherlock G, 2009. Gene ontology and the annotation of pathogen genomes: The case of candida albicans. *Trends in microbiology*, 17: 295-303.

Aruoma, OL, 1996. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists'Society*, 73: 1617-1625.

Awono A, Manirakiza D, Ingram V, 2009. Mobilisation et renforcement des capacités des petites et moyennes entreprises impliquées dans la filière des produits forestiers non ligneux en Afrique Centrale. CIFOR: Cameroun. http:cameroun-foret.com/fr/bibliotheque/10666.

Azam G, Grant CD, Nuberg IK, Murray RS, Misra RK, 2012. Establishing woody perennials on hostile soils in arid and semi-arid regions e a review. *Plant Soil*, 360: 55-76.

Babar A, Hahn M, Paek EJ, 2007. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures, *Molecules*. 12: 607-621.

Badillet G, 1982. Les dermatophytes. Atlas clinique et biologique. : Edition *Varia*. Paris. 219pp.

Bahorun T, 1997. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus*. 83-94.

Balasundram N, Sundram K, et Samman S, 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.

Barrow JR, Osuna P, 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments*, 51: 449 459.

Bayoumi MT, El-Shaer HM, 1992. Impact of halophytes on animal health and nutrition, in: V.R. Squires, A.T. Ayoub (Eds.), Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 267.

Baytop T, 1999. Therapy with plants in Turkey, past and present, second ed. Nobel Tip Kitapevi, Istanbul (in Turkish).

Belkheiri N, 2010. Dérivés phénolique à activité antiathérogénes. *Thése de Doctorat.* p244: pp113. *université Paul Sabatir. Toulouse,*

Belouad A, 2001. Plantes médicinales d'Algérie. Ed. *Office des Publications Universitaires*, Alger, pp. 284.

Ben Ahmed H, Zide El Gazzah M, Grignon C, 1996. Croissance et accumulation ionique chez *Atriplex halimus* L. *Cahier Agriculture*, 5:367-372.

Ben Mansour H, Latrach Tlemcani L, 2009. Les colorants naturels sont ils de bons additifs alimentaires? Phytothérapie, 7: 202-210.

Benhammou N, Ghambaza, N, Benabdelkader S, Atik-Bekkara F and Kadifkova Panovska T, 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata.* International Food Research Journal. 20(5): 2057-2063

Benhammou-Belyagoubi N, Benyagoubi L and Atik Bekkara F, 2014. Phenolic contents and antioxidant activities *in vitro* of some selected Algerian Plants. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(40): 1198-1207.

Benlarbi F, 2004. Caractérisation des lipides et des phénols de quelques groupes d'oliviers d'Algérie. Mémoire de magister. Laboratoire des sciences fondamentales.. P: 70, 86 et 88. Université de Laghouat.

Bergheul S, 2018. Etude de l'activité antimicrobienne et bioinsecticide de *Ruta chalepensis* L., *R. angustifolia* Pers. et *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) A. Juss. *vis-à-vis* de quelques bioagresseurs de la culture de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Thése de doctorat ; université de abdel Hamid Ibn Badiss 256pp.

Berrougui H, Maxim I, Cherki M, Khalil A, 2006. Marrubium vulgare extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP macrophage. *Life Sciences*, 80: 105–12.

Bhooshan Pandey K, Rizvi SI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease Landes Bioscience. *Medicine and Cellular Longevity*, 2(5): 270-278.

Biswal B, 1995. Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30: 3-13.

Biswal B, 1995. Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light", Journal ofPhotochemistry and Photobiology B: Biology, 30: 3-13.

Biyiti L F, Meko'o DJL, Tamzc V and Amvam ZPH, 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, 13: 11-20.

Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II, 2002. The epidemiology of candida glabrata and candida albicans fungemia in immunocompromised patients with cancer. *The American journal of medicine*. 112, 380-385.

Boizot N, Charpentier JP, 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA. p 79.

Boora F, Chirisa E, Mukanganyama S, 2014. Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and Their Phytoconstituents. *Journal of Food Processing. p7*.

Boros B, Jakabova S, Dornyei A, Horvath G, Pluhare Z, Kilar F, Felingera A, 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.

Bouayed J, Rammal H, Younos C, Dicko A, Soulimani R, 2008. Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Springer*, 4: France.

Boudjouref M, 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d *'Artemisia campestris* L., Thèse de magister. p99. université Ferhat Abbes, Sétif, Algérie

BOUKRI NEH, 2014. Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout," université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie

Boulekbache-Makhlouf L, Slimani S, Madani K, 2012. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41: 85-89.

Bourgou S, Serairi Beji R, Medini F, Ksouri R, 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 28 (12): 1649-1655.

Bouyahya, Dakka N, Lagrouh F, Abrini J and Bakri Y, 2018. Anti-dermatophytes Activity of *Origanum compactum* Essential Oil at Three Developmental Stages. *Phytothérapie, 11*

Bouzouina M, Amari NO, Berkani A, Lotmani B, Hanafi M, Lazizi A, 2016. Total phenolics contents, flavonoïds contents, and fatty acids compositions in *Thymelaea hirsuta* L. Aerial Parts, Grown in Western Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 10(1): 16-22.

Brito A, Ramirez J E, Areche C, Sepúlveda B, Simirgiotis M J, 2014. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19: 17400-17421.

Broadasky TF, Lewis C, Eble TE, 1976. Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr*, 123: 33-44.

Bruggisser R, Daeniken KV, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H, 2002. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTTtetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(05), 445-448.

Bruhlmann C, Marston A, Hostettmann K, Carrupt PA, Testa B, 2004. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chem. Biodivers*, 1(6): 819-829.

Bruneton J, 1999. Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, (Ed.) Tec et Doc Lavoisier, p 1120.

Bruneton J, 2008. Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris*. pp198-260.

Buchanan B, Gruissem W, Jones R, 2000. American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp1250-1318.

Buer C S, Gloria K M and Djordjevic M A, 2007. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in Arabidopsis. *Plant physiology*, 145*:*478-490.

Butler LG, Price ML, Brotherton JE, 1982. Vanillin assay for proanthocyanins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemestry*, 30:1087-1089.

Bylka W, Stobiecki M, Franski R, 2001. Sulphated flavonoid glycosides from leaves of *Atriplex hortensis.* *Acta Physiologiae Plantarum*, 23 (3): 285-290.

Cai Y, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H, 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*. 78: 2872

Calabrese D, Bille J, Sanglard D, 2000. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology*, 146: 2743-2754.

Carvalho A, Cunha C, Pasqualotto A C, Pitzurra L, Denning D W, Romani L, 2010. Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases. *Int J Infect Dis*, 14 (6): 460-468.

Castaneda-ovando A, Pacheco-Hernández ML, Elena Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Carlos Andrés Galán-Vida CA, 2009. Chemical studies of anthocyanins: *a review. Food Chemistry*, 113(4): 859-871.

Chabasse D, Guiguen C l, Contet-Audonneau N, 1999. Mycologie médicale. Paris: *Masson*, 324pp.

Chalbi N, Demarly Y, 1991. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, John Libbey Eurotext, pp.67.

Chaouche T M, Haddouchi F, Ksour R, Medini F, El-Haci IA, Boucherit Z, Sekkal FZ, Atik-Bekara F, 2013a. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L. *Free Radicals and Antioxidants*, 3: 43-46.

Chaouche TM, 2014. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antifongiques des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat en biologie,p122: pp 119. Université Abou-bakr-Belkaïd, Tlemcen.

Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F, 2013b. In vitro evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*. *Phytothérapie*, 11:244-249.

Chaudhry PS, Cabrera J, Juliani HR, *et al*., 1983. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol*, 3 (13), pp1995-8

Chikhi I, Allali H, Dib M E A, Medjdoub H, Tabti B, 2014. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Dis*, 4: 181-184.

Chung KT, Wei CI, Johnson MG, 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Techn*, 9: 168-175.

Contet-Audonneau N et Leyer C, 2010. Émergence d'un dermatophyte transmis par le cochon d'Inde et proche de Trichophyton mentagrophytes var. erinacei : T. mentagrophytes var. porcellae. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol*, 20 (4): 321-325.

Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hermández E, García-Villanova B, 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res. Int.* 44: 2047-2053.

Corona G, 2011. Seaweed polyphenols: bioavailability and Healthy benefits. Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction, p5.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1):71-76.

Costa G M, Ortmann C F, Schenkel E P, Reginatto F H, 2011. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia*Species. Journal of brizilian chemical society, 22(6): 1096-1102.

Cushnie TPT, Lamb AJ, 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 38: 99-107

Dacosta E, 2003. Les phytonutriments bioactifs.*Yves Dacosta* (éd). Paris, p317.

Daglia M. 2012. Polyphénols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (2): pp174-181.

Dai J, Mumper RJ, 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.

Daniels W, Glover D D, Essmann M, Larsen B, 2001. Candidiasis during pregnancy may result from isogenic commensal strains. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 9: 65-73.

Darwazah A, Berg G, FarisB. 1999. Candida parapsilosis: An unusual organism causing prosthetic heart valve infective endocarditis. *The Journal of infection*, 38: 130-131.

Dawidowiez A, wianwoska D, Baramiak B, 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigru* L. (antioxidant properties of extracts). *Food Science and Technology*, 39: 308-315.

De Oliveira S, de Souza GA, Eckert CR e*t al*, 2014. Evaluation of antiradical used in determining the antioxidant capacity of pure coumpounds and plant extracts. *Quimica Nova*, 37 (3)

De Rijke E, Out P, Niessen, WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT, 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2): 31-63.

Deelstra JJ, Neut D, Jutte PC, 2012. Successful treatment of candida albicans-infected total hip prosthesis with staged procedure using an antifungal-loaded cement spacer. *The Journal of*

arthroplasty. Association pharmaceutique canadienne, Compendium of nonprescription products :summer 2001, 8th ed., Canadian Pharmacists Association, Ottawa, 2001.

Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Holzer R, Feller U, 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot*, 52: 253–266. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.02.004

De-Reynal B, Multon J L, 2009. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaire. Ed 4. Paris: Tec et Doc Lavoisier.

Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Bernède C, Robert V, Raoux D, Chachaty E, Forget E, Claire, Lacroix F D, and the YEASTS group Emerging Infectious Diseases, 2008. Clonal Population of FlucytosineResistant Candida tropicalis from Blood Cultures, France. 14 (4). www.cdc.gov/eid

Develoux B, 2005. Candidose et levuroses diverses. *EMC-Maladies infectieuses*, 2(3): 119-139.

Dewick PM, 1993. Isoflavonoids. The Flavonoids Advances in research since 1986. (Ed.) Harborne, J.B., Chapman & Hall. London, pp117-238.

Dewick PM, 1995. The biosynthesis of shikimate metabolites. *National Product Reports*, 12: 579-607.

Dinelli G, Bonetti A, Minelli M, Marotti I, Catizone P, Mazzanti A, 2006. Content of flavonols in italian bean (*Phaseolus vulgaris L.)* ecotypes. *Food Chemistry*, 99: 105-114.

Dixon RA, Paiva NL, 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism, *Plant cell*, 7: 1085-1097.

Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH, 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22: 296-302.

Doat J, 1978. Les tannins dans les bois tropicaux. *Revue bois et forêts des tropiques*, 182 :37 54.

Dupont B, 1985. L'écobiologie des *Candida. Laboratoire Squibb*.

Dupont F, Guignard JL, 2007. Abrèges botanique systématique moléculaire. 14ème édition révisée, Masson. Paris, pp.185.

Durand D, Damon M, Gobert M, 2013. Le stress oxydant chez les animaux de rente: Principes généraux oxidative in farm animals: General aspects ; *Cahier de nutrition et de diététique*, 48(5): 218-224.

Dutuit P, 1999. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimuspour le* repérage in vitro d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitution de clones. Publié par CTA. P:137-141.

Ebrahimzadeh MA, Pourmmorad F, Hafezi S, 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turk J Biol, 32: 43-49.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D, 2003. Epidemiology de Candida species infections in criticall ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*, 3: 685-702.

El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ. Mortensen V, Phillip DM, Truscott TG, 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch.Biochem. Biophys*, 430 (1): 37-48.

Elangovan S, Srinivasan S, Allareddy V, 2012. Hospital-based emergency department visits with oral candidiasis in the USA. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 114: 26-31.

ElGharras H, 2009. Polyphenols: Food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12): 2512–2518.

El-Haci I, Atik-Bekkara F, Didi A, Gherib M, Didi MA, 2012. Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahra Algérienne. Phytothérapie 10(5): 280-285.

Emam SS, 2011. Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. J.*Nat.Prod*, 4: 25-41

EspinelIngroff A, 1997. Clinical relevance of antifungal resistance, *Infect Dis Clin N Am*, 11: 929.

Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdelly C, 2012. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiol. Biochem*, 52: 1-8.

Fauchère JL, Avril JL, 2002. Bactériologie générale et médicale. *Ellipses Editions Paris*, 365p.

Felleh H, Ksouri R, Abdelly C, 2007. Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les differents organes de l'artichaut sauvage, Cynara cardunculus. *Revue des régions Arides*. 1: 341-344.

Féret JB, 2009. Apport de la modélisation pour l'estimation de la teneur en pigments foliaires par télédétection. Tèse de doctorat à l'universite PIERRE et MARIE CURIE. France, 214 pp: 16.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A, 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16: pp1486-507.

Fidel PL, Cutler JE, 2011. Prospects for development of a vaccine to prevent and control vaginal candidiasis. *Current Infectious Disease Reports*, 13: 102-107.

Fleuriet A, Macheix JJ, 2003. Phenolics acids in fruits and vegetables. *Marcel Dekker*, New York: 1-41.

Fraga CG, 2007. Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, 59(4-5), 308-315.

Franclet A, Le Houérou HN, 1971. Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. *Food and Agriculture Organization*, Rome.

Frankel EN, Meyer AS, 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13): 1925-1941.

Frutos P, Hervás G, Giráldez F and Mantecón A, 2004. Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 191-202.

Fuchs J, 1998. Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR-alpha–tocophérol, L–ascorbic acid and ß–carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad. Biol. Med*., 25: 848-873.

Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Tguizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I, 2007. Chemical and biological characteristic of Cuminum cyminum and Rosamarinus officinalis essential oils. *Food chemistry*, 102(3): 898-904.

Ghedira K, 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.

Ghnimi W, 2015. Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis et Jatropha curcas.* Evaluation de leur propriété anti-oxydante et leur action inhibitrice sur l'activité de l'acetylcholinestérase. Thèse de doctorat en cotutelle universite de lorraine (france) et universite de carthage TUNISIE), p244.

Goodin JR, 1979. *Atriplex* as a forage Grop for arid lands. *New agricultural grops .Ed. G.A. Ritchie*. Pp: 133-147.

Gourguillon L, Destandau E, Lobstein A, Lesellier E, 2016. Comparison of different ways to extract dicaffeoylquinic acids from a halophytic plant. *Compte rendu Chimie*, 19: 1133-1141.

Gu W, Müller G, Schlein Y, Novak RJ, Beier JC, 2011. Natural plant sugar sources of Anopheles mosquitos strongly impact malaria transmission potential. *PLoS ONE*, 6: 15996.

Guignard JL, 2006. Biochimie végétale. *Dunod*, 2ème édition, Paris, pp. 274.

Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A, 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 141(1): 253-258.

Hadi M, 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thése doctorat. Option Pharmacochimie..155 p. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Hage CA, Goldman M, Wheat LJ, 2002. Mucosal and invasive fungal infections in hiv/aids. *European Journal Of Medical Research*, 7: 236-241.

Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, Nurnberger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR, Schmelzer E, 1995. Oligopeptide elicitormediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Nalt Acad Sci. USA,* 92: 4150-4157.

Halliwell B, 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev*, 52 (8): 253-265.

Han X, Shen T, Lou H, 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ, 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(2): 345-349.

Harmsen D, Schwinn A, Bröcker and Frosch, 2002. Molecular differentiation of dermatophyt fungi. *Micosyes*, 43 (2):91-3.

Hasmida MN, Nur Syukriah AR, Liza MS and Mohd Azizi CY, 2014. Effect of different extraction techniques on total phenolic content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* galls. *International Food Research Journal*, 21(3): 1075-1079.

Hayouni E A, Abedrabba M, Bouix M, et Hamdi M, 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105: 1126-1134.

Hazan I, Sepulveda-Becerra M, Liu H, 2002. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 13: 134-145.

Heim EK, Tagliaferro AR, Bobilya DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.

Heinrich M, Teoh HL, 2004. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol*. 92: 147-162.

Hider RC, Liu ZD, Khodr HH, 2001. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335:190-203.

Hsu F C, Lin P C, Chi C Y, Ho M W, Ho C M, Wang J H, 2009. Prognostic factors for patients with culture-positive candida infection undergoing abdominal surgery. *Journal of microbiology, immunology, and infection.* 42: 378-384.

Huang HC, Lin JK, 2012. Puerh tea, green tea, and black tea suppress hyperlipidemia, hyperleptinemia and fatty acid synthase through activating AMPK in rats fed a high-fructose diet. *Food Funct*, 3: 70-7.

Hung-Ju C, Baskaran S I and Bing-Huei C, 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Taraxacum formosanum Kitam by Liquid ChromatographyTandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *Int. J. Mol. Sci*, 13: 260-285.

Hussain T, Koyro HW, Huchzermeyer B, Khan MA, 2015. Eco-physiological adaptations of *Panicum antidotale* to hyperosmotic salinity: water and ion relations and anti-oxidant feedback. *Flora*, 212: 30-37.

Hyardin A. 2008. Étude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels. Thèse doctorat, institut national polytechnique de lorraine, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. Nancy université, pp 255: p96.

Ibrahim R M, El-Halawany A M, Saleh D O, El Moataz Bellah El Naggar, El-Shabrawy A E R El-Hawary S S, 2015. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from Securigera securidaca flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25: 134-141.

Iwashina T, 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res*, 113: 287-299.

Jain A, Ranade R, Pritam P, Joshi N, Vavilala SL and Jain A, 2014. A comparative study of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents in different parts of *Helicteres isora* L. *American Journal of Life Sciences*, 2(5): 292-302.

Jang G H, Kim H W, Lee M K, Young Jeong S, Ram Bak A, Lee D J and Jung Bong Kim, 2018. Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the Prunus genus by UPLC-DADQTOF/MS. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 25: 1622–1631.

Jean-Baptiste FÉRET, 2009. Mesures physiques en télédétection école doctorale des sciences de l'environnement d'ile de France. Thèse de doctorat. p185 : pp14. Université pierre et marie curie.

Jiofack T, Fokunang C, Guedje N M, Kemeuze V, Fongnzossie E, Nkongmeneck BA, Mapongmetsem P M, Tsabang N, 2010. Ethnobotanical uses of medicinals plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medicine and Medical* Sciences, 2 (3): 60-79.

Joffin JN, Leyral G, 2001. Microbiologie technique: *Dictionnaire des techniques.* Ed 3 (1), 314: pp39-16.

Kadereit G, Mavrodiev EV, Zacharias EH, Sukhorukov AP, 2010. Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *Am. J. Bot*, 97: 1664-1687.

Kadri A, Zarai A, Békir A, et al, 2011. Chemical composition and antioxidant activity of Marrubium vulgare L. essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol*, 10: 3908-14.

Kamat JP, Boloor KK, Devasagayam TP, 2000. Chlorophyllin as an effective antioxidant against memebrane damage in votre and ex vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1487 (2-3) : 113-127.

Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary lC, 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 1293: 156–163.

Karamac M, Kosicska A, Pegg RB, 2005. Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 14/55 (2): 165-170.

Kessler JJ, 1990. *Atriplex* forage as a dry season supplementation feed for sheep in the Montane Plains of the Yemen Arab Republic. *Journal of Arid Environments* **19**, 225-234.

Khadhri A, El mokni R, Smiti S, 2013. Composés phenoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera. Revue Social Science National*, 39: 44-52.

Khazai V, Piri KH, Nazeri S, Karamian R, Zamani N, 2011. Free radical scavenging activity and phenolic and flavonoid contents of Echinophora Platyloba DC. *Asian J. Med. Pharm. Res*. 1(1): 09-11.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds molecules, 18: 2328-2375.

Kim HP, Son KH, Chang HW, kong SS, 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action macanism. *J Pharmaco .Sci*, 96: 229-254.

Kirk PM, Cannon PF., Minter D.W and Stalpers JA, 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th edn. CABI.

Konan KV, Tien Le, Mateescu MA, 2016. Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 28: 5543-5728.

Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki A A, Sayyad N, Stosic- Grujicic S, 2013. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and antiproliferative activity. *Food Chemistry*, 136: 120-129.

Krinsky NI, 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure & Appl. Chem*, 66(5): 1003-1010.

Ksouri R, Megdiche KW, Jallali I, Debez A, Magné C, Hiroko I, Abdelly C, 2011. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical: nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol*, 32: 1-38.

Kubola J, Siriamornpun S, 2008. Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in-vitro. Food chemistry*, 110(4): 881-890.

Kumaran A, Karunakaran RJ, 2007. In vitro antioxidant of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (2): 344-352.

Kundu JK, Surh Y, 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2): 243– 261.

Laguerre M, Lopez-Giraldo L, Lecomte J, Pina M,Villeneuve P, 2007. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oxford College of London*, 14 (5): 278-292.

Le Houérou HH, 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agrofor. Sys*. 18: 107-148.

Le Houérou HN, 1971. Les bases écologiques de la production pastorale et fourragère en Algérie. F.A.O., Rome, 60 p.

Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.

Lin L Z, Harnly J M, 2013. Quantitation of Flavanols, Proanthocyanidins, Isoflavones, Flavanones, Dihydrochalcones, Stilbenes, Benzoic Acid Derivatives Using Ultraviolet Absorbance after Identification by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J.Agric food chem* 60 (23): 5832-5840.

Liu H, Zhang L, Lu S, 2012. Evaluation of antioxidant and immunity activities of 96 quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, 17: 4281-4291.

Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK, 2005. Thea flavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp 41. *Biochim. Biophys. Acta. Gen Subj*, 1723: 270-81.

Liu Y, lu B, Xu L, 2010. The antioxidant activity and hyperlipidemic activity of total flavonoids from the fruit *Rosa laevigata* Michx, *Naturel science*, 2 (3): 175-183.

Livermore DM, 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5): 634-640.

Lobstein A, 2010. Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.

Lotmani, B., Fatarna L, Berkani A, Rabier J, Prudent P, Laffont-Schwob I, 2011. Saltbush, *Atriplex halimus*, tolerant to high concentrations of lead, zinc, and copper for phytostabilization of heavy metal-contaminated soils. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2: 20-26

Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L, 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientsis*, 1-4: 119-125.

Macheix JJ, Fleuriet A, Manchado S, 2005. Les composés phénoliques dans la plante: structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: les polyphénols en agroalimentaire, Cheynier V., Sarni Manchado P. *Lavoisier*, Paris: 510p.

Macheix JJ, Fleuriet A, 2006. Composés phénoliques dans la plante- Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaires*, Tec&Doc, editor. Paris: Lavoisier. pp. 1-50

Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C, 2005. Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, Lausane, pp. 192 : 4-5..

Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N, 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) revue *"Nature & Technologie"*. *B- Sciences Agronomiques et Biologiques.*

Maire R, 1962. Centrospermales (Chenopodiaceae), Sect. Teutlioides Ulbrich, in : Quezel P. (Ed.), Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara), VIII. Dicotyledonae, Paul Lechevalier, Paris, pp.81–84.

Maire R, 1962. Flore de l'Afrique du nord,. Ed. Paul Le Chevalier. Paris,. 7 : 581-591.

Maizak K, BRAC D L P, Hammiche V, 1993. Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. *Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie*, *Heidelberg*:169-181.

Marston A, 2007. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, 68 (22-24), 2786-2798.

Martin MJ, Marhuenda E, Perez-Guerrero C, 1994. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, 49 (3): 144-50.

Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(4): 1749-1754.

Maurand A, Gagnaire J, Berthelot P, 2018. *Candida auris* : émergent, multi-résistant, nosocomial, transmissible. La BHRe des Candida ? Unité de gestion du Risque Infectieux, CHU de Saint-Etienne Bulletin national CPias (10).

Medina-Medrano J R, Mares-Quiñones M D, Valiente-Banuet J I, Vázquez-Sánchez M, Álvarez-Bernal D, Villar-Luna E, 2017. Determination and quantification of phenolic compounds in methanolic extracts of Solanum ferrugineum (Solanaceae) fruits by HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS/TOF. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 40 (17): 900-906.

Megdiche KW, Chaouachi F, M'Rabet R, Medini F, Zaouali Y, Trabelsi N, Ksouri R, Noumi E, Abdelly C, 2011. Antioxidant and antimicrobial properties of *Frankenia thymifolia* Desf. fractions and their related biomolecules identification by gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Academic journal*, 5 (24): 5754-5765.

Menaa F, Menna A, Tréton J, 2014. Polyphenols against akin aging in polyphenols in human health and disease, 1: 819-830.

Merzlyak MN, Gitelson AA, 1995. "Why and what for the leaves are yellow in autumn? On the interpretation of optical spectra of senescing leaves (*Acer platanoides* L.), *Journal of Plant Physiology*, 145: 315- 320.

Mesnoua M., Mateos-Naranji E, Bacia-Pierdras JM, Alberto J, Pérez-Romero, Lotmani B, Redondo-Gmez S, 2016. Physiological and biochemical mechanisms preventing CD toxicity in the hyperaccumulators *Atriplex halimus* L. *Journal of plant physiology and biochemistry*, 106: 30-38.

Mirsky, Nitsa, 2001. Naturally extracted and synthetic hypoglycemic or hypolipidemic compositions. Application N° 09/ 842-971.Thomasset S, Berry D, Garcea G, Marczylo T, Steward W, Gescher A, 2007, Dietary polyphenolic phytochemicals-promising cancer chemopreventive agents in humans . A review of their clinical properties. *Int. J. Cancer*, 120: 451-458

Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405-410.

Mohammedi Z , Atik F, 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarixaphylla* L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2: 609-615.

Molyneux P, 2004. The use of the stable radical diphenilpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of science and Technology*, 26 (2): 211-219.

Monod M, Fratti B, Mignon F, Baudraz-Rosselet, 2018. Dermatophytes transmis par les animaux domestiques. *Revue Médicale Suisse*, 10: 749-53.

Morschhauser J, 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*, 1587: 240-248.

Musialik M, Kuzmicz R, Pawtowski T S, Litwinienko G, 2009. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *Journal of Organic Chemistry*, 74(7): 2699-2709.

Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA, 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(15): 173-179.

N'Guessan A H O, Dago Déliko CE, Mamyrbékova-Békro JA, Béko YA, 2011. Teneurs en composé phénoliques de 10plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de Génie Industriel*, 6: 55.

Naczk M, Shahidi F, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054: 95-111.

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. Fourrages, 216: 333-338.

Nedjimi, Somaru R, Achar P, 2006. Growth, water relations, Proline and ion content of in vitro cultures *Atriplex halimus* subsp. Schweinfurthii as affected by $CaCl_2$. *International Journal of the Faculty of Agriculture and Biology*, 1(2): 79-89.

Négre R, 1961. Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome I. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (France).

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimia R, Aarni M, Oksman-Caldentey K M, 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81: 485-493.

O'Kennedy R, Thornes RD, 1997. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. *John Wiley & Sons Inc*. New York, p348.

Olennikov D N, Kashchenko N I, Chirikova N K, Akobirshoeva A, Ifrat N. Z and Vennos C, 2017. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (Calendula officinalis) Flowers and Preparations. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 : 1685

Ortiz-Dorda J, Martinez-Mora C, Correal E, Simon, CENIS JL, 2005. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean asin. *Annaly otany*, 95: 827-834.

Ozenda P, 2004. Flore et végétation du Sahara. 3ème éd, CNRS Editions, Paris

Parage C, 2013. Génomique de la biosynthèse des stilbènes chez la vigne (*Vitis vinefera*). Thèse de Doctorat, p232. Université de Strasbourg, France.

Parra-Herran CE, Pelaez L, Sola JE, Urbiztondo AK, and Rodriguez MM, 2010. Intestinal candidiasis: An uncommon cause of necrotizing enterocolitis (nec) in neonates. *Fetal and Pediatric Pathology*, 29: 172-180.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B, 2007. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 45: 321-346.

Pierre F, 2011. Impact de la consummation d'antifongiques sur *Candida* sp. Etude dans un service de reanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Thése de doctorat. Université Joseph Fournier.

Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R, 1994. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Annals of surgery*, 220: 751-758.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B, 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4: 25-39.

Portes E, 2008. Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat : Université de BORDEAUX I.

Poulin D, 2013. *Candida albicans*, plasticity and pathogeny Francophone des Laboratoires, 450 : 37-46.

Prache S, Gatellier P, Thomas A, Picard B, Bauchart D, 2011. Comparison of meat and carcass quality in organically reared and conventionally reared pasture-fed lambs. *Animal*, 5(12): 2001-2009.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific to determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269 (2): 337-341.

Prior R.L, Wu X, Schaich, K, 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, et al, 2012. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem*, 130: 695-701.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM, 2005. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1): 8-18.

Pyun MSS, Shin S, 2006. Phytomedicine, 13: 394-400.

Quèzel P, Santa S, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, pp.935-936.

Ragan MA, Glombitza KW, 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Physicological Research*, 4: 129-241.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved $ABTS^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.

Rebecca N, John DK, Deo O, John K, 2011. Antibacterial activity and phytochemical screening of eleven plants used as poultry ethnnomedicines in Southern Uganda. *Agricultural journal*, 6(6): 303–309.

Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Vecino-Bueno I, Feldman SR, 2011. Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. *J. Hazard. Mater*, 185: 862-9. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.101

Rezeg A, Achour S, 2005. Elimination d'acides organiques aromatiques par coagulation floculation au sulfate d'aluminium, *Larhyss Journal*, 4: 141-152.

Rhodes MJC, Wooltorton LSC, Hill AC, 1981. Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. *Academic Press*, Londres, 193-220.

Ribereau-Gayon P, 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Editions Dunod* ; Paris 254 pp.

Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical. Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.

Richter G, 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Edition Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, p322-323.

Rira M, 2006. Effet des Polyphénols et des Tanins sur l'Activité Métabolique du Microbiote Ruminal d'Ovins. Research Master, Mentouri Constantine University, Constantine.

Robards, K. and Antolovich, M, 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review, *Analyst*, 122(2): 11-34.

Rohman, A, Riyanto S, Yuniarti N, Saputra WR, Utami R, Mulatsih W, 2010. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* L.). *International Food Research Journal*, 17: 97-106.

Roilides E, 2011. Invasive candidiasis in neonates and children. *Early human Development.* 87 Suppl 1: S75-76.

Romero A, Garces R, Luengo J, Gomar S, Fernandez JA, Gregori J, 2012. Invasive candidiasis: Candida parapsilosis endocarditis over aortic valve prosthesis. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias*, 37(2): 116-121.

Rouessac F, Rouessac A, 2004. Chromatographie liquide haute performance. In *Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes*, Paris, pp. 36-59.

Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H, 2007. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region . *J. Ethnopharmacol*, 83: 251-265.

Sakagami H, Hashimoto K, Suzuki F, Ogiwara T, Satoh K, Ito H, Hatano T, Takashi Y, Fujisawa S, 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66: 2108 -2120.

Sakurai T, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Kizaki K, Kondoh Y, Izawa T, Ishida H, Radák, Z, Ohno H, 2010. Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem*, 21: 47-54.

Salgues R, 1963. Etude Sur quelques huiles essentielles nouvelles ou peu connues. *Materiae Vegetables*, 1(2): 139-147.

Samarth RM., Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar M, Kumar A, 2008. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*, 106: 868–873.

Sanchez-Moreno C, 2002. Methode used to evaluate the free radical scavengining activity in food and biological systems. *International Journal of Food and Science and Technology*, 8 (3): 121-137.

Sanda M A, G Zengin, Aktumsek A, Cakmak YS, 2015. Evaluation of antioxidant potential of two Daphne species (*D. gnidioides* and *D. pontica*) from Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6): 488-494.

Sass-Kiss A, Kiss J, Milotay P, Kerek MM and Toth-Markus M, 2005. Differences in anthocyanin and carotenoïd content of fruits and vegetables. *Food Research International* 38:1023-1029.

Saura-Calixto F, Goni I, 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94: 442-447.

Scalbert A,Williamson G, 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073-2085.

Schwarz H, Liebhard P, Ehrendorfer K, Ruckenbauer P, 2007. Potential growth and biomass productivity of Miscanthus_giganteus as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass Bioenerg*, 31: 145-152.

Selmecki A, Forche A, Berman J, 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug resistant *Candida albicans*.*Science*, 313(5785): 367-70.

Shinozaki S, Moriyama M, Hayashida J N, Tanaka A, Maehara T, Ieda S, Nakamura S, 2012. Close association between oral candida species and oral mucosal disorders in patients with xerostomia. *Oral diseases*, 18: 667-672.

Simirgiotis M J, Benites J, Areche C and Sepúlveda B, 2015. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules*, 20: 11490-11507.

Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC, 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *The British Jornal of Nutrition*, 99:12-22.

Stafford HA, 1990. Flavonoid metabolism. *CRC Press, Boca Raton, FL*, 298 p.

Stalikas CD, 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18): 3268-3295.

Stringi L, Amato G, Gristina L, 1991. The role of some forage shrubs in optimizing forage Arhab et al., 2009 486 production in a semi-arid Mediterranean area. *Agriculture Mediterranean*, 121: 16-23.

Takahama U, 1983. Redox reactions between kaempferol and illuminated chloroplasts. *Plant Physiol*, 71(3): 598-601.

Talamali A, Dutuit P, Le Thomas A, Gorenflot R, 2001. Polygamie chez *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae). Comptes Rendus de L'Acad. des Sci. Ser. III-Sci. De la Vie, 324 : 107-113.

Talamali A, Gorenflot R, Dutuit P, 2007. Hétérostylie intra-individuelle chez *Atriplex halimus* L. (*Amaranthaceae)*. *Comptes Rendus Biologies*, 330 (12): 871-879.

Tekwu EM , Pieme AC,Beng VP, 2012. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal Of Ethnopharmacology*, 142(1): 265-273.

Theerawitaya C, Samphumphaung T, Cha-um S, Yamada N, Takabe T, 2014. Responses of Nipa palm (Nypa fruticans) seedlings, a mangrove species, to salt stress in pot culture. Flora 209: 597–603.

Thomas M, 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). *Alimentation et Nutrition*. *Thèse de doctorat de*, p 289 : pp181. *Université d'Orléans*

Tortora GJ, Finke-berdell R, Christine L, 2012. Introduction à la microbiologie. 2éme Edition du renouveau pédagogique (ERPI), 624. pp 448.

Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C, 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech*, 43: 632-639.

Tsimogiannins DI, Oreopoulou V, 2006. The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

Tsuchiya H, Linuma M, 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from Sophora exigua. *Phytomedicine*, 7: pp 161-165.

Tumbarello M, Tacconelli E, de Gaetano Donati K, Morace G, Fadda G, Cauda R, 1999. Candidemia in HIV-infected subjects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18: 478-483.

Van Acker SA, Van Den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der, Vijgh WJ, Bast A, 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3): 331-342.

Vermerris W, Nicholson R, 2006. Phenolic Compound Biochemistry, *Springer*, Dordrecht.

Vilela C, Santos SAO, Coelho D, Silvab A M S, Freirea C S R, Netoa C P, Silvestre A J D, 2014. Screening of lipophilic and phenolic extractives from different morphological parts of *Halimione portulacoides*. *Industrial crops and products*, 52: 373-379.

Wang Y, Li Y, Xue H, Pritchard HW, Wang X, 2015. Reactive oxygen species-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila L.*) seeds. *Plant J*, 81: 438-452.

Wang Y, Jianxin Fu, Chao Zhang and Hongbo Zhao, 2016. HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Flavonoids from Leaves of Different Cultivars of Sweet Osmanthus Yiguang. *Molecules*, 21: 1224: 1-14

Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, *et al.* 2005. "Characteristics of candidaemia with Candida-albicans compared with non-albicans Candida species and predictors of mortality. *J Hosp Infect*, 61(2): 146-54.

W-Erdman J, Balentine JD, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly, Hollman JP, L-Keen C, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J, 2007.

Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 137 (3 supp1): 718s-737s.

Wilkinson DM, Sherratt TN, Phillip DM, Wratten SD, Dixon AFG, Young AJ, 2002. The adaptive significance of autumn leaf colours", Oikos, 99: 402-407.

Wilson A, 1987. Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol*, 13(3): 473-493.

Wu T, Zang X, He M, Pan S, Xu X, 2013. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric. Food Chem*, 6: pp 8185-8190.

Xie L X, Liu S Y, Chen Y S, Liu K, and Xue F, 2011. An animal experiment about early pulmonary candidiasis in immunosuppressive rabbits: Thin-section at images dynamically observed and proved by histopathological results. *Acta Radiol.* 52, 743-749.

Yang JY, Yumin D, Ronghua H, Yunyang W, Yan W, 2005. The structure anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide. Effect of carboxyl group and position of sulfation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36: 9-15.

Zem TL, Fernondez ML, 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 135: 2291-2294.

Annexes

Annexe 1. Screening des composants actifs

Tableau 9. Teneurs moyennes des extraits des feuilles et tiges de l'*A. halimus* de troisprovenances en métabolites secondaires.

Parties végétales aériennes	**Teneurs en molécules bioactives**			
	TPT (mg EAG/g MS)	**TFT** (mg ER/g MS)	**TFLT** (mg ERE/g MS)	**TCT** (mg ERE/g MS)
Feuilles	37,58±20,82[a]	2,88±1,10[a]	1,08±0.04 [a]	2,10±0,01[a]
Tiges	5,43±2,62 [b]	0,57±0.13 [b]	0,08[b]	0,27±0,04[b]

Tableau 10. Teneurs moyenne des extraits de l'*A. halimus* de trois provenances en métabolites secondaires.

Ecotypes	**Teneurs en molécules bioactives**			
	TPT (mg EAG/g MS)	**TFT** (mg ER/g MS)	**TFLT** (mg ER/g MS)	**TCT** (mg ER/g MS)
Bis	10,92±2.45 [c]	1,06±0,77[c]	0,48±0,51[b]	0,85±0,44 [b]
Maz	31,45±32,22[a]	2,42±2,02 [a]	0,80±0,79 [a]	0,77±0,76[c]
Sig	22,14±21,04[b]	1,68±1,21 [b]	0,45±0,43 [c]	1,95±1,96[a]

Tableau 11. Comparaison des moyennes des teneurs en métabolites secondaires dans les extraits des deux parties aériennes de l'*A. halimus* des trois provenance.

Provenance d'*A. halimus*	Partie végétale aérienne	**TPT** (mg EAG/g MS)	**TFT** (mg ER/g MS)	**TFLT** (mg ER/g MS)	**TCT** (µg EB/g MS)
Biskra	Feuilles	13,04±0,25 [c]	1,74±0,04[c]	0,92±0,03[b]	1,23±0,01[c]
	Tiges	8,80±0,08 [d]	0,45±0,02 [e]	0,04±00[e]	0,47±0,07 [d]
Mazagran	Feuilles	59,36±0,22[a]	4,17±0,06 [a]	1,48±0.05[a]	1,43±0,01[b]
	Tiges	3,55±0,36[e]	0,67±00 [d]	0,12±0.01[d]	0,10 [f]
Sig	Feuilles	40,34±0,33 [b]	2,74±0,01 [b]	0,82±0.04[c]	3,64±0,01[a]
	Tiges	3,94±0,40 [e]	0,63±0,01[d]	0,08±00[de]	0,25±0,02[e]

Tableau 12. Concentration moyenne des métabolites secondaires dans extraits des feuilles et des tiges de l'*A. halimus.*

Parties végétales aériennes	**Concentration des molécules bioactives**			
	CPT (mg EAG/g LE)	CFT (mg ER/g LE)	CFLT (mg ER/g LE)	CCT (mg ER/g LE)
Feuilles	175,59±1,30 [a]	69,97±21,87 [a]	27,22±8,49 [a]	49,05±18,96 [a]
Tiges	61,64±4,86 [b]	39,90±22,14 [b]	6,01±4,37 [b]	14.57±3,64 [b]

Tableau 13. Concentration moyenne des extraits de l'*A. halimus* de trois provenance en métabolites secondaires.

Ecotypes	**Concentrations des molécules bioactives**			
	TPT (mg EAG/g EL)	**TFT** (mg ER/g EL)	**TFLT** (mg ER/g EL)	**TCT** (mg ER/g EL)
Bis	75,81±13,31	35,79±24,16	15,86±16,56	28,97±13,13
Maz	173,72±149,35	81,27±19,54	23,05±13,65	21,77±13,65
Sig	106,31±79,05	47,75±8,40	10,94±6,53	44,69±32,95

Tableau 14. Comparaison des moyennes des concentrations métabolites secondaires dans les extraits des feuilles et tiges de l'*A. halimus* de trois provenances.

Provenance d'*A. halimus* (b)	**Partie végétale aérienne**	**CPT** (mg EAG/g LE)	**CFT** (mg ER/g LE)	**CFLT** (mg ER/g LE)	**CCT** (µg EßC/g LE)
Biskra	Feuilles	85,23±1,61[c]	56,71±1.46[c]	30,20±0,92[b]	41[b]
	Tiges	66,40±0.62[d]	14,86±0,80[e]	1,54 ±0,07[f]	17±3,00[d]
Mazagran	Feuilles	279,33±1.17[a]	98,20±1,35[a]	34,87 ±1,32[a]	33[c]
	Tiges	68,11±6,94[d]	64,35± 0,36[b]	11,23±0,52[d]	10[e]
Sig	Feuilles	162,21±1,48[b]	55,02±0,12[c]	16,59±0,77[c]	73[a]
	Tiges	50,41±5,18[e]	40,47±0,28[d]	5,28±0,10[e]	16[d]

Les lettres (a, b, c, d, e et f) représentes les différents groupes résultants du test de NEWMAN-KEULS à un seuil de 5%.

Tableau 15. Analyse de la variance de la teneur en polyphénols totaux (TPT) exprimée en (mg EAG/g MS).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	7956,563	17	468,033				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotype)**	1268,567	2	634,283	5855,804	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organe)**	4651,707	1	4651,707	42945,29	0		
VAR.INTER F1*2	2034,989	2	1017,495	9393,67	0		
VAR.RESIDUELLE 1	1,3	12	0,108			0,329	1,53%

Tableau 16. Analyse de la variance de la concentration en polyphénols totaux (CPT) exprimée en (mg EAG/g EL).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	116521,6	17	6854,211				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotype)**	30119,95	2	15059,98	893,961	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organe)**	58429,59	1	58429,59	3468,382	0		
VAR.INTER F1*2	27769,89	2	13884,95	824,211	0		
VAR.RESIDUELLE 1	202,156	12	16,846			4,104	3,46%

Tableau 17. Analyse de la variance de la teneur en flavonoïdes totaux (TET) révélée en (mgER/g MS).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	33,296	17	1,959				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotypes)**	5,55	2	2,775	2331,135	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	24,123	1	24,123	20263,24	0		
VAR.INTER F1*2	3,608	2	1,804	1515,412	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,014	12	0,001			0,035	2,00%

Tableau 18. Analyse de la variance de la concentration des flavonoïdes totaux (CET) exprimée en (mg ER/g EL).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	11346,08	17	667,416				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotype)**	6672,609	2	3336,304	3322,515	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organe)**	4070,723	1	4070,723	4053,897	0		
VAR.INTER F1*2	590,698	2	295,349	294,128	0		
VAR.RESIDUELLE 1	12,05	12	1,004			1,002	1,82%

Tableau 19. Analyse de la variance de la concentration des flavonols totaux (TFLT) révélée en (mg ER/g MS).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	5,241	17	0,308				
VAR.FACTEUR1 **(Ecotype)**	0,442	2	0,221	255,595	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organe)**	4,47	1	4,47	5172,306	0		
VAR.INTER F1*2	0,319	2	0,159	184,369	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,01	12	0,001			0,029	5,09%

Tableau 20. Analyse de la variance de la teneur en flavonols totaux (TFLT) évaluée en (mg ER/g LE).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2716,404	17	159,789				
VAR.FACTEUR 1**(Ecotypes)**	445,547	2	222,773	387,314	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	2024,603	1	2024,603	3519,977	0		
VAR.INTER F1*2	239,352	2	119,676	208,069	0		
VAR.RESIDUELLE 1	6,902	12	0,575			0,758	4,56%

Tableau 21. Analyse de la variance de la teneur en caroténoïdes totaux (TCT) révélée en (µg EßC/g MS).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	26,004	17	1,53				
VAR.FACTEUR 1**(Ecotype)**	5,217	2	2,608	2738,704	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organe)**	15,036	1	15,036	15787,09	0		
VAR.INTER F1*2	5,74	2	2,87	3013,279	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,011	12	0,001			0,031	2,60%

Tableau 22. Analyse de la variance de la concentration des caroténoïdes totaux (CCT) révélée en (µg EßC/g EL).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	8164,626	17	480,272				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotypes)**	1648,971	2	824,486	584,761	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	5350,951	1	5350,951	3795,128	0		
VAR.INTER F1*2	1147,784	2	573,892	407,029	0		
VAR.RESIDUELLE 1	16,919	12	1,41			1,187	3,73%

Annexe 3. Potentiel du pouvoir antioxydant des extraits de L'A halimus L.

Tableau 23. Capacité antioxydante totale des extraits éthanoliques des feuilles et tiges *d'A halimus* provenant de trois régions algérienne exprimés en µg EAA /g EL.

CAT (EAA µg/g EL) / **Concentrations des extraits (µg/ml)**	FBis	FMaz	FSig	TBis	TMaz	TSig
0	0	0	0	0	0	0
200	40,27±3,62	13,73±1,40	27,20±0,69	46,13±1,15	69,60±1,39	32,13±2,41
400	56,13±4,75	24,53±1,29	33,47±0,92	69,07±0,41	78,80±1,06	53,33±0,46
600	76,53±0,83	63.07±0,46	54,00±1,44	85,73±1,35	88,13±1,67	58,13±1,62
800	105,73±7,34	85.33±1,22	59,33±0,61	99,60±0,36	94,27±1,62	60,13±0,61
1000	136,27±0,41	91,07±0,83	61,20±2,08	122,67±4,13	147,20±1,06	92,00

Tableau 24. Capacités anti-radicalaires basés sur les essaies d'DPPH, ABTS et BCB des deux parties aériennes d'*A halimus* L. exprimés en pourcentage (%).

Test groups	**Concentration (mg/ml)**	**FBis**	**TBis**	**FMaz**	**TMaz**	**FSig**	**TSig**
DPPH%	20	19.33±0.02	23.04±0.02	11.14±8.37	14.33±3.4	3.42±3.47	13.38±0.04
	40	43.06±0.01	30.46±00	25.80±7.07	25.80±2.1	7.17±2.51	22.71±0.01
	60	54.77±0.00	39.84±0.02	38.37±4.98	38.17±0.4	16.50±3.55	25.52±0.00
	80	68.70±0.01	53.25±0.03	47.43±9.35	52.89±0.5	22.02±6.13	34.27±0.00
	100	78.50±0.01	67.64±0.07	64.49±7.94	64.29±0.2	33.79±3.67	37.27±0.03
ABTS %							
	20	36.36±2.96	17.16±2.07	17.90±2.40	8.48±2.03	27.56±3.15	11.79±2.94
	40	57.59±1.70	27.07±4.81	20.67±00	25.39±3.23	40.22±2.50	14.45±2.01
	60	81.26±8.76	37.77±0.46	26.93±1.91	34.52±1.92	53.57±00	23.42±1.45
	80	94.29±2.22	46.01±4.39	29.89±3.29	39.10±0.53	63.85±2.42	34.91±7.49
	100	96.44±1.67	62.97±0.20	43.18±5.40	45.56±3.10	73.31±3.19	39.84±4.48
BCB %							
	20	14.84±0.50	14.09±0.67	0.22±0.33	21.72±1.2	17.31±0.17	00
	40	36.77±2.08	38.49±0.33	9.68±0.76	26.56±1.00	27.53±0.73	14.52±0.7
	60	46.88±0.60	44.09±1.33	48.60±1.33	32.47±0.3	57.10±1.04	16.77±1.8
	80	55.27±0.60	54.09±1.17	74.09±1.01	35.81±0.5	61.29±1.26	20.43±0.2
	100	86.34±1.71	56.02±0.17	76.99±0.83	45.81±00	88.92±0.44	59.46±0.5

Tableau 25. Comparaison des activités antioxydantes des extraits des feuilles et tiges de l'*A halimus* L. de trois localités Algériennes testé par DPPH, ABTS et BCB exprimé en IC_{50}.

Pouvoirs antioxydants des différents extraits				
Provenance de l'*A. halimus*		**DPPH (ETµg/ml)**	**ABTS (ETµmol/ml)**	**BCB (EBµg/ml)**
Biskra	Feuilles	845,64±10,75^{c}	59,75±0,97^{a}	28,28±1,31^{ab}
	Tiges	497,46±37,53^{a}	56,75±5,36^{a}	17,38±4,17^{a}
Mazagran	Feuilles	553,86±3,00^{ab}	Nd	33,75±21,06^{b}
	Tiges	501,85±45,91^{a}	Nd	nd
Sig	Feuilles	Nd	53,91±2,05^{a}	45,56±1,20^{c}
	Tiges	Nd	Nd	38,85±18,77^{b}
Standard		579,94±0,7^{b}	59,76±2,47^{a}	15,38±2,33^{a}

Les résultats sont représentés en moyenne± SD (n =3). Les valeurs sont représenté en colonne, avec les lettres (a, b, c) représentes les différents groupes résultants du test de NEWMAN-KEULS à un seuil de 0.05%. Activité anti-radicalaire par le teste de DPPH et ABTS est exprimé en CI_{50}, TEAC équivalent, exprimé en µg équivalent trolox (ET)/ml et en µmol(ET)/ml respectivement, BCB pouvoir d'inhibition du blanchiment du ß-carotène (BCB) exprimé en CI_{50} exprimé en µg équivalent BHT (BE)/ml, BHT hydroxytoluéne Butylé. nd : Non définie.

Tableau 26. Analyse de la variance de la capacité anti-radicalaire (DPPH) des extraits et du standard (Trolox) exprimées en IC_{50} et en (µg ET/ml).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	257901,4	14	18421,53				
VAR.FACTEUR 1	248798,9	4	62199,72	68,332	0		
VAR.RESIDUELLE 1	9102,547	10	910,255			30,17	5,06%

Tableau 27. Analyse de la variance de la capacité anti-radicalaire (ABTS) des extraits testés et du standard exprimées en IC_{50} et en micromole équivalent trolox par un millilitre d'extrait (µmole ET/ml)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	168,925	11	15,357				
VAR.FACTEUR 1	70,621	3	23,54	1,916	0,20515		
VAR.RESIDUELLE 1	98,304	8	12,288			3,505	6,09%

Tableau 28. Analyse de la variance de la capacité d'inhibition du blanchiment de ß-caroténe (BCB) des extraits et la molécule de référence (BHT), exprimées en IC_{50} et en microgramme équivalent BHT par un millilitre d'extrait (µg EBT/ml).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	3774,761	17	222,045				
VAR.FACTEUR 1	2131,165	5	426,233	3,11	0,04968		
VAR.RESIDUELLE 1	1643,596	12	136,966			11,703	39,19%

Annexe 3. Activité antifongique des extraits de L'A halimus L.

Tableau 30. Comparaison des moyennes des effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode d'aromatogramme par le teste de Newman-Keuls au seuil de 0,05%.

	Extraits de l'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FBis**	**FMaz**	**FSig**	**TBis**	**TMaz**	**T Sig**
C_0 (0)	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}
C_1 (20)	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}	0^{h}
C_2 (40)	8^{f}	7^{g}	0^{h}	7^{g}	7^{g}	7^{g}
C_3 (60)	8^{f}	$7{,}67\pm0{,}58^{f}$	7^{g}	$7{,}67\pm0{,}58^{f}$	9^{e}	7^{g}
C_4 (80)	9^{e}	$10{,}67\pm0{,}58^{c}$	7^{g}	8^{f}	10^{d}	8^{f}
C_5 (100)	10^{d}	12^{a}	8^{f}	9^{e}	11^{b}	9^{e}

Tableau 31. Effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode d'aromatogramme par le teste de Newman-Keuls au seuil de 0,05%.

	Extraits de l'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FBis**	**FMaz**	**FSig**	**TBis**	**TMaz**	**T Sig**
C_0 (0)	0	0	0	0	0	0
C_1 (20)	0	7^{e}	7^{e}	0	0	0
C_2 (40)	7^{e}	7^{e}	8^{d}	7^{e}	8^{d}	0
C_3 (60)	8^{d}	$8{,}67^{c}$	9^{c}	7,33	10^{b}	7^{e}
C_4 (80)	10^{b}	10^{b}	10^{b}	9^{c}	10^{b}	9^{c}
C_5 (100)	11^{b}	11^{a}	11^{a}	10^{b}	11^{a}	10^{b}

a-b-c-d-e-f: les valeurs de la même colonne avec des lettres différents sont significativement différèrent (p=0)

Tableau 32. Effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode de contact directe (UFC/ml) par le teste de Newman-Keuls au seuil de 0,05%.

	Extraits hydro-éthanoliques d'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FBis**	**FMaz**	**FSig**	**TBis**	**TMaz**	**T Sig**
C_0 (0)	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$
C_1 (20)	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}17^{b}$	$7{,}32^{a}$
C_2 (40)	$6{,}66^{e}$	$7{,}32^{a}$	$7{,}32^{a}$	$6{,}96^{d}$	$7{,}1^{c}$	$7{,}32^{a}$
C_3 (60)	$6{,}22^{g}$	$6{,}96^{d}$	$6{,}58^{f}$	$6{,}59^{f}$	$6{,}96^{d}$	$6{,}58^{f}$
C_4 (80)	$4{,}74^{i}$	$6{,}59^{f}$	$5{,}85^{g}$	$5{,}86^{g}$	$6{,}22^{g}$	$5{,}85^{g}$
C_5 (100)	$3{,}73^{k}$	$6{,}22^{g}$	$5{,}12^{f}$	$4{,}39^{I}$	$5{,}49^{H}$	$4{,}39^{j}$

Tableau 33. Effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode de contact directe par le teste de Newman-Keuls au seuil de 0,05%.

	Extraits de l'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FBis**	**FMaz**	**FSig**	**TBis**	**TMaz**	**T Sig**
C_0 (0)	7,01[a]	7,01 [a]	7,01[a]	7,01[a]	7,01[a]	7,01[a]
C_1 (20)	7,01[a]	7,01 [a]	7,01[a]	7,01[a]	7,01[a]	7,01[a]
C_2 (40)	7,01 [a]	7,01 [a]	7,01[a]	7,01 [a]	7,01[a]	6,3[e]
C_3 (60)	6,86[b]	6,65 [d]	6,65[d]	6,86 [b]	7,01[a]	5,6 [g]
C_4 (80)	6,30[e]	6,3[e]	6,31[e]	6,65 [d]	6,3[e]	4,9 [h]
C_5 (100)	5,6 [g]	5,95[f]	5,6[g]	5,96 [f]	6,3[e]	4,2 [h]

a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k : les valeurs de la même colonne avec des lettres différents sont significativement différèrent (p=0)

Tableau 34. Taux d'inhibitions des extraits d'*A. halimus* de la croissance de *C. albicans* exprimé en pourcentage (%).

	Les extraits hydro-éthanoliques d'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FBis**	**FMaz**	**FSig**	**TSig**	**TBis**	**TMaz**
C_0 (0)	0	0	0	0	0	0
C_1 (20)	0	0	0	0	0	0
C_2 (40)	9,02	0	0	0	4,92	0
C_3 (60)	15,03	4,92	10,11	10,11	9,97	4,92
C_4 (80)	35,11	9,97	20,08	20,08	19,95	15,03
C_5 (100)	49,04	15,03	30,05	40,03	40,03	25

Tableau 35. Taux d'inhibitions des extraits d'*A. halimus* de la croissance de *C. tropicalis* exprimés en pourcentage (%).

	Extraits hydro-éthanoliques d'*A. halimus*					
Concentrations (mg/ml)	**FSig**	**FBis**	**FMaz**	**TSig**	**TBis**	**TMaz**
C_0 (0)	0	0	0	0	0	0
C_1 (20)	0	0	0	0	0	0
C_2 (40)	0	0	0	10,13	0	0
C_3 (60)	5,14	2,00	5,14	20,11	2,00	0
C_4 (80)	9,99	10,13	10,13	30,10	5,14	13,93
C_5 (100)	20,11	20,11	15,12	40,09	14,98	13,93

Tableau 36. Analyse de la variance des effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode d'aromatogramme.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1288,40	89	14,48				
VAR.FACTEUR 1**(Ecotypes)**	70,07	2	35,03	1051	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	2,84	1	2,84	85,32	0		
VAR.FACTEUR 3 **(Concentrations)**	1085,18	4	271,29	8138,83	0		
VAR.INTER F1*2	24,82	2	12,41	372,34	0		
VAR.INTER F1*3	45,16	8	5,64	169,33	0		
VAR.INTER F2*3	16,38	4	4,10	122,84	0		
VAR.INTER F1*2*3	41,96	8	5,24	157,33	0		
VAR.RESIDUELLE 1	2	60	0,03			0,183	2,82%

Tableau 37. Analyse de la variance des effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode d'aromatogramme.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1137,6	89	12,782				
VAR.FACTEUR 1**(Ecotypes)**	34,867	2	17,433	313,798	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	64,178	1	64,178	1155,189	0		
VAR.FACTEUR 3 **(Concentrations)**	770,6	4	192,65	3467,658	0		
VAR.INTER F1*2	51,489	2	25,744	463,392	0		
VAR.INTER F1*3	70,466	8	8,808	158,548	0		
VAR.INTER F2*3	61,711	4	15,428	277,696	0		
VAR.INTER F1*2*3	80,956	8	10,119	182,148	0		
VAR.RESIDUELLE 1	3,333	60	0,056			0,236	3,19%

Tableau 38. Analyse de la variance des effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. albicans* par la méthode de contact direct.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	104,923	107	0,981				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotypes**)	7,145	2	3,573	766251,8	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	0,005	1	0,005	1114,364	0		
VAR.FACTEUR 3 **(Concentrations)**	66,245	5	13,249	2841666	0		
VAR.INTER F1*2	2,169	2	1,084	232599,3	0		
VAR.INTER F1*3	12,256	10	1,226	262878,4	0		
VAR.INTER F2*3	6,54	5	1,308	280553,3	0		
VAR.INTER F1*2*3	10,561	10	1,056	226519,9	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0	72	0			0,002	3,31E-04

Tableau 39. Analyse de la variance des effets des extraits d'*A. halimus* sur la croissance de *C. tropicalis* par la méthode de contact direct.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	48,194	107	0,45				
VAR.FACTEUR 1 **(Ecotypes)**	5,658	2	2,829	340122,9	0		
VAR.FACTEUR 2 **(Organes)**	0,825	1	0,825	99190,32	0		
VAR.FACTEUR 3 **(Concentrations)**	29,189	5	5,838	701819,1	0		
VAR.INTER F1*2	4,649	2	2,325	279455,6	0		
VAR.INTER F1*3	4,255	10	0,425	51150,91	0		
VAR.INTER F2*3	0,461	5	0,092	11090,02	0		
VAR.INTER F1*2*3	3,156	10	0,316	37941,25	0		
VAR.RESIDUELLE 1	0,001	72	0			0,003	4,41E-04

ISSN : 0972-5210
ISSN : 2581-6063
(Online)

R.N.I. No. UPENG/2001/5119

Plant Archives

(International Journal of Plant Research)

Dr. R.S. Yadav, Ex. Principal, Ch. Charan Singh P.G. College, Heonra (Saifai), Etawah–(U.P.)-206130
Mob. : 09411274848

An UGC Approved Journal (No. 30969)
e-mail - ramarsy@rediffmail.com, website : www.plantarchives.org **(NAAS Rating : 4.41)**

Ref. No. : *PA3/4719* ***Dated :30.10.2018***

Dear Sir/ Madam,

I thankfully acknowledge the receipt of your manuscript. You are requested to refer the para(s) ticked (✔) below :

✔ **1.** I am pleased to inform you that your manuscript entitled **"Phenolics contents and in-vitro evaluation of the antioxidant effects of the aerial parts of three Algerian *Atriplex halimus* L. ecotypes"** by **Ould Kaddour Asma Souad, Bouzouina Mohamed and Lotmani Brahim** has been accepted for publication. Your paper will appear in **Vol. 19 No.1 April, 2019.**

2. Your paper is being sent to referees for their comments which will be communicated to you as soon as we received any information.

3. Your paper was referred to an expert for suitability of publication. The comments of the expert and paper are enclosed herewith for revision.

4. We are sorry to let you know that our referees have not recommended your paper for publication in ***Plant Archives***.

✔ **5.** **Please recommend our journal for your departmental/institutional library.**

Thanking you and assuring you our best services at all times.

With best regards

Yours truly

(R. S. Yadav)
Chief Editor

Phenolics contents and in-vitro evaluation of the antioxidant effects of the aerial parts of three Algerian *Atriplex halimus* L. ecotypes

OULD KADDOUR Asma Souad [1, 2*], Bouzouina Mohamed[1*] and Lotmani Brahim[1*]

[1]Plant Protection Laboratory, Université abdelhamid IBN Badiss-Mostaganem, route nationale n°11, Kharrouba, 27000 Mostaganem

[1,2]Ahmed ZABANA, University Centre-Relizane, BOURMADIA, BP 48000, W. Relizane.

Corresponding Author: A.S. Ould Kaddour: osouad70@yahoo.fr Tel: +213556435930

* Bouzouina. M: mohamed.bouzouina@univ-mosta.dz

*Lotmani. B: blotmani@yahoo.fr

Abstract

Atriplex halimus L. "Guettaf", halophyte plants, is distributed in different geographical zones in Algeria. In this study, antiradical activities, polyphenols, flavonoïds, flavonols and carotenoïds contents of aerial parts (Leaves and Stems) from three Algerian sites (Mazagran, Biskra and Sig) were determined. Results revealed higher amounts of secondary metabolites and higher antioxidant capacities in leaves extracts unlike stems. Significant variation was found between ecotypes; Mazagran leaves and stems extracts are richer in TPC (279.33±1.17 and 68.11±7.76 mgGAE/g LE) and TFC (98.19±1.51and 64.35±0.41 mgRE/g LE, respectively). Great concentrations of flavonols and carotenoids were exhibited in Mazagran and Sig leaves extracts, respectively (34.87 ±1.32 mgRE/g LE and 73±00 µg βCE/g LE). Like TAC, DDPH, ABTS and BCB tests demonstrated the higher antiradical capacity of Biskra stems extracts (IC_{50} = 497.46±37.53 TEµg/mL - 56.75±5.36 TEµmol/mL and 17.38±4.17 BEµg/mL, respectively). Biskra *Atriplex halimus* can be used as source of natural antioxidant, in different fields such as animals' food and medicinal applications.

Keywords: *Atriplex halimus* L. – Ecotypes - Bioactive compounds - Antioxidant activities**.**