

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Saad Dahleb-Blida1

Faculté de technologie

Département de Génie des procédés Pour obtenir le diplôme de

MASTER EN PHARMACIE INDUSTRIELLE

Présentée Par :

Mme Slamani Mounira et Mme Gharbi Dounia.

Extraction et évaluation de l'activité hépatoprotectrice des molécules antioxydantes de *Atriplex halimus* en vue de la formulation d'une émulsion buvable pour leur délivrance

Soutenue le **Lundi 03 juillet**

Promotrice : **Mme Hadj ziane. A**

Professeure, Université de Blida 1.

Co-promoteur: **Mr Nait bachir. Y**

Doctorant, Université de Blida 1.

Année universitaire : 2017-2018

Résumé

Atriplex halimus est une des sources végétales les plus riches en substances phénoliques antioxydantes et notamment en polyphénols, et aussi la matière minérale essentiellement le chlore et le potassium. Nous nous sommes intéressés dans ce présent travail à optimiser les paramètres d'extraction des molécules bioactives de *Atriplex halimus* et évaluer son activité hépato protectrice, en vue de la formulation d'une émulsion buvable par leur vectorisation.

Les résultats obtenus montrent que le meilleur solvant a optimisé est le mélange éthanol-eau, les réponses de cette modélisation mathématique donnent un meilleur rendement de l'extraction par macération des molécules bioactives de *Atriplex halimus* qui est de 32.54% de l'éthanol-eau à 40%-80°C, le meilleur pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante en utilisant la méthode de β carotène de 58.55 % et un meilleur taux de matière minérale de 58.55 EgAG/gE de l'éthanol-eau à 100%-80°C, et le meilleur pourcentage de polyphénols totaux qui est de 48.74% de l'éthanol-eau à 40%-20°C.

Les résultats de l'extraction par Soxhlet nous donnent un rendement de 39%, un taux de matière minérale de l'extrait obtenu est de 7.91%, un taux de polyphénols totaux de 172.41 EgAG/g d'extrait et une activité antioxydante de 59.73%. L'analyse HPLC de l'extrait éthanolique nous a permis d'identifier 11 composés appartenant à 3 familles différentes, les acides phénoliques, les coumarines et les flavonoïdes. Les résultats de l'analyse des cendres de l'extrait obtenu par spectrométrie de fluorescence X nous permis à identifier et quantifier deux composés majoritaires qui sont le chlore (65.590%) et le potassium (24.264%).

L'activité hépato protectrice in vivo sur les souris blanches (*mus musculus*), en induisant l'hépatotoxicité par injection péritonéale du CCl₄, montre que l'administration préventive des extraits de *Atriplex halimus* au bout de six jours, donne des valeurs des analyses biochimiques de sang (ALT,AST), et de foie (MDA,Tglu) presque normales.

Les résultats de cette étude révèlent aussi que les molécules bioactives d'*Atriplex halimus* présentent une action protectrice significative dans la réduction de la lésion hépatocellulaire induite par CCl₄. En se basant sur les caractéristiques physicochimiques et rhéologiques des 9 émulsions, toutes ces préparations sont stables.

Mots clés : *Atriplex halimus*, soxhlet, l'activité hépato protectrice in vivo, β carotène, polyphénols totaux, HPLC, fluorescence X, ALT, AST, MDA, Tglu, émulsions.

Abstract

The *Atriplex halimus* is one of the vegetable sources richest in antioxidant phenolic substances and especially polyphenols, and also mineral matter mainly chlorine and potassium. In this work, we were interested in optimizing the extraction parameters of the bioactive molecules of the *Atriplex halimus* and evaluating its protective hepatic activity, with a view to the formulation of a drinkable emulsion by their vectorization.

The results obtained show that the best solvent optimized is the ethanol-water mixture, the responses of this mathematical modeling give a better yield of the extraction by maceration of the bioactive molecules of *Atriplex halimus* which is 32.54% of ethanol Water at 40% -80 ° C, the best percentage inhibition of the antioxidant activity using the β -carotene method of 58.55% and a better mineral content of 58.55 EgAG / gE of ethanol-water at 100% -80 ° C, and the best percentage of total polyphenols which is 48.74% ethanol-water at 40% -20 ° C.

The results of extraction by soxhlet gave a yield of 39%, a mineral content of the extract obtained was 7.91%, a total polyphenol content of 172.41 EgAG / g of extract and an antioxidant activity of 59.73 %. HPLC analysis of the ethanol extract allowed us to identify 11 compounds belonging to 3 different families, phenolic acids, coumarins and flavonoids. The results of the ash analysis of the extract obtained by X-ray fluorescence spectrometry allowed us to identify and quantify two major compounds, chlorine (65.590%) and potassium (24.264%).

In vivo protective hepatic activity in white muscles (*mus musculus*), by inducing hepatotoxicity by peritoneal injection of CCl₄, shows that the preventive administration of the *Atriplex halimus* extracts after six days gives values of Biochemical analyzes of blood (ALT, AST), and liver (MDA, Tglu) almost normal.

The results of this study also reveal that the bioactive molecules of *Atriplex halimus* exhibit a significant protective action in the reduction of the hepatocellular lesion induced by CCl₄. Based on the physico-chemical and rheological characteristics of the emulsions, all these preparations are stable.

Key words: *Atriplex halimus*, soxhlet, in vivo hepatoprotective activity, β carotene, total polyphenols, HPLC, X fluorescence, ALT, AST, MDA, Tglu, emulsions.

ملخص

الزرغل الملحي هي واحدة من أغنى مصادر المواد النباتية بالفينول المضادة للأكسدة بما في ذلك البوليفينول، وكذلك المواد غير العضوية أساسا الكلور والبوتاسيوم. كنا مهتمين بالعمل الحالي لتحسين المعلمات استخراج الجزيئات النشطة وتقييم نشاطها الكبد واقية في صياغة مستحلب الشفوي كمية موجهة لهم. *A. halimus* بيولوجيا من هي *A. halimus* إجابات لهذا النموذج الرياضي لاستخراج أكثر كفاءة من خلال النقع من الجزيئات النشطة بيولوجيا من β ، وأفضل نسبة تثبيط نشاط مضادات الأكسدة باستخدام أسلوب C ° من الإيثانول في الماء بنسبة 40% - 80% 32.54% de C ° المياه الإيثانول 80- EGAG / GE to 100 58.55% وأفضل المعدنية محتوى المادة من 58.55 ، وأفضل نسبة من إجمالي البوليفينول، وهو 48.74% من المياه الإيثانول بنسبة 40% - 20 درجة مئوية. نتائج استخراج سوكليت تعطينا عائدا بنسبة 39%، ومحتوى المواد المعدنية للاستخراج التي تم الحصول عليها هو 7.91%، وهو معدل غرام من استخراج والنشاط المضادة للأكسدة 59.73%. يسمح تحليل EGAG / من إجمالي البوليفينول من 172.41 لاستخراج الإيثانول لنا التعرف على 11 مركبات تابعة 3 عائلات مختلفة، والأحماض الفينولية، الكومارين HPLC الطيف لنا لتحديد وقياس مركبين الرئيسية التي XRF والفلافونيدات. سمحت نتائج تحليل رماد استخراج حصلت عليها الكلور (65590%) والبوتاسيوم (24264%). النشاط واقية الكبد في الجسم الحي على فأر أبيض (المصحف العضلة)، يدل على أن الإدارة الوقائية من مقتطفات من القطف CCl₄ الأمر الذي أدى تسمم الكبد عن طريق الحقن البريتوني من شبه (MDA Tglu) ، والكبد (ALT ،AST) بعد ستة أيام، ويعطي تحليلات القيم الكيمياء الحيوية في الدم *halimus* تظهر تأثير وقائي كبير في الحد من *A. halimus* طبيعي. وتشير نتائج هذه الدراسة أيضا أن الجزيئات النشطة بيولوجيا بناءا إصابة الخلايا الكبدية الناجمة

كلمات البحث

، ALT ،XRF ،HPLC زرغل ملحي، سوكليت والنشاط واقية الكبد في الجسم الحي، كاروتين بيتا، مجموع البوليفينول، ، المستحلبات MDA ،Tglu ،AST

Remerciements

Ce travail scientifique est le fruit d'une collaboration entre l'équipe de pharmacie industrielle du Laboratoire de génie chimique de l'université Saad Dahleb-Blida 1 sous la direction du professeur Hadj Ziane, l'ISTA de Blida et le centre de recherche de l'aviation ERMA-AERO sous la direction de Monsieur Mjahed.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Mme **Hadj Ziane.A** qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, pour les conseils qu'elle nous a prodigués et la confiance qu'elle nous a témoignée.

Nos chaleureux remerciements vont à notre copromoteur Mr **Nait Bachir .Y** qui a été à nos côtés pour nous guider dans les activités de recherche. Il est sans aucun doute l'auteur des meilleurs moments qu'on a passés ensemble au laboratoire. Nous sommes profondément reconnaissantes pour sa confiance, sa patience, sa sympathie et son dévouement. Nous espérons pouvoir imiter sa passion pour le travail ainsi que pour la construction d'une ambiance sereine qui soulage le stress de chaque jour.

Nous remercions aussi Mme **Chemat. F** d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance et Mme **Boutemak. K** et Mme **Laribi.H** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tiendrons à remercier profondément Monsieur Allal, le directeur de l'ECSSM, et le chef de département de ravitaillement sanitaire Monsieur Bouriah pour leurs aides et leur soutien durant cette épreuve.

Nous remercions également Mme **Medjkan. M** de l'université de Hassiba benbouali-Chlef de nous avoir aidés à réaliser les activités biologiques.

Nous sommes profondément reconnaissantes à **Nadia** et **Chahrazed** responsables du laboratoire de chimie à l'ISTA pour leurs aides et leur soutien.

Nous tiendrons à remercier aussi Monsieur **Mjahed** et Madame **Rabia** du laboratoire de chimie à l'URD de l'ERMA-AERO de nous avoir aidés à réaliser les analyses de l'HPLC et la

fluorescence X, ainsi Mme **Rbiha Mounia** du laboratoire d'analyse fonctionnelle des procédés chimiques de l'université Saad Dahleb-Blida 1 de nous avoir aidé à réaliser les analyses de rhéologie.

Pour ne pas oublier nous remercions beaucoup **Mlle Zahia** de laboratoire de chimie organique pour son aide.

Que nos amis(es) et collègues, trouvent ici l'expression de notre reconnaissance et nos remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce travail a

Mes chers parents qui grâce à eux j'ai réussi dans mes études et

Ma vie professionnelle

Mon cher mari qui m'a beaucoup aidé dans mes études

Ma fille qui est mon amour

*Ma sœur Amel et mes frères Attef, Samir et Djamel qui j'ai passé avec eux
des moments agréables.*

*Mes amis Sameh, Fouzia, Farida que je l'estime beaucoup et tous mes
collègues*

Madame Gharbi Dounia

Je dédie ce mémoire

*A mes chers parents qui ont tout fait pour moi, pour tous leurs sacrifices,
leur amour, leur tendresse.*

A mon mari qui a été à mes côtés durant toutes ces années.

A mes enfants, ma raison de vivre Hocine, Marwa et mon poussin Nadhir.

*A tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagné et soutenu durant cette
épreuve*

Madame Slamani Mounira

Table des matières

Remerciements	-
Dédicaces	-
Table des matières	-
Liste des tableaux	-
Liste des figures	-
Liste des abréviations	-
Liste des travaux scientifiques	-
Introduction générale	1
Chapitre I : État de l'art sur l'Atriplexhalimus	3
I .1. Botanique et description	3
I .2. Choix de la plante	4
I .3. La répartition géographique	4
I .4. Phytochimie de l'AtriplexHalimus	5
I .5. Les activités pharmacologiques	6
Chapitre II : Stress oxydatif et molécules antioxydantes	7
II .1. Le stress oxydatif	7
II .2. Les composés phénoliques	7
II .2.1. Les flavonoïdes	8
II .2.2. Les tannins	9
II .2.2.1. Tannins hydrolysables	9
II .2.2.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols	10
II .2.3. Phénols simples et les acides phénoliques	10
II .2.3.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque	10
II .2.3.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique	10
II .2.3.3. Phénols simples	11
II .3. Autres composés	11
II .3.1. Les hétérosides	11
II .3.1.1. Saponosides	11
II .3.1.2. Cardiotoniques	11
II .3.1.3. Anthracéniques	12
II .3.2. Les alcaloïdes	12
II .3.3. Les huiles essentielles	12
II .4. Évaluation de l'activité antioxydante in vitro	12
II .4.1. Piégeage du radical DPPH	12
II .4.2. Blanchiment du β -Carotène	13
Chapitre III : L'extraction solide-liquide des molécules bioactives	14
III.1. Définition	14
III.1. 1 Principe et mécanisme de l'extraction solide liquide	14
III.2. Caractéristiques générales d'extraction solide-liquide	15
III.2.1. Facteurs influençant le transfert	15
III.2.1.1. Influence du solide	15
III.2.1.2. Influence du soluté	16
III.2.1.3. Influence du solvant	16

III.2.1.4. Influence de la température d'extraction	18
III.2.1.5. Temps de contact liquide-solide ou temps d'extraction	18
III.2.1.6. Rapport solvant-solide	18
III.2.1.7. Influence de l'humidité	18
III.2.1.8. Influence de l'agitation	19
III.2.2. Performances de l'extraction solide-liquide	19
III.2.2.1. Productivité	19
III.2.2.2. Rendement	19
III.2.2.3. Concentration de l'extrait	20
III.3 Les procédés d'extraction conventionnels des molécules bioactives	20
III.3.1. Macération	20
III.3.2. Extraction par soxhlet	21
Chapitre IV : Extraction et caractérisation des molécules bioactives de l'Atriplexhalimus	24
IV.1. Introduction	24
IV.2. Matériels et méthodes	24
VI.2.1. Matériels	24
VI.2.1.1. Matériel végétal	24
VI.2.1.2. Produits chimiques	25
VI.2.2. Effet des solvants sur l'extraction des molécules bioactives de l'Atriplexhalimus	25
IV.2.3. Étude du mélange éthanol-eau en utilisant un plan d'expérience	26
IV.2.4. Extraction par Soxhlet	27
IV.2.5. Détermination du rendement	28
IV.2.6. Dosage des polyphénols totaux	28
IV.2.7. L'activité antioxydante in vitro (blanchiment du β -carotène)	29
IV.2.8. Taux de matière minérale	29
IV.2.9. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC/UV-DAD)	30
IV.2.10. Spectrométrie de Fluorescence X	31
IV.3. Résultats et discussions	31
IV.3.1. L'effet de différents solvants organiques sur l'extraction des molécules bioactives de l'Atriplexhalimus	31
IV.3.2. Étude du mélange éthanol-eau	34
IV.3.2.1. Effets des facteurs et leurs interactions sur les réponses	34
IV.3.2.2. Modélisation mathématique et prédiction des réponses	35
IV.3.2.3. Discussion des réponses obtenues	38
IV.3.3. Extraction par Soxhlet	40
IV.3.4. Analyse par chromatographie en phase liquide haute performance	40
IV.3.5. Analyse par spectroscopie de fluorescence X	41
IV.4. Conclusion	41
Chapitre V : Évaluation de l'activité hépatoprotectrice in-vivo de l'Atriplexhalimus	42
V.1. Introduction	42
V.2. Matériels et méthodes	42
V.2.1. Matériels	42
V.2.1.1. Réactifs chimiques	42
V.2.1.2. Matériel animal	42
V.2.2. Design expérimental	42
V.2.3. Sacrifice et prélèvements	44
V.2.4. Étude biochimique des prélèvements sanguins	45

V.2.5. Étude biochimique des prélèvements hépatiques	45
V.2.6. Étude anatomopathologique et histologique	45
V.3. Résultats et discussions	46
V.3.1. Effet de <i>Atriplex halimus</i> sur les paramètres biochimiques lors de l'hépatotoxicité aigue induite au CCl4	46
V.3.1.1. Effet de <i>Atriplex halimus</i> sur la biochimie sanguine (ALT et AST	46
V.3.1.2. Effet de <i>Atriplex halimus</i> sur la biochimie du foie (MDA et Tglu	47
V.3.1.3. Discussion	47
V.3.2. Effet de <i>Atriplex halimus</i> sur les caractéristiques anatomique et histologique du foie lors de l'hépatotoxicité aigue induite au CCl4	48
V.3.2.1. Étude macroscopique	48
V.3.2.2. Étude microscopique	48
V.3.2.3. Discussion	50
V.4. Conclusion	50
Chapitre VI : Formulation d'une émulsion buvable pour la délivrance de l'extrait de l'A. halimus	51
VI.1. Introduction	51
VI.2. Matériel et méthodes	51
VI.2.1. Matériel	51
VI.2.2. Formulation des émulsions	51
VI.2.3. Caractérisation des émulsions	53
VI.2.3.1. La microscopie optique	53
VI.2.3.2. Granulométrie laser	53
VI.2.3.3. Potentiel zêta	53
VI.2.3.4 Rhéologie	53
VI.2.4. Étude de stabilité	54
VI.2.4.1. Stabilité accélérée	54
VI.2.4.2. Stabilité au stockage	54
VI.2.5. Design expérimental	54
VI.3. Résultats et discussion	55
VI.3.1 Formulation et caractérisation des émulsions	55
VI.3.2 Étude de stabilité des émulsions	58
VI. 3.3. Effets des facteurs et leur interaction sur les indices de crémages	60
VI. 3.4. Modélisation mathématique et prédiction des indices de crémages	61
VI.3.5. Discussion des mécanismes de stabilisation des doubles émulsions préparées	64
VI.4. Conclusion	65
Conclusion générale	66
Bibliographie	-
Annexe I	-
Annexe II	-

Liste des figures

Figure	Page
Figure I.1 : Photographie de <i>l'Atriplex halimus</i> à l'état naturel.	4
Figure II.1 : Structure du 2-phényle chromane (gauche) et structure générale des flavonoïdes (droite).	9
Figure II.2 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).	10
Figure II.3 : Les structures chimiques de la forme oxydée et réduite du DPPH.	13
Figure II.4 : Formule chimique du β -carotène.	13
Figure III.1. Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.	21
Figure IV.1 : Photographie de la partie aérienne de <i>l'Atriplex halimus</i> à l'état sauvage (gauche) et après séchage (droite).	24
Figure IV.2: Photographie de l'installation d'extraction par Soxhlet (gauche), photographie de l'évaporateur rotatif Heidolph (droite).	28
Figure IV.3 : Photographie de l'appareil HPLC utilisé (gauche) et photographie du spectrophotomètre de fluorescence X utilisé (droite).	31
Figure IV.4 : Histogrammes représentant les rendements pour les différents solvants.	33
Figure IV.5 : Histogrammes représentant les pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les différents extraits obtenus.	33
Figure IV.6 : Effet des facteurs et leurs interactions sur les réponses.	35
Figure IV.7 : Les surfaces de réponses permettant la prédiction des réponses, le rendement (A), l'activité antioxydante (B), le taux de matière minérale (C) et le taux de polyphénols totaux (D).	37
Figure IV.8 : Représentation des coefficients de corrélation et de prédiction pour les réponses étudiées.	37
Figure IV.9 : Chromatogramme HPLC/UV-DAD de l'extrait de <i>l'Atriplex halimus</i> .	40
Figure IV.10 : Spectre de fluorescence X de l'extrait de <i>l'Atriplex halimus</i> .	41
Figure V.1 : Photographie montrant la réparation des souris en 3 lots.	44
Figure V.2: Photographie du prélèvement sanguin par la ponction intracardiaque (gauche) et récolte du sang (droite).	44

Figure V.3: Autopsie des souris et prélèvement du foie.	44
Figure V.4 : Les organes prélevés dans du formole (étape de fixation).	46
Figure V.5: Variation des taux d'ALT et d'AST chez les souris des 3 groupes.	46
Figure V.6: Variation des taux d'MDA et de Tglu chez les souris des 3 groupes.	47
Figure V.7: Photographies du foie d'une souris du lot 1 physiologique (gauche), du lot 2 témoin négatif CCl4 (milieu) et du lot 3 traiter avec CCl4 + 200mg/Kg d'extrait (droite).	48
Figure V.8 : Microphotographies montrant les structures histologiques des tissus hépatiques des différents lots, (A) lot physiologique 1, (B) lot 2 témoin négatif traiter par le CCl4 et (C) lot 3 traiter par le CCl4 + 200mg/kg d'extrait, (*) représente des inflammations portales.	49
Figure VI.1 : photographies des équipements utilisés, (A) Agitateur Ultra-turrax, (B) Microscope optique, (C) Granulomètre laser, (D) Zêtamètre et (E) Rhéomètre.	52
Figure VI.2 : Microphotographies des émulsions.	56
Figure VI.3 : Les courbes d'écoulement des émulsions.	57
Figure VI.4 : Photographies des émulsions après formulation à J0 (A) et après 30 jours de stockage à 25°C (B) et à 50°C (C).	59
Figure VI.5 : Évolution des indices de crémages pour les formulations au cours du stockage à 25°C et à 50°C.	60
Figure VI.6 : Effets des facteurs sur les indices de crémage à 25°C et à 50°C.	61
Figure VI.7 : Surfaces des réponses permettant la prédiction des indices de crémages à 25°C.	62
Figure VI.8 : Surfaces des réponses permettant la prédiction des indices de crémages à 50°C.	63
Figure VI.9 : Histogrammes représentant les coefficients de corrélations et de prédictions.	63
Figure VI.10 : Représentation schématique de la structure des systèmes élaborer, montrent les différents mécanismes de stabilisation misent en jeux.	64

Liste des tableaux

Tableau	page
Tableau I.1 : Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d' <i>Atriplex halimus</i> .	5
Tableau IV.1 : Les propriétés physico-chimiques des solvants utilisés.	25
Tableau VI.2 : Matrice des expériences du plan factoriel utilisé.	26
Tableau IV.3: Les valeurs des rendements et des pourcentages d'inhibition du blanchiment du β carotène pour les extraits obtenus avec différents solvants.	32
Tableau IV.4: Matrice des réponses du plan d'expérience utilisé.	34
Tableau IV.5 : les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé.	38
Tableau V.1: Suivi quotidien des animaux au cours de l'évaluation de l'activité hépatoprotectrice.	43
Tableau VI.1: Optimisation des paramètres d'une émulsion de l'extrait de l' <i>Atriplex Halimus</i> .	55
Tableau VI.2 : Les caractéristiques physico chimiques et rhéologiques des émulsions.	58
Tableau VI.3 : les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé de formulation.	62

Liste des abréviations

AA:activité antioxydante.

ADN: acide désoxiribonucléique.

ALT: alanine aminotransfêrase.

AST : aspartate aminotransférase.

BHA :butylhydroxyanisole.

Ca : Calcium.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

HPLC:chromatographie en phase liquide haute performance.

K: Potassium.

MDA :malonaldehyde.

Mg: magnésium.

Na : Sodium.

O: phase huileuse.

P: phosphore.

R: rendement.

Tglu:niveau total de glutathion.

TMM: taux de matière minérale.

TPT:taux de polyphénols totaux.

Tr:temps de rétention.

W1/O/W2: double émulsion.

W1/O: émulsion primaire.

W1:phase aqueuse.

Liste des travaux scientifiques

SlamaniMounira, Gharbi Dounia, Nait Bachir Yacine, Hadj-ziane Amel, “Optimisation des paramètres d’extraction des molécules antioxydantes de l’Atriplexhalimus en utilisant la technique des plans d’expériences” 24/04/2017 «**Le 1^{er} Séminaire National sur la chimie des matériaux**» Boumerdes, Algeria. (Displayed communication).

Gharbi Dounia, SlamaniMounira, Nait Bachir Yacine, Hadj-ziane Amel “ Étude de l’effet de différents solvants organiques sur l’extraction des molécules bioactives de l’AtriplexHalimus” 24/04/2017 «**Le 1^{er} Séminaire National sur la chimie des matériaux**» Boumerdes, Algeria. (Displayed communication).

SlamaniMounira, Gharbi Dounia, Nait Bachir Yacine, Hadj-ziane Amel “in-vivo hepatoprotectiveactivity of Atriplexhalimusetanolicextract” 24/04/2017 «**Le 1^{er} Séminaire phytothérapie et santé**» Blida, Algeria. (Displayed communication).

Introduction générale

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur les processus physiologiques de l'organisme humain. On les utilise aussi bien en médecine traditionnelle qu'en phytothérapie moderne, elles présentent en effet des avantages dont les médicaments synthétiques sont souvent dépourvus.

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que la nature pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes comme les rhumes et les toux, ou des maladies plus sérieuses comme la tuberculose et la malaria [1].

Ces plantes médicinales représentent une source très importante d'antioxydants qui appartiennent en général à la famille des polyphénols, des alcaloïdes ou des terpènes. Ils sont largement recherchés pour leurs propriétés thérapeutiques agissent sur les processus inflammatoires, endocrâniens ou encore radicalaires.

Les progrès dans le domaine des antioxydants sont accentués d'où le nombre de plantes médicinales disponibles commercialement est de l'ordre de 1800 espèces aux Etats-Unis [2]. Entre 1940 et 2002, 40 % des médicaments anticancéreux étaient des produits naturels et leurs dérivés, par contre seulement 8 % ont été synthétiques et même imités de ces produits [3].

Dans cette optique nous avons choisi l'*Atriplex halimus*, qui est une plante médicinale largement utilisée dans la phytothérapie traditionnelle pour traiter plusieurs maladies tel que le diabète, les kystes et les lithiases [4-6]. Notre présent travail est basé sur l'extraction et l'évaluation des activités biologiques des molécules bioactives de l'*Atriplex halimus*, en vue de la formulation d'une émulsion buvable par leur vectorisation.

Dans la synthèse bibliographique qui comportera trois chapitres, nous allons commencer par une étude botanique descriptive de l'*Atriplex halimus* et la mise au point de l'état de l'art sur les travaux antérieurs réalisés sur cette plante, suivie d'une étude théorique sur le stress oxydatif qui est principalement traité en utilisant les antioxydants et enfin, les différents procédés utilisés pour l'extraction de ces antioxydants à partir des matrices végétales.

L'étude expérimentale comportera trois parties, la première partie est l'étude et l'optimisation des procédés d'extraction des molécules bioactives à partir de l'*Atriplex halimus* et la détermination de la composition chimique de ces dernières par HPLC/UV-DAD pour les composés organiques et Fluorescence X pour les composés minérales. La deuxième partie est l'évaluation de l'activité hépato protectrice des molécules extraites in-vivo sur des souris blanches en utilisant le tétrachlorure de carbone comme agent hépatotoxique. La dernière partie est la conception d'une forme pharmaceutique (une émulsion buvable de type double émulsion W1/O/W2) pour la délivrance simultanée des molécules bioactives hydrophiles et lipophiles extraites à partir de l'*Atriplex halimus*.

Chapitre I :

État de l'art sur l'Atriplexhalimus

Les plantes représentent la source majeure des traitements traditionnels dans le monde entier. Elles sont caractérisées par leurs effets thérapeutiques importants et leurs effets secondaires très rares. L'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Dans les pays en voie de développement, l'utilisation courante de la médecine traditionnelle est accessible et abordable, particulièrement pour les patients les plus pauvres du monde vu le coût élevé de certains médicaments ainsi que leur indisponibilité sur le marché [7].

L'*Atriplex halimus* est l'une de ces nombreuses plantes utilisées dans la phytothérapie traditionnelle. Lors de ce chapitre nous allons présenter l'*Atriplex halimus* et mettre le point sur les différentes études antérieures réalisées sur cette plante.

I.1. Botanique et description

L'*Atriplex halimus* (noms usuels : guettaf, arroche, pourpier de mer) est un arbuste de 1 à 3 m de haut, très rameux, formant des touffes pouvant atteindre 1 à 3 m de diamètre [8]. Les feuilles sont alternes, brièvement mais nettement pétiolées, plus ou moins charnues, luisantes, couvertes de poils vésiculeux blanchâtres (trichomes), ovales, entièrement ou légèrement sinuées, de 0,5 à 1 cm de large sur 2 à 4 cm de long. Les plantes sont monoïques et portent des inflorescences en panicules d'épis, terminales, avec des fleurs mâles au sommet et des fleurs femelles à la base. La floraison -fructification se déroule de mai à décembre. Selon [9], il existerait deux types d'architecture florale de base, l'une est constituée de fleurs mâles pentamères et l'autre de fleurs femelles munies d'un unique carpelle inséré entre deux bractées opposées.

La position systématique de la plante étudiée est donnée ci-dessous [10,11].

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Endicots.

Sous classe : Préastéridées.

Ordre : Caryophyllales.

Familles : Amaranthacées (ancienne appellation : la famille des Chénopodiacées).

Genre Espèce : *Atriplex halimus* L.

Noms vernaculaires : Pourpier de mer, Aramass [10], Gtaf en Algérie [12] et Chenane au Maroc.



Figure I.1 : Photographie de l'*Atriplex halimus* à l'état naturel.

I.2. Choix de la plante

Le choix de la plante est basé sur une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle.

I.3. La répartition géographique

Le genre *Atriplex* (famille des Chénopodiacées) compte environ 420 espèces réparties dans les zones tempérées, méditerranéennes et subtropicales, entre 20° et 50° de latitude Nord et Sud [13-16].

L'*Atriplex halimus* est la plante la plus représentée sur le pourtour méditerranéen. L'espèce est spontanée à l'intérieur d'une aire relativement vaste englobant les pays du pourtour méditerranéen et du Moyen-Orient, depuis les Canaries jusqu'à l'Iran (Algérie, Maroc, Libye, Tunisie, Syrie, Jordanie, Égypte, Arabie Saoudite, Palestine, France, Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Albanie, Malte, Chypre et Israël). Vers le sud, l'espèce atteint le massif d'Ahaggar. En Algérie, l'*Atriplex halimus* est spontanée dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides.

Cette espèce est présente aussi en France, sur les côtes françaises (méditerranéennes et océaniques, jusqu'à la Manche) ; elle est utilisée spécialement comme haie.

I.4. Phytochimie de l'*Atriplex halimus*

L'*Atriplex halimus* est un arbuste réputé pour la valeur nutritive et énergétique de ses feuilles tendres, non seulement pour le bétail, mais aussi comme aliment pour les nomades et la population locale steppique. En effet, au printemps, dans plusieurs régions en Algérie (Djelfa) et Tunisie (Gabès), les jeunes pousses de Guettaf sont consommées par l'homme, en le préparant comme des épinards. Bien que l'âcreté provoquée par une élimination insuffisante des saponines pendant la cuisson ne rende pas cet aliment très savoureux, sa consommation reste très acceptable par la population locale.

L'*Atriplex halimus* pourrait donc fournir un aliment de valeur pour les animaux comme pour l'homme lorsque les conditions naturelles sont particulièrement sévères [17].

L'*Atriplex halimus* est riche en fibres alimentaires (cellulose), protéines, vitamines (B et C) et sels minéraux (sodium, calcium, potassium, magnésium, phosphore) (tableau 1). Par son contenu riche en fibres, il facilite la digestion, augmente la réplétion gastrique et hydrate le contenu du bol fécal.

Tableau I.1 : Teneur en matière sèche et composition chimique des feuilles vertes d'*Atriplex halimus* [18].

MS (%)	MAT* (%MS)	CB* (%MS)	Na (%MS)	Ca (%MS)	K (%MS)	P (%MS)	Mg (%MS)
34,2	15,1	15,4	4,41	1,77	2,59	0,21	0,32

* MS : matière sèche ; MAT : matière azotée totale, CB : cellulose brute

L'étude chromatographique de l'extrait des feuilles d'*Atriplex halimus* a montré la présence de flavonoïdes. Ces composés ont des fonctions biologiques importantes chez la plante ; ils participent à la coloration des fleurs attirant ainsi les insectes pollinisateurs,

possèdent des propriétés fongicides et protègent la plante contre l'attaque des parasites [19].

La chromatographie des alcaloïdes a montré la présence de berbérine et de pipérine chez l'*Atriplex halimus*. La berbérine est un composé connu par son activité antimicrobienne et anti-inflammatoire. L'*Atriplex* est également recommandé pour traiter la malaria [20]. La pipérine et ses dérivés sont des drogues anticonvulsantes et anti-épileptiques efficaces [21].

I .5. Les activités pharmacologiques

Cette espèce dispose en outre de nombreux autres atouts pour la santé humaine. L'*Atriplex halimus* est classée parmi les plantes les plus utilisées par la population steppique pour soigner l'hyperglycémie. Effectivement, [22] ont constaté un effet hypoglycémiant très net chez des rats (rendus diabétiques par l'alloxane) quand ils sont nourris avec un extrait aqueux de feuilles vertes d'*Atriplex halimus*. Outre l'élévation progressive du taux d'hyperglycémie, chez ces rats le développement du diabète s'accompagne de l'apparition de cataracte, de glycosurie et d'obésité. Mais l'administration par voie orale de l'extrait alcoolique de la poudre végétale d'*Atriplex halimus* réduit leur hyperglycémie. Le principe actif est de nature minérale : le chrome tissulaire de cette plante régulerait la glycémie en activant l'effet de l'insuline [22].

Grâce à leurs propriétés antioxydantes, certains flavonoïdes ont un effet protecteur des tissus du foie contre le cancer [20].

D'autres applications thérapeutiques sont possibles. On utilise aussi l'*Atriplex halimus* pour soigner les inflammations des voies urinaires (cystites) et les lithiases urinaires [20,23]. Draineur cutané et rénal, diurétique et dépuratif, il accompagne tout régime qui nécessite un drainage des tissus et la désincrustation des déchets et toxines [23].

Chapitre II :

***Stress oxydatif et molécules
antioxydantes***

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [24].

II .1. Le stress oxydatif

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » [25]. Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN [26,27]. Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies [28]. Parmi les, nous citons, les maladies d'Alzheimer [29,30], de Parkinson [31], et de méningo-céphalites [32], les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque [33], les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau [34] et le cancer [32].

II .2. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent un groupe important des métabolites secondaires, très largement répandus dans le règne végétal. Ils sont reconnus pour leurs multiples propriétés biologiques anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antifongiques anticancéreuses, incluant l'activité antioxydante .Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule car ils possèdent des structures chimiques idéales. L'activité antioxydante des polyphénols est plus puissante que celle des tocophérols et de l'acide ascorbique [35,36]. Les polyphénols regroupent les principales classes suivants les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins condensés, les stilbènes et les coumarines [37-39].

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en

polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste [40].

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques [41] et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre [42].

Des travaux plus anciens [43,44] ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne [45]. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des Cistus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée [46], les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs. A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées. Parmi les composés phénoliques on distingue trois groupes essentiels.

II .2.1. Les flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante [47]. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques [48], dans la

régulation de gène et dans le métabolisme de croissance [49]. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus [50] et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane [51].

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo [51-53].

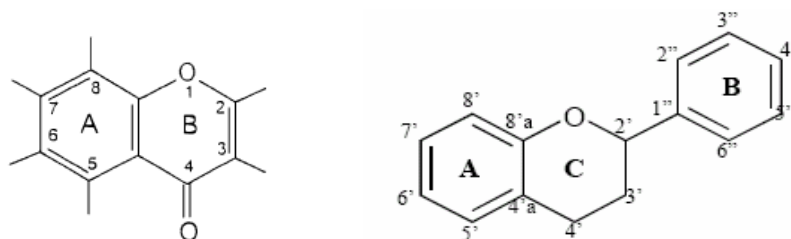


Figure II.1 : Structure du 2-phényle chromane (gauche) et structure générale des flavonoïdes (droite).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ;flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ;isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes [54,55].

II .2.2. Les tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [56,57]. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [58]. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

II .2.2.1. Tannins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le

cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins [57,59].

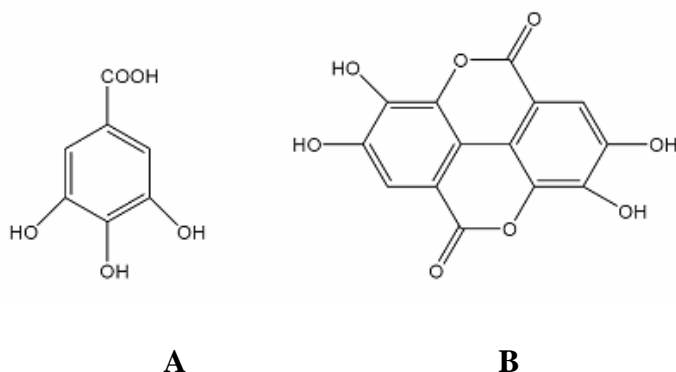


Figure II.2 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

II .2.2.2.Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères [61].

II .2.3. Phénols simples et les acides phénoliques :

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

II .2.3.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque :

Les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique [59].

II .2.3.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique :

La plupart des acides phénols en C6-C3 (acides coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides coumarique, férulique) sont

peu fréquents [59]. Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation [60].

II .2.3.3. Phénols simples :

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes [57].

II .3. Autres composés

II .3.1. Les hétérosides

C'est une famille de composés issus de la condensation d'un ose avec un composé non-glucidique appelé la génine ou encore la fraction aglycone. L'origine biosynthétique de ces génines est très hétérogène (composés phénoliques, certains monoterpènes, triterpènes, alcaloïdes terpéniques, composés soufrés...). On peut citer 3 groupes importants d'hétérosides [60].

II .3.1.1. Saponosides

Les saponosides sont des substances dont la particularité est de mousser avec l'eau. Ces substances, légèrement caustiques et irritantes, probablement toxiques, rendent les plantes qui en contiennent tout fait immangeables. Plusieurs drogues saponosides sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapies [57].

II.3.1.2. Cardiotoniques

Les glycosides cardiotoniques constituent un groupe bien individualisé et d'une grande homogénéité tant structurale que pharmacologique. Ces molécules naturelles d'origine végétale demeurent des médicaments intéressants pour le traitement de l'insuffisance cardiaque [59].

II.3.1.3. Anthracéniques

Ces substances sont des puissants laxatifs et purgatifs qui provoquent chez les animaux qui les consomment des troubles digestifs plus ou moins importants. Les solanacées (renouées, bourdaines) contiennent des hétérosides anthracéniques [61].

II.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques qui précipitent avec des réactifs iodométalliques (réactif de Dragendorff) et qui sont biologiquement actifs. Leurs actions biologiques les placent également au cœur de phénomènes d'interactions de défense face aux pressions biotiques.

Les alcaloïdes sont extraits de plantes qui appartiennent principalement à quatre familles botaniques : les papavéracées, les papilionacées, les renonculacées et les solanacées [61].

II.3.3. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des essences qui n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles (terpnoïdes) sont repartis dans un nombre limité de famille, par exemple les myrtacées, les rutacées, les lamiacées, les astéracées, les poacées, etc. ces essences sont très volatiles, non miscibles dans l'eau et souvent parfumées [61].

II.4. Évaluation de l'activité antioxydante in vitro

II.4.1. Piégeage du radical DPPH

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non-radical) en acceptant un atome d'hydrogène [61]. Les structures chimiques de la forme oxydée et réduite du DPPH sont données dans la figure II.3.

Chapitre III :

***L'extraction solide-liquide des
molécules bioactives***

Historiquement, l'extraction solide-liquide appelée aussi l'extraction par solvant est l'une des opérations unitaires les plus anciennes. Accomplie couramment à la maison où elle s'apparente directement à la réalisation du café quotidien, elle est aussi très employée en industrie particulièrement en hydrométallurgie (dissolution sélective de minerais ou lixiviation) et dans l'industrie agroalimentaire et des cosmétiques (sucre de betteraves, huiles, essences naturelles etc.) [64].

L'évolution des techniques est motivée par la diversité des matières premières et par l'optimisation des conditions d'échange entre phases tout en cherchant à minimiser la consommation de solvant. C'est au cours de XVIIIème siècle que commence l'utilisation de solvant organique pour l'extraction des matières naturelles.

III.1. Définition

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction [65].

III.1. 1 Principe et mécanisme de l'extraction solide liquide

L'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction [64-66]. Suite au contact entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide dans la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs teneurs (fractions) dans la phase solide diminuent et leurs concentrations dans la phase liquide augmentent. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide [67].

Généralement, l'extraction n'est pas très sélective. En plus des molécules d'intérêt, d'autres substances sont également co-extraites à partir de la phase solide vers le solvant. La solution obtenue est appelée extrait. La matière solide obtenue après évaporation du solvant est aussi appelée extrait ou extrait sec. La source solide épuisée après l'extraction

contient très peu ou pas de soluté. Elle est appelée raffinat ou résidu. Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contact entre les phases. Le séchage, le broyage et le morcellement sont souvent utilisés comme opérations de prétraitement. Parfois, des prétraitements enzymatiques sont également utilisés pour faciliter la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant. La rupture des parois cellulaires sous l'action de pectinases et cellulases favorise l'extraction des polyphénols [68].

Après l'extraction, l'extrait obtenu est séparé du solide épuisé par sédimentation, filtration ou centrifugation. Finalement, un extrait sec peut être obtenu par un séchage approprié (atomisation ou lyophilisation, par exemple). Les extraits secs peuvent être conservés longtemps et utilisés comme des ingrédients dans des industries alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- Pénétration du solvant dans la matrice solide,
- Dissolution du soluté dans le solvant,
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide,
- Transfert du soluté vers le cœur de la phase liquide (par diffusion ou convection)
- La durée de l'extraction solide-liquide est déterminée par l'étape la plus lente qui contrôle la vitesse de l'opération. Le plus souvent il s'agit de l'étape de diffusion interne dans la matrice végétale.

III.2. Caractéristiques générales d'extraction solide-liquide

III.2.1. Facteurs influençant le transfert

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont affectés par plusieurs facteurs caractérisant la matière solide, le soluté et le solvant, ainsi que par les conditions opératoires [69].

III.2.1.1. Influence du solide

La taille et la structure de l'échantillon joue un rôle important dans l'extraction. Plus la matière est divisée finement et plus la surface d'échange est grande rendant le contact

solide-liquide meilleur. C'est pourquoi l'extraction des matières végétales est toujours précédée du broyage. Cependant, un broyage poussé peut dégrader les principes actifs sous l'effet de la chaleur dégagée par les frottements. Les particules trop petites peuvent aussi engendrer des problèmes d'imperméabilité du lit de filtration.

III.2.1.2. Influence du soluté

Le soluté à extraire influence la diffusion de par sa structure moléculaire, sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons dans la matière végétale avec d'autres composés. La vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille des particules du soluté : elle diminue quand la taille de ces dernières augmente. Par exemple, les vitesses d'extraction des composants hydrosolubles sont dans l'ordre croissant suivant : Par exemple : acides acétiques > sucre > phénol > pectines [69].

III.2.1.3. Influence du solvant

Les solvants souvent utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO₂ supercritique.

Comme dans le cas du soluté, la taille des molécules de solvant exerce une influence sur la diffusion. Il est également question de sélectivité, afin d'extraire le maximum de soluté et le minimum des autres constituants du cytoplasme et plus généralement de la matière végétale. Car il va falloir ensuite séparer le soluté des autres molécules extraites. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique [70].

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [71]:

- La solubilité des composants spécifiques dans le solvant,
- La régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé. Il ne doit pas former d'azéotrope avec un des composés qu'il solubilise et sa chaleur latente doit être faible,
- La tension interfaciale et la viscosité, car le solvant doit correctement mouiller la matrice solide,
- Idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux.

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature chimique dans la plante, qui peut varier du simple au très fortement polymérisé. Il y a aussi toujours la possibilité d'interaction entre les composés phénoliques et d'autres composants tels que les glucides et les protéines qui peuvent conduire à la formation de complexes insolubles. Les rendements d'extraction et l'activité antioxydante des extraits dépendent du type de solvant utilisé, en raison de différences de potentiel antioxydant des composés en fonction de la polarité [72].

La nature du solvant est très importante pour pouvoir extraire les molécules d'intérêt et, si possible, de façon sélective. Le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et posséder une grande capacité de dissolution. Une faible viscosité facilitera la pénétration du solvant dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide. Une température d'ébullition peu élevée permettra de séparer les molécules extraites et le solvant en utilisant moins d'énergie. Il est toujours préférable d'utiliser des solvants ininflammables et non explosifs. En vue d'application des extraits dans les industries alimentaires, cosmétiques pharmaceutiques, il est important d'utiliser des solvants non toxiques. Généralement, pour l'extraction d'antioxydants, des solvants « food grade » sont utilisés.

L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales. Sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires. Pour des antioxydants peu polaires ou apolaires des solvants plus hydrophobes sont mieux adaptés. Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, ainsi que leurs mélanges avec l'eau sont largement utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Les mélanges extraient souvent mieux les substances ciblées que les solvants purs [73].

Par exemple, l'extraction des composés phénoliques à partir des légumineuses est optimale en utilisant un mélange éthanol / eau 70/30 vol comme solvant. [74].

Pour l'obtention d'extraits d'antioxydants phénoliques, l'eau et l'éthanol sont les solvants les plus couramment utilisés pour des raisons d'absence de toxicité et d'abondance, même si parfois il y a des solvants plus efficaces. Lorsque l'objectif de l'extraction est d'analyser la teneur de certains composés phénoliques dans les sources végétales les restrictions sont moindres et dans ces cas d'autre solvants (méthanol, acétate d'éthyle, éther éthylique etc.) sont aussi utilisés. [75].

III.2.1.4. Influence de la température d'extraction

La température d'extraction a aussi une très grande importance dans le processus d'extraction. Une augmentation de la température favorise la solubilité et la diffusivité du soluté et réduit sa viscosité et celle du solvant. Mais elle peut entraîner une diminution de sélectivité suite à la perméabilité des parois cellulaires par dénaturation. Elle peut également dénaturer le produit à extraire comme elle augmente le risque de perte en solvant [64].

III.2.1.5. Temps de contact liquide-solide ou temps d'extraction:

Le temps de contact entre les deux phases est aussi un des paramètres très importants à maîtriser. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au-delà. Ainsi des économies d'énergie et de main d'œuvre seront réalisées. [76,77].

III.2.1.6. Rapport solvant-solide

Le rapport solvant-solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est grand, la quantité totale de composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide importants, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans les extraits sont faibles et plus d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec [78]. Une optimisation de ce paramètre est donc souvent nécessaire.

III.2.1.7. Influence de l'humidité

En règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité peut donc détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [67,79].

III.2.1.8. Influence de l'agitation

Une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide.

Expérimentalement, ils observent bien des cinétiques différentes en fonction de la prise en considération ou pas de la variation de volume. Ils obtiennent donc pour les mêmes conditions opératoires des valeurs différentes du coefficient de diffusion en fonction du volume considéré.

III.2.2. Performances de l'extraction solide-liquide

L'extraction idéale est caractérisée par une productivité élevée, un rendement maximum, une sélectivité adaptée à l'objectif visé et une concentration maximale de l'extrait. Cependant certains de ces facteurs peuvent être antagonistes comme par exemple le rendement et la concentration. Un compromis est à définir dans la pratique [80].

III.2.2.1 Productivité

La productivité correspond à la masse d'extrait obtenu par unité de temps. Elle est évidemment liée à la cinétique de l'extraction.

III.2.2.2. Rendement

Le rendement est un paramètre qui tient compte de l'efficacité de l'opération. Dans le cas de l'extraction solide-liquide différents types de rendement peuvent être utilisés :

- la quantité d'extrait sec par rapport à la quantité initiale de la source végétale ;
- la quantité de la substance d'intérêt extraite (ou du groupe de substances d'intérêt) par rapport à la quantité initiale de la source végétale ;
- la quantité de la substance d'intérêt extraite par rapport à la quantité de cette substance initialement présente dans la source végéta
- Teneur en substance d'intérêt (pureté de l'extrait)

-La quantité de la substance d'intérêt extraite par rapport à la quantité d'extrait sec total correspond à la teneur (ou la fraction) de cette substance dans l'extrait. Ce paramètre est utilisé pour caractériser la sélectivité de l'extraction.

III.2.2.3. Concentration de l'extrait

L'extrait obtenu après l'extraction subit généralement d'autres opérations telles que la concentration, le séchage, etc. Il est donc important d'avoir un extrait aussi concentré que possible. En effet, la consommation énergétique des procédés de concentration qui suivent l'étape d'extraction sera d'autant plus importante que l'extrait sera plus dilué [80].

III.3 LES PROCÉDES D'EXTRACTION CONVENTIONNELS DES MOLECULES BIOACTIVES

L'extraction est une séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide des solvants sélectifs, traditionnellement de l'eau. Beaucoup de techniques ont été utilisées depuis toujours comme : infusion, décoction, macération et la distillation.

Les techniques d'extraction à pression ambiante, sans ou avec agitation et/ou chauffage utilisées depuis longtemps sont considérées comme techniques classiques (conventionnelles).

III.3.1. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur [64,81].

III.3.2. Extraction par soxhlet

Principe : Dans un système conventionnel de Soxhlet, la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée. [82].

Appareillage : selon la figure III. 1 le soxhlet se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est positionnée une cartouche en papier-filtre épais (5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est positionné sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est positionné la poudre contenant l'espèce à extraire ; puis un réfrigérant (9-10-11) est adapté au-dessus de l'extracteur (il est aussi souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide continu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures. A défaut on peut placer des billes de verres dans le ballon).

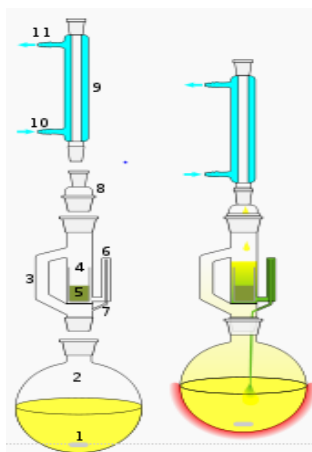


Figure III.1: Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.

Lorsque le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances

extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit par conséquent progressivement en composés solubles.

Le solvant continue alors de s'évaporer, tandis que les substances extraites restent dans le ballon (leur température d'ébullition doit être nettement supérieure à celle du solvant extracteur)

Avantages : Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations. Ainsi, on a un net gain de temps de manipulation (à condition de laisser l'appareil fonctionner un certain temps) : une fois mis en route, le montage n'a pas besoin d'être manipulé ni même surveillé jusqu'à son démontage. De plus, cette méthode requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. L'intérêt est donc également économique.

Le solvant est constamment distillé, de sorte qu'il ne se sature jamais. Même si la substance extraite est en trop grande quantité par rapport au solvant et qu'elle dépasse sa solubilité maximale, c'est toujours du solvant pur qui retombe de l'évaporateur.

Inconvénients : L'extraction par Soxhlet peut présenter les inconvénients si dessous.

- La taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable
- L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques

Les paramètres influençant le Soxhlet : L'efficacité de l'extraction solide – liquide par Soxhlet dépend du gradient de concentration entre la phase solide et le solvant mais également du temps de contact. Ces deux notions influencent la concentration finale du jus d'extraction et le flux. L'objectif est donc de trouver soit la concentration, soit le temps à partir duquel il faut renouveler ou diluer le solvant pour relancer l'extraction. Des conditions opératoires peuvent aussi entrer en compte, telles que :

- Le ratio L/S
- Le temps de contact
- La nature solvant
- Le nombre de siphonnages
- Température d'extraction

Chapitre IV :

***Extraction et caractérisation des
molécules bioactives de l'Atriplex
halimus***

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons étudier tout d'abord l'effet des solvants sur l'extraction des molécules bioactives de l'*Atriplex halimus*. Pour avoir le meilleur solvant d'extraction, nous avons étudié le mélange éthanol-eau, l'optimisation des paramètres d'extraction a été réalisée en utilisant un plan d'expérience.

La modélisation mathématique nous a permis d'étudier l'influence des facteurs sur les réponses qui sont : le rendement, l'activité antioxydante par la méthode de blanchiment du β -carotène, le dosage des polyphénols totaux et le taux de matière minérale. La composition chimique de l'extrait obtenu a été déterminée par HPLC/UV-DAD et fluorescence X.

IV.2. Matériels et méthodes

VI.2.1. Matériels

VI.2.1.1. Matériel végétal

Les feuilles de l'*Atriplex halimus* ont été récoltées au mois de Janvier 2017 dans la région de Djelfa (coordonnées géographiques : 34° 40' 00" nord, 3° 15' 00" est) à 300 km au sud de la capitale (Alger), Algérie.

La plante a été identifiée au niveau de l'herbier de l'INA (Institut National d'Agronomie Alger, Algérie).

L'*Atriplex halimus* a été nettoyé et séché à l'air libre, puis à l'étuve à 45°C pendant 48 h. Ensuite la plante a été finement broyée par un moulin à couteaux et tamisée à l'aide d'un tamis de porosité 100 μ m.



Figure IV.1 : Photographie de la partie aérienne de l'*Atriplex halimus* à l'état sauvage (gauche) et après séchage (droite).

VI.2.1.2. Produits chimiques

L'éthanol, méthanol, acétone, acétate d'éthyle, dichlorométhane, octane, éther de pétrole, hexane, carbonate de sodium, acide gallique, chloroforme, eau oxygénée et le Tween 20 ont été achetés de chez Panreac (Barcelone, Espagne).

Le réactif de Folin-Ciocalteu, β -carotène et Acide linoléique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

VI.2.2. Effet des solvants sur l'extraction des molécules bioactives de l'*Atriplex halimus*

Les solvants organiques utilisés sont répartis en trois groupes, les solvants organiques polaires protiques (méthanol, éthanol), les solvants organiques polaires aprotiques (acétone, acétate d'éthyle et dichlorométhane) et les solvants organiques apolaires (octane, éther de pétrole hexane), de plus l'eau distillée a été utilisée comme solvant de référence.

Nous avons mélangé la plante broyée et le solvant à un ratio de 1/10 (5g de la poudre végétale avec 50 ml de solvant) dans un ballon sous agitation, à une température de 50°C. Après 2 h d'agitation, la solution a été filtrée et le solvant a été chassé pour récupérer l'extrait.

Tableau IV.1 : Les propriétés physico-chimiques des solvants utilisés[83]

Solvant	Nature du solvant	Polarité relative	Température d'ébullition
Eau	Polaire protique	1.000	100 °C
Méthanol	Polaire protique	0.762	65 °C
Éthanol	Polaire protique	0.654	79 °C
Acétone	Polaire aprotique	0.355	56 °C
Acétate d'éthyle	Polaire aprotique	0.228	77 °C
Dichlorométhane	Polaire aprotique	0.269	83,47 °C
Octane	Apolaire	0.015	125,67°C
Éther de pétrole	Apolaire	0.117	35°C
Hexane	Apolaire	0.009	80,75 °C

IV.2.3. Étude du mélange éthanol-eau en utilisant un plan d'expérience

Depuis toujours, le plus grand rôle de l'ingénieur est d'optimiser les procédés afin d'augmenter les bénéfices et surtout de diminuer les coûts. Le but de cette étude est l'optimisation des paramètres d'extraction des molécules bioactives à partir des feuilles de l'*Atriplex halimus*, à cet effet nous avons utilisé un plan factoriel complet à deux niveaux, deux facteurs, et un point au centre.

Les facteurs étudiés : Différents facteurs peuvent influencer la qualité d'une extraction. Dans notre étude, deux paramètres expérimentaux ont été pris en considération dans l'optimisation :

- **Facteur 1 :** la concentration de l'éthanol (**EtOH**).
- **Facteur 2 :** la température (**Temp**).

Le premier facteur est la concentration de l'éthanol dans l'eau (solvant d'extraction) que nous avons varié entre 40% (niveau bas -1) et 100% (niveau haut +1), le deuxième facteur est la température que nous avons variée entre 20°C (niveau bas -1) et 80°C (niveau haut +1).

Nous avons fixé le temps d'extraction à 2 h et le ratio (matière végétale/solvant) à 1/10. Dans cette étude, nous avons effectué 5 expériences parce que nous avons pris en considération le plan factoriel complet à 2 niveaux, 2 facteurs et un point au centre ($2^2+1=5$) ; les conditions opératoires des 5 expériences sont données dans le tableau IV.2.

Tableau VI.2 : Matrice des expériences du plan factoriel utilisé.

Expérience	F1		F2	
	niveau	valeur	niveau	valeur
1	+1	100%	-1	20°C
2	+1	100%	+1	80°C
3	-1	40%	+1	80°C
4	-1	40%	-1	20°C
5	0	70%	0	60°C

Les réponses : Afin d'évaluer l'influence des facteurs sélectionnés sur l'optimisation de l'extraction, quatre réponses expérimentales ont été retenues :

- **Réponse 1 :** Le rendement de l'extraction (**R**).
- **Réponse 2 :** L'activité antioxydante (**AA**).
- **Réponse 3 :** Le taux de matière minérale (**TMM**).
- **Réponse 4 :** Le taux de polyphénols totaux (**TPT**).

La modélisation mathématique : Un plan d'expérience est une planification de l'ensemble des expériences d'un problème multiparamétrique, son objectif principal est de réduire au minimum le nombre d'essais expérimentaux par rapport à une approche classique (tâtonnement), et d'assurer une meilleure qualité de résultats. De plus, il nous permet une modélisation mathématique à l'aide d'une simple corrélation.

Le modèle mathématique polynomiale pour un plan factoriel complet peut être établi en utilisant l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta(\text{Temp}) * X(\text{Temp}) + \beta(\text{EtOH}) * X(\text{EtOH}) + \beta(\text{Temp-EtOH}) * X(\text{Temp}) * X(\text{EtOH}).$$

- Y est la réponse.
- β_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, noté 0 (constante).
- β_i est l'effet du facteur i.
- β_{ij} est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j.
- X_i est le niveau attribué au facteur i.

IV.2.4. Extraction par Soxhlet

50 g de poudre d'*Atriplex halimus* ont été introduits à l'intérieure d'une cartouche en cellulose puis placé à l'intérieure de l'extracteur Soxhlet de capacité de 500 mL. Le ballon du Soxhlet a été rempli par 750 mL d'éthanol. Le solvant à l'intérieur du ballon a été chauffé à l'aide d'un chauffe ballon, ensuite condenser au niveau du condensateur qui est directement lié à un cryostat (Figure IV.2). Après 3 h d'extraction au cours desquelles plusieurs siphonages ont été effectués, l'extrait dissout à l'intérieur du solvant est récupéré.



Figure IV.2: Photographie de l'installation d'extraction par Soxhlet (gauche),
photographie de l'évaporateur rotatif Heidolph (droite).

IV.2.5. Détermination du rendement

Afin d'avoir notre extrait sec, nous avons utilisé un évaporateur rotatif de la marque Heidolph. Le poids en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant par évaporation rotatif) et le poids du ballon vide. Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_{\text{matière végétale}}} \times 100$$

IV.2.6. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de la partie aérienne de l'*Atriplex halimus*, a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre selon la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_4$) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_3).

Le dosage a été réalisé en utilisant la méthode décrite par [84,85]. Brièvement, 100 μL de nos extraits sont mélangés à 200 μL du réactif de Folin-Ciocalteu et 3,16 mL d'eau distillée. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite 600 μL de la solution carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) à 20 % sont ajoutés au mélange.

Les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à UV(Ultra-Violets) visible après 2 h d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 768 nm. On prépare dans les mêmes conditions un témoin avec de l'eau distillée à la place de la solution de l'extrait. La quantification est faite

selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (de 0 à 100 µg/mL). Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique par mg d'extrait.

IV.2.7. L'activité antioxydante in vitro (blanchiment du β-carotène)

La méthode de blanchiment du β-carotène décrite par [86] permet de mesurer l'ampleur de la destruction du β-carotène (décoloration) par les hydro peroxydes formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique en présence des antioxydants.

Une quantité de 2 mg de β-carotène est dissous dans 10 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution dans une fiole contenant préalablement 200 mg Tween 20 et 20 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapor jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion β-carotène/acide linoléique de 4 ml est additionnée à 200 µl des solutions méthanoliques de l'extrait ou de l'antioxydant de référence BHA ou Acide ascorbique. Après une agitation proprement dite, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à $t = 0$ min contre le blanc contenant l'émulsion sans β-carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 120 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à $t = 120$ min. Pour le control positif, l'échantillon est remplacé par le BHA. Le control négatif est constitué par 200 µl de méthanol au lieu de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse. Tous les échantillons sont répétés en deux essais.

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en terme de blanchiment de β-carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition}(\%) = \frac{A_{120} - C_{120}}{C_0 - C_{120}} \times 100$$

A_{120} : représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min.

C_{120} : représente l'absorbance du contrôle à 120 min.

C_0 : représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

IV.2.8. Taux de matière minérale

Le taux de matière minérale a été déterminé par incinération [87]. 1g d'extrait est pesé dans un creusé en céramique, ensuite introduit à l'intérieur d'un incinérateur réglé à une

température de 550°C. Après 5 h le creusé contenant la matière minérale est à nouveau peser. Le TMM est déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$TMM(\%) = \frac{m_f - m_i}{m_{\text{extrait}}} \times 100$$

Ou :

m_f : est la masse finale du creusé après incinération.

m_i : est la masse initiale du creusé vide.

m_{extrait} : est la masse de l'extrait introduite dans le creusé (1 g).

IV.2.9. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC/UV-DAD)

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector), qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile. L'appareil HPLC utilisé est de type Shimadzu (Tokyo, Japon) est montré dans la figure IV.3.

Le protocole utilisé est décrit par [88]. Brièvement, 20 µl de chaque extrait de concentration de 50 µg/ml ont été injectés dans une colonne Nucleosil-C18 de dimension égale à 18.25 x 0.4mm i.d., 5 µm particle.

La phase mobile est constituée de deux éluants qui sont solution A : un mélange d'eau et d'acide phosphorique à un rapport de 999 :1 (v/v) et solution B :acetonitrile.

Le gradient utilisé est : 90% A et 10% B à 0 min ; 90-78%A et 10-22%B de 0 à 13min ; 78-60% A et 22-40% B de 13 à 14 min ; 60% A et 40% B de 14 à 20 min.

Le débit est de 1.5 ml/min et le volume d'injection est de 20 µl. La détection a été effectuée par un détecteur UV-DAD.



Figure IV.3 : Photographie de l'appareil HPLC utilisé (gauche) et photographie du spectrophotomètre de fluorescence X utilisé (droite).

IV.2.10. Spectrométrie de Fluorescence X

La fluorescence X est une propriété spectrale des atomes exploitée couramment en analyse pour obtenir des renseignements qualitatifs ou quantitatifs sur la composition élémentaire de toutes sortes de mélanges. Le principe consiste à irradier l'échantillon soit par un faisceau de rayons X, soit par bombardement avec des particules, généralement des électrons ayant suffisamment d'énergie, pour que les atomes ainsi ionisés émettent un rayonnement de fluorescence également dans le domaine des rayons X. La méthode utilisée pour identifier et quantifier les composés est la méthode semi-quantitative basée sur l'identification des composés en se référant au coefficient $K\alpha$. Le spectrophotomètre de fluorescence X utilisé est de type XRF Thermo Fischer Scientific (Figure IV.4).

IV.3. Résultats et discussions

IV.3.1. L'effet de différents solvants organiques sur l'extraction des molécules bioactives de l'*Atriplex halimus*

Le tableau (IV.3) représente les rendements et les activités antioxydantes des extraits obtenus avec les différents solvants.

Tableau IV.3: Les valeurs des rendements et des pourcentages d'inhibition du blanchiment du β carotène pour les extraits obtenus avec différents solvants et les antioxydants de références.

Échantillon	Rendement	C (mg/ml)	C ₀	C ₁₂₀	A ₁₂₀	PI (%)
Méthanol	12.10%	1	0,713	0,204	0.454	49.116
Éthanol	10.53%	1	0,713	0,204	0.495	57.171
Acétone	1.41%	1	0,713	0,204	0.303	19.450
Acétate d'éthyle	1.84%	1	0,713	0,204	0.285	15.914
dichlorométhane	1.35%	1	0,713	0,204	0.302	19.253
hexane	1.18%	1	0,713	0,204	0.259	10.806
Octane	1.49%	1	0,713	0,204	0.261	11.198
Éther de pétrole	1.16%	1	0,713	0,204	0.254	9.823
Eau	14.87%	1	0,713	0,204	0.401	40.275
A ascorbique	-	1	0,713	0,204	0.311	21.022
BHA	-	1	0,713	0,204	0.664	90.373

C : Concentration de l'échantillon.

C₀ : Absorbance du contrôle à 0 min.

C₁₂₀ : Absorbance du contrôle à 120 min.

A₁₂₀ : Absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min.

PI : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β carotène.

La figure (IV.4) représente les rendements des extraits en utilisant les différents solvants. Les solvants polaires protiques permettent d'avoir les plus grands rendements comparés aux solvants polaires aprotiques et apolaires. Le meilleur rendement est obtenu en utilisant l'eau comme solvant d'extraction, (14.87%).

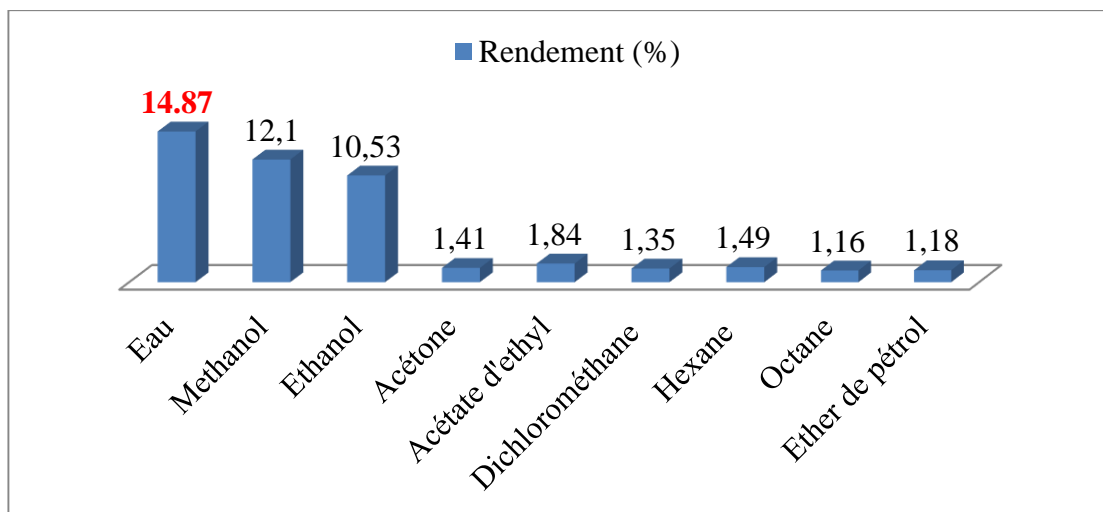


Figure IV.4 : Histogrammes représentant les rendements pour les différents solvants.

La figure (IV.5) représente l'activité antioxydante des différents extraits obtenus ainsi que le BHA et l'acide ascorbique utilisés comme des antioxydants de référence. L'éthanol est le solvant qui permet d'obtenir l'extrait ayant la plus grande activité antioxydante (57.171%).

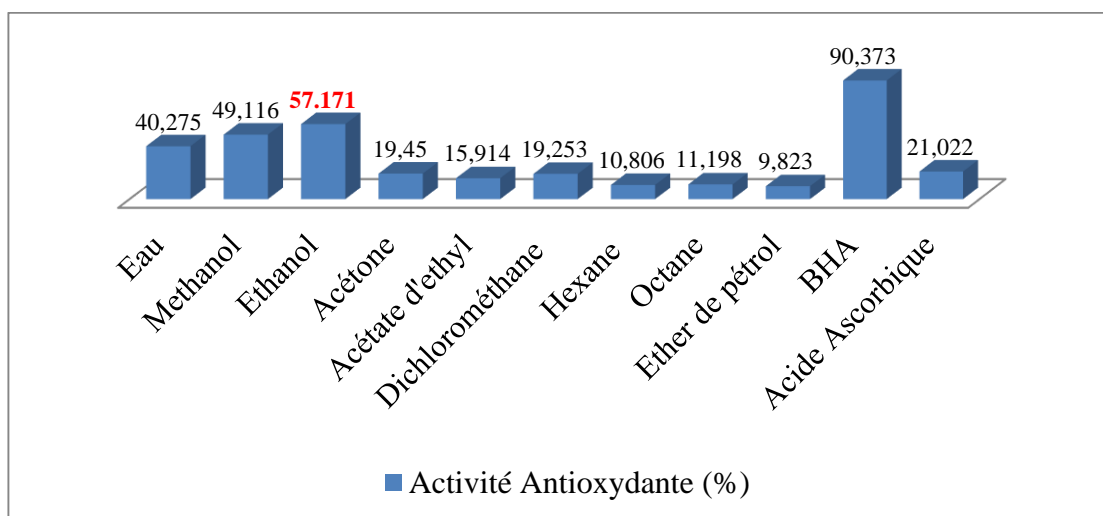


Figure IV.5 : Histogrammes représentant les pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les différents extraits obtenus.

Les résultats obtenus nous permettent de dire que l'*Atriplex halimus* est une plante très riche en molécules hydrosolubles (des métabolites secondaires et primaires, des macromolécules, et des sels), mais ces dernières ne présentent pas une grande activité antioxydante comparées aux molécules solubles dans l'éthanol.

IV.3.2. Étude du mélange éthanol-eau :

Les résultats obtenus dans l'étape précédente (section IV.3.1), montrent que l'eau permet d'obtenir le plus grand rendement tandis que l'éthanol permet d'obtenir la plus grande activité antioxydante.

Dans le but de choisir le meilleur solvant et d'optimiser les paramètres d'extraction, pour avoir le meilleur rendement des molécules antioxydantes, nous avons utilisé un plan factoriel complet. Les résultats du plan factoriel sont donnés dans le tableau (IV.4).

Tableau IV.4: Matrice des réponses du plan d'expérience utilisé.

Exp No	EtOH	Temp	R(%)	AA (%)	TMM (EgAG/gE)	TPT (%)
1	40%	20°C	17.53	40.47	121.81	48.74
2	100%	20°C	5.7	54.83	162.05	11.59
3	40%	80°C	32.54	44.99	125.41	45.32
4	100%	80°C	10.76	58.55	167.01	7.54
5	70%	50°C	17.31	49.71	145.56	27.66

IV.3.2.1. Effets des facteurs et leurs interactions sur les réponses

Les effets des facteurs et leurs interaction sur les réponses étudiées (Rendement, activité antioxydante, taux de polyphénols totaux, taux de matière minérale) sont données dans la figure IV.6.

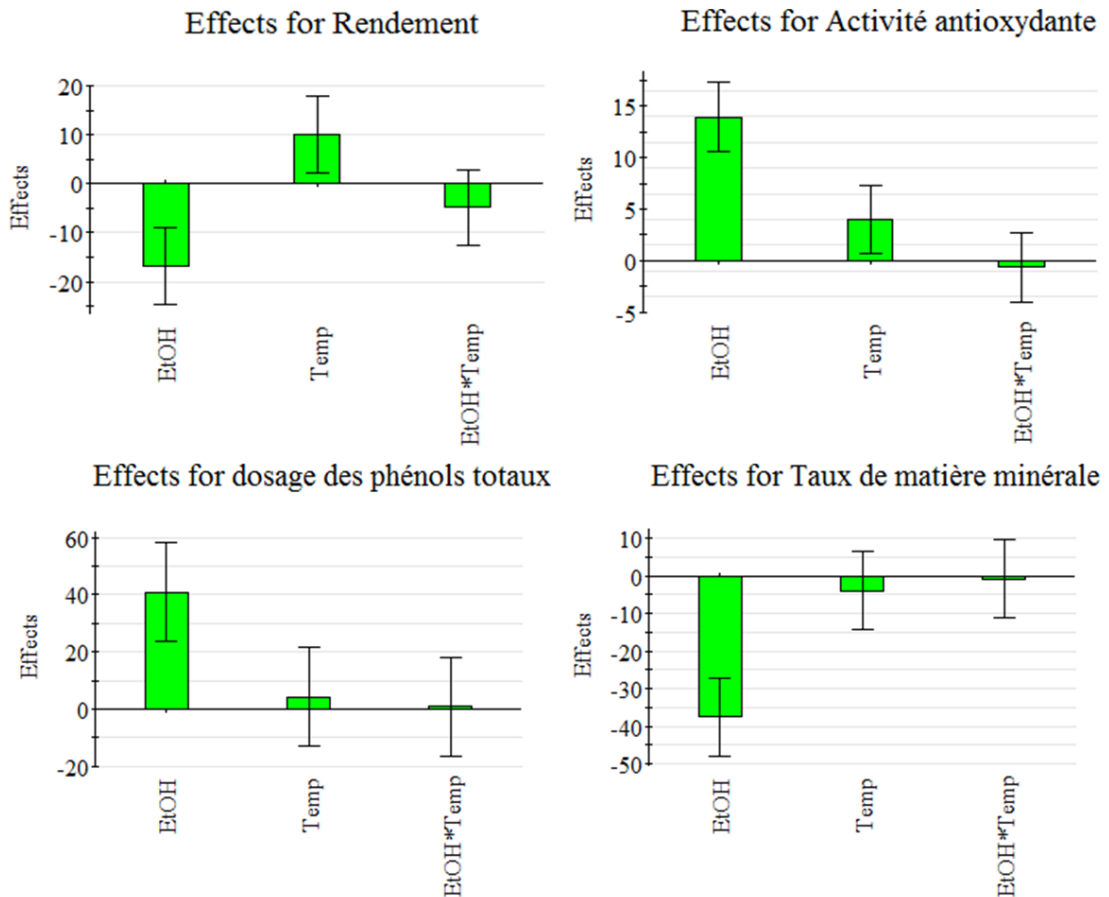


Figure IV.6 : Effet des facteurs et leurs interactions sur les réponses.

De manière générale le facteur 1 (concentration de l'éthanol) est le facteur le plus influent sur toutes les réponses du procédé étudié, comparé au facteur 2 (Température) et l'interaction entre les deux facteurs.

Le facteur 2 (Température) influe positivement sur le rendement, tandis que le facteur 1 (concentration de l'éthanol) et l'interaction entre les deux facteurs influent négativement. Les deux facteurs étudiés influent positivement sur l'activité antioxydante et le taux de Polyphénols totaux, l'interaction entre les deux facteurs est quasiment nulle.

Les deux facteurs étudiés influent négativement sur le taux de la matière minérale dans les différents extraits.

IV.3.2.2. Modélisation mathématique et prédiction des réponses

La figure (IV.7) représente les surfaces de réponses montrant l'évolution des réponses prédites en fonction des deux facteurs étudiés.

Nous observons que le rendement augmente proportionnellement à la température, et inversement à la concentration de l'éthanol. Les réponses 2 et 3 (activité antioxydante et taux de polyphénols totaux) augmentent de manière proportionnelle aux deux facteurs étudiés. La réponse 4 (taux de matière minérale) augmente inversement aux deux facteurs étudiés.

Le tableau (IV.5) représente les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé.

L'étude de la significativité statistique des résultats obtenus a été réalisée par l'analyse ANOVA, toutes les réponses étudiées sont statistiquement significatives (les valeurs de P sont inférieures à 0.05). Les résultats des valeurs P sont donnés dans le tableau (IV.5).

La figure IV.8 représente les coefficients de corrélation (R^2) et de prédiction (Q^2) pour les différentes réponses étudiées.

Les résultats obtenus montrent une très bonne corrélation entre les facteurs choisis et les réponses étudiées (les valeurs de R^2 se rapprochent de 1 pour les 4 réponses étudiées).

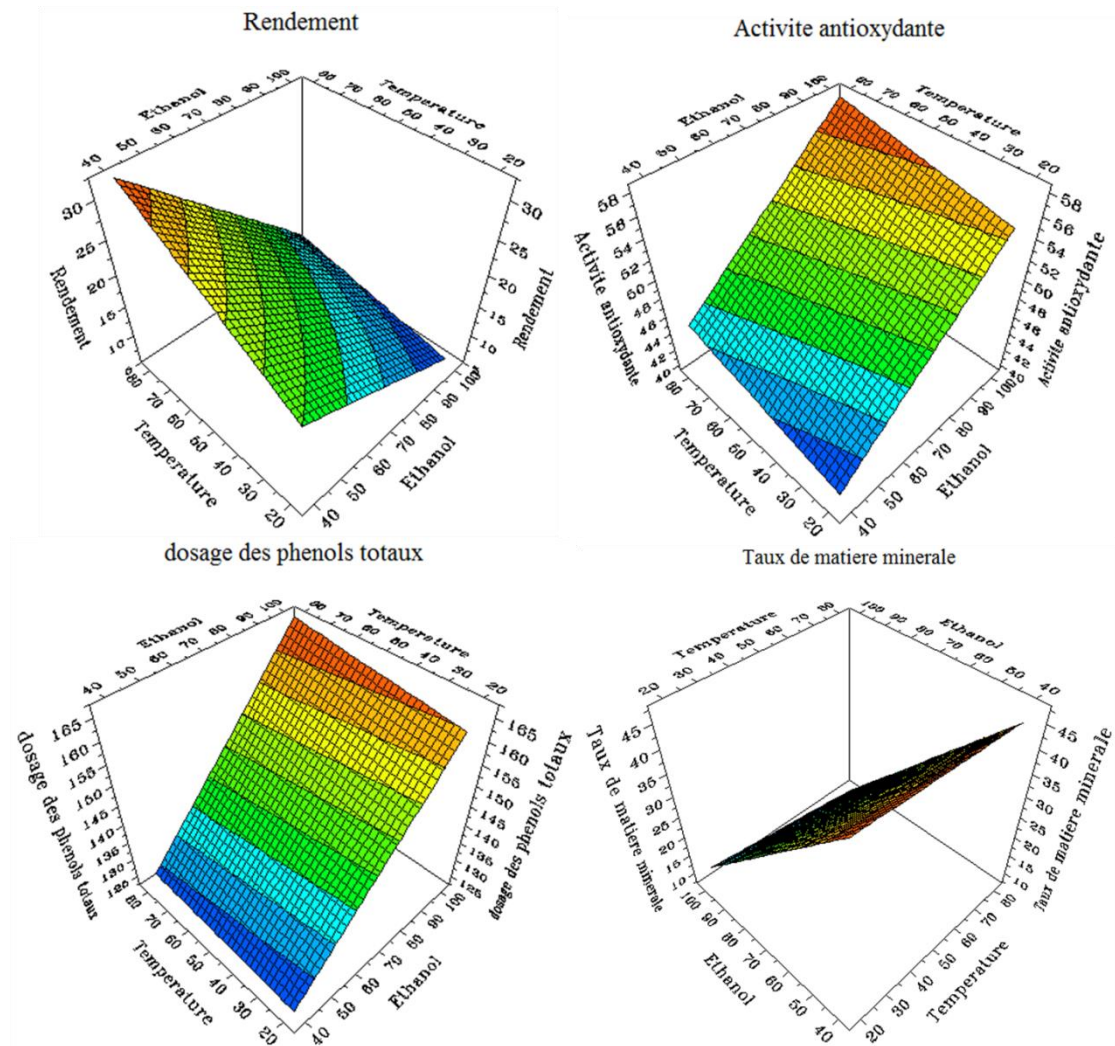


Figure IV.7 : Les surfaces de réponses permettant la prédiction des réponses, le rendement (A), l'activité antioxydante (B), le taux de matière minérale (C) et le taux de polyphénols totaux (D).

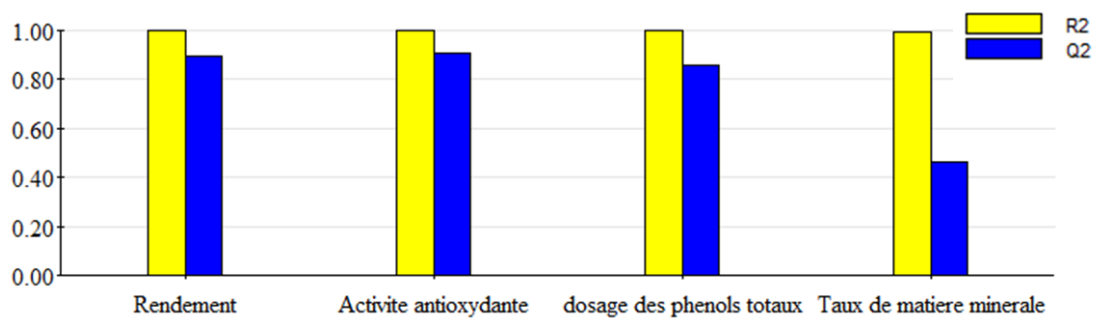


Figure IV.8 : Représentation des coefficients de corrélation et de prédiction pour les réponses étudiées.

Tableau IV.5 : les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé.

Réponse :	Modèle mathématique :	Valeur P :
Rendement	$R = 16.768 - 8.40569 (\text{EtOH}) + 5.0367 (\text{Temp}) - 2.4368 (\text{EtOH}*\text{Temp}).$	0.039
Activité antioxydante	$R = 49.71 + 6.98771 (\text{EtOH}) + 2.01364 (\text{Temp}) - 0.322435 (\text{EtOH}*\text{Temp}).$	0.023
Taux de matière minérale	$R = 144.368 + 20.4524 (\text{EtOH}) + 2.18563 (\text{Temp}) + 0.460499 (\text{EtOH}*\text{Temp}).$	0.042
Taux de polyphénols totaux	$R = 28.17 - 18.7152 (\text{EtOH}) - 1.97152 (\text{Temp}) - 0.432167 (\text{EtOH}*\text{Temp}).$	0.028

La prédiction des réponses étudiées dans notre travail expérimental est possible pour les réponses 1,2, et 3 (rendement, activité antioxydante, taux de polyphénols totaux) car les valeurs de Q^2 sont supérieures à 0.8 et se rapprochent de 1, par contre il est difficile de prévoir des réponses de pour le facteur 4 (taux de matière minérale) en dehors des intervalles étudiés (la valeur de Q^2 est inférieure 0.5).

IV.3.2.3. Discussion des réponses obtenues

Le rendement de l'extraction augmente de manière proportionnelle à la température d'extraction car la solubilité des molécules chimiques augmente systématiquement lorsque les systèmes sont chauffés [89]. Lorsque la concentration de l'éthanol diminue le rendement de l'extraction augmente, ce résultat nous permet de dire que l'*Atriplex halimus* est une plante riche en composés hydrosolubles.

La détermination des taux de matière minérale nous renseigne sur la qualité des composés hydrosolubles qui sont contenus dans l'extrait de l'*Atriplex halimus*. Effectivement, l'étude préalablement réalisée par [90] a montré que les parties aériennes de l'*Atriplex halimus* sont composées de plus de 23% de matière minérale. Dans notre étude, lorsque la concentration de l'éthanol augmente le taux de la matière minérale diminue. Ce résultat est justifié par le fait que les sels sont solubles dans l'eau et très peu solubles dans les solvants organiques comme l'éthanol et le méthanol [91]. Nous avons aussi déterminé que le taux de

matière minérale diminue lorsque la température augmente. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les sels sont solubles à froid [91,92] tandis que les composés organiques sont solubles à chaud [93]. Effectivement lorsque la température augmente la compétitivité entre la solubilité des composés organiques et la solubilité des composés minéraux augmente, donc les composés organiques sont solubilisés de manière plus importante avant la saturation du solvant d'extraction par les sels minéraux.

De plus, une étude réalisée par [94] a montré que la solubilité des acides phénoliques (acide ferrulique, acide gallique, acide syringique, acide vanillique, acide protocatéchique et la vanilline) augmente proportionnellement à la température, et cette solubilité est favorisée par l'ajout de très faibles quantités de sels (NaCl, KCl et LiCl).

L'étude de réponses obtenues pour le taux des polyphénols totaux a permis de déduire que les composés organiques extraits à partir de l'*Atriplex halimus* sont principalement des polyphénols. Le taux de polyphénols totaux augmente de manière proportionnelle aux deux facteurs étudiés (la température et la concentration de l'éthanol). Effectivement, ces résultats sont justifiés par le fait que la solubilité des polyphénols augmente en fonction de la température [94]. Ces résultats nous renseignent aussi que les polyphénols contenus dans l'*Atriplex halimus* sont majoritairement solubles dans l'éthanol et non pas dans l'eau. L'étude qualitative des polyphénols contenus dans l'*Atriplex halimus* rapporté par [95-97] a montré que l'*Atriplex halimus* est très riche en molécules bioactives solubles dans l'éthanol (flavonoïdes, alcaloïdes et Flavonol Glycosides), ce qui conforme nos résultats.

Les réponses obtenues pour le taux de polyphénols totaux et l'activité antioxydante sont similaires, cette similitude est due au fait que les polyphénols sont les composés responsables de l'activité antioxydante et non pas les sels minéraux. Effectivement les polyphénols sont connus pour leur activité antioxydante [98] tandis que les sels minéraux contenus dans les végétaux représentent une activité antioxydante très faible voir inexistante [99]. De plus la relation entre le taux des polyphénols totaux et l'activité antioxydante pour les molécules bioactives extraites à partir de l'*Atriplex halimus* a déjà été étudiée par [19,100], l'augmentation de cette activité antioxydante est proportionnelle aux taux de polyphénols totaux.

IV.3.3.Extraction par Soxhlet :

L'extraction par soxhlet nous a permis d'obtenir un rendement de 39%, le taux de matière minérale de l'extrait obtenu est de 7.91%, le taux de polyphénols totaux est de 172.41 EgAG/g d'extrait et une activité antioxydante de 59.73%.

A partir des résultats obtenus l'extraction par soxhlet est un procédé d'extraction qui nous a permis d'obtenir un meilleur rendement que le procédé de macération classique. Cette augmentation est due aux différents siphonages au cours desquels le solvant d'extraction est régénéré à chaque fois, ce qui permet l'épuisement de la matière végétale.

IV.3.4. Analyse par chromatographie en phase liquide haute performance

L'analyse HPLC de l'extrait éthanolique nous a permis d'identifier 11 composés appartenant à 3 familles différentes, les acides phénoliques, les coumarines et les flavonoïdes. Le chromatogramme HPLC est donné dans la figure IV.9.

Les 4 acides phénoliques sont l'acide firulique (Tr = 4.192 min), la vanilline (Tr = 5.312min), l'acide gallique (Tr = 6.304min) et l'acide caféique (Tr = 7.584). Les deux coumarines identifiées sont l'umbellifénone (Tr = 8.459 min) et l'herniorine (Tr = 9.205 min). Les 5 flavonoïdes identifiés sont l'hyperoside (Tr = 10.493 min), l'isoquercétine (Tr = 11.339 min), la rutine (Tr = 17.489 min), la quercétine (Tr = 23.266 min) et l'utéoline (Tr = 25.355 min).

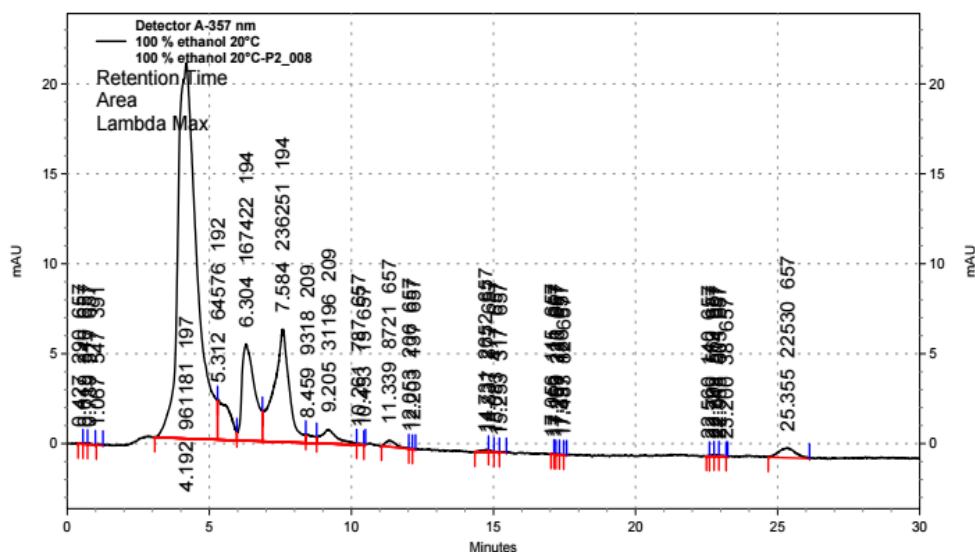


Figure IV.9 : Chromatogramme HPLC/UV-DAD de l'extrait de l'*Atriplex halimus*.

IV.3.5. Analyse par spectroscopie de fluorescence X

L'analyse des cendres de l'extrait obtenu par spectrométrie de fluorescence X nous a permis d'identifier et quantifier les composés minéraux. Le spectre de fluorescence X est donné dans la figure IV.10. Nous distinguons 2 composés majoritaires le chlore (65.590%) et le potassium (24.264%). Nous remarquons aussi la présence de quatre composés en faible quantité le césium (4.559%), le soufre (2.530%), le silicium (0.983%), le scandium (1.905%) et le cuivre (0.168%) ; d'autres composés à l'état de traces (rubidium, brome, ruthénium).

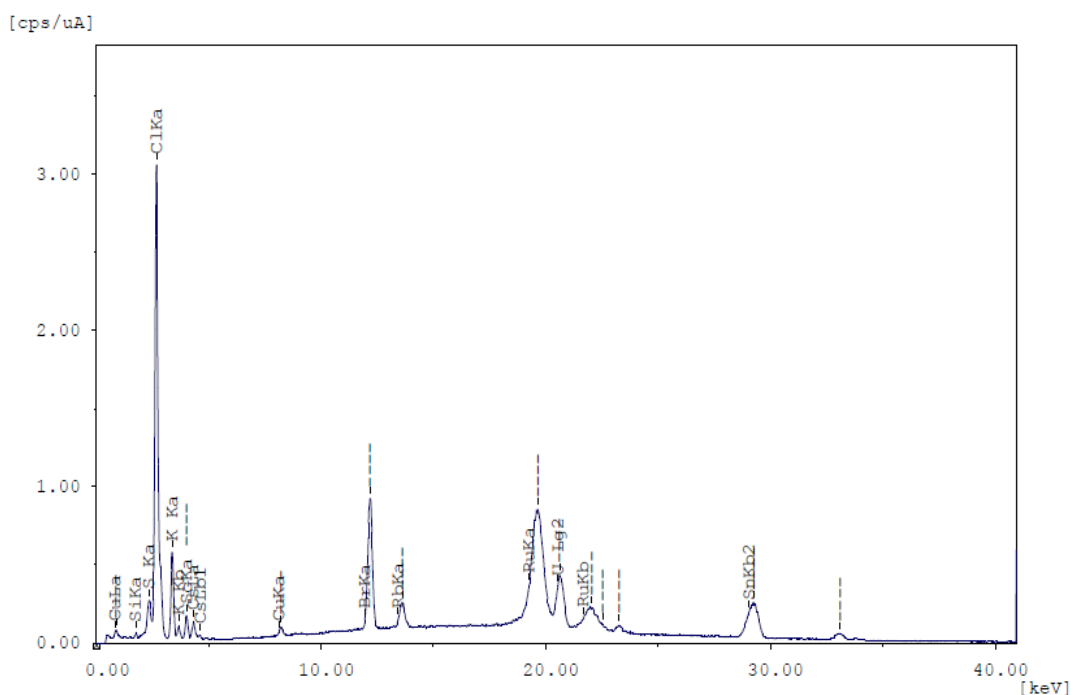


Figure IV.10 : Spectre de fluorescence X de l'extrait de l'*Atriplex halimus*.

IV.4. Conclusion

Cette étude nous a permis d'optimiser les paramètres d'extraction des molécules bioactives extraites à partir de l'*Atriplex halimus* ayant le plus grand pouvoir antioxydant. Le procédé d'extraction par Soxhlet en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction est le procédé le plus adéquat pour l'extraction de ces molécules. La partie organique de ces composés est principalement constituée de polyphénols et la partie minérale est principalement composée de chlore et de potassium.

Chapitre V :

*Évaluation de l'activité
hépatoprotectrice in-vivo de l'Atriplex
halimus*

V.1. Introduction

Les atteintes hépatiques d'origine alcoolique, médicamenteuses et virale présentent un danger pour les populations [101] estimaient au minimum à 800 millions de nombre de cas à travers le monde. Cela nous donne un aperçu sur le problème de santé publique que posent les pathologies hépatiques à l'échelon mondial. Il est important que des travaux soient entrepris afin d'apporter une base scientifique à l'utilisation des remèdes traditionnelles par les populations pour le soin des troubles hépatobiliaires. Par l'intermédiaire de tests biologiques assez simples, il s'agit ici d'apporter une preuve biologique de l'activité hépatoprotectrice attribuée à l'extrait de l'*Atriplex halimus* qui fait l'objet de notre étude afin d'évaluer l'efficacité de notre traitement.

Dans ce présent chapitre, Nous allons étudier l'activité hépatoprotectrice in-vivo de l'*Atriplex Halimus*. L'étude in vivo consiste à faire tester l'extrait sur des souris pendant 6 jours par un gavage et induire l'hépatotoxicité par injection péritonéale au CCl₄ suivi par un sacrifice et prélèvement d'organes et de sang pour des analyses biochimiques et une étude histologique.

V.2. Matériels et méthodes

V.2.1 Matériels

V.2.1.1. Réactifs chimiques

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄), le formaldéhyde et l'éther diéthylique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA).

V.2.1.2. Matériel animal

L'activité hépato-protectrice des molécules bioactives in-vivo a été réalisée sur des souris blanches (*mus musculus*), pesant en moyenne 20 ± 2 g, provenant de l'animalerie de SAIDAL Médéa, en utilisant le protocole de l'hépatotoxicité induite au CCl₄.

V.2.2. Design expérimental

18 souris ont été réparties en 3 lots de 6 souris (3 males et 3 femelles dans chaque cage). Les 3 cages en polypropylène (Figure V.1) sont maintenues à des conditions de température et d'humidité contrôlés avec un cycle de 12h de lumière et de 12h d'obscurité. Les animaux sont nourris avec le régime standard de laboratoire et un accès libre à l'eau.

Comme l'indique le tableau (V.1), les souris ont été réparties en 3 lots :

I Lot : C'est le témoin positif (non intoxiqué et non traité).

II Lot : C'est le témoin négatif (intoxiqué et non traité). Le 6ème jour, nous avons induit l'hépatotoxicité par injection intrapéritonéale de 0.2ml de CCl₄ à 50% dans l'huile de paraffine.

III Lot : Les souris ont été traitées de manière préventive, en réalisant des administrations de l'extrait éthanolique de l'*Atriplex halimus* par gavage d'une dose de 0.2ml de solution de 20mg/ml pendant 6 jours. Le 6ème jour, nous avons induit l'hépatotoxicité par le CCl₄.

Tableau V.1: Suivi quotidien des animaux au cours de l'évaluation de l'activité hépatoprotectrice.

La durée de l'expérimentation :	Lot 1 : physiologique.	Lot 2 : témoin négatif.	Lot 3 : traitement expérimental.
Jour 1	2ml d'eau physiologique.	2ml d'eau physiologique.	0.2 ml de solution de 20mg/ml d'extrait. (équivalent de 200mg/Kg)
Jour 2	2ml d'eau physiologique.	2ml d'eau physiologique.	200mg/Kg
Jour 3	2ml d'eau physiologique.	2ml d'eau physiologique.	200mg/Kg
Jour 4	2ml d'eau physiologique.	2ml d'eau physiologique.	200mg/Kg
Jour 5	2ml d'eau physiologique.	2ml d'eau physiologique.	200mg/Kg
Jour 6	0.2ml d'eau physiologique.	0.2ml/Kg de CCl ₄ à 50% dans de l'huile de paraffine, en IP.	0.2ml/Kg de CCl ₄ à 50% dans de l'huile de paraffine, en IP.
Jour 7	Sacrifice	Sacrifice	Sacrifice



Figure V.1 : Photographie montrant la répartition des souris en 3 lots.

V.2.3. Sacrifice et prélèvements

Avant le sacrifice, les souris ont été mises à jeun pendant 24 heures avec accès libre à l'eau.

Les animaux ont été anesthésiés par l'éther diéthylique, ensuite le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction intracardiaque (figure V.2).

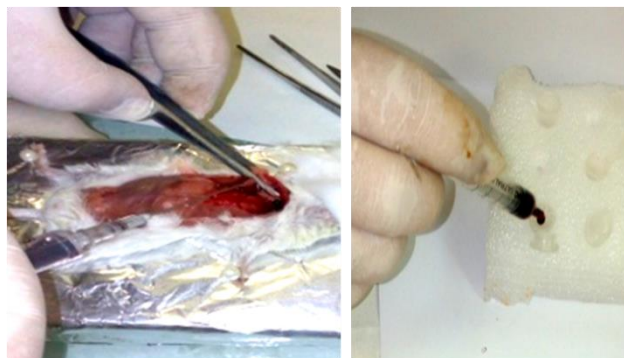


Figure V.2: Photographie du prélèvement sanguin par la ponction intracardiaque (gauche) et récolte du sang (droite).



Figure V.3: Autopsie des souris et prélèvement du foie.

Après le prélèvement sanguin, les autopsies ont été réalisées sur les souris afin de prélever les foies pour les analyses biochimiques et anatomopathologiques.

V.2.4. Étude biochimique des prélèvements sanguins

Les activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALT) et de l'aspartate aminotransférase (AST) dans le sang ont été déterminées à l'aide d'un analyseur automatique Hitachi 747.

V.2.5. Étude biochimique des prélèvements hépatiques

Le niveau d'équilibre du malondialdéhyde (MDA), un produit final de peroxydation lipidique, a été analysé en mesurant le taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 535 nm, selon la méthode rapportée par [102] en utilisant le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane comme norme.

Le niveau total de glutathion a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 412 nm, avec de la levure glutathion réductase, 5,5-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) et NADPH [103].

V.2.6. Étude anatomopathologique et histologique

Elle comporte une observation macroscopique de foies entiers et un examen microscopique des coupes histologiques des foies des souris. Après le sacrifice, l'exérèse des foies entiers est aussitôt réalisée. L'observation macroscopique est qualitative se limite aux caractéristiques externes du foie (couleur, consistance et texture).

Après fixation au formole a 10% durant 48H (figure V.4), suivie d'une déshydratation des prélèvements de foies, des coupes histologiques de 6µm d'épaisseur sont réalisées. Les coupes passent par une étape de coloration à l'hématocriine/éosine [104], avant d'être observées sous microscope optique. La préparation des lames histologiques a été réalisée bénévolement par le laboratoire privé d'anatomie pathologique du Dr Khemsi (Blida).



Figure V.4 : Les organes prélevés dans du formole (étape de fixation).

V.3. Résultats et discussions

V.3.1. Effet de l'*Atriplex halimus* sur les paramètres biochimiques lors de l'hépatotoxicité aigüe induite au CCl₄

Les paramètres biochimiques étudiés sont répartis en deux types, les paramètres biochimiques sanguins et hépatiques. Les paramètres biochimiques sanguins sont les activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALT) et de l'aspartate aminotransférase (AST), les paramètres biochimiques hépatiques sont le niveau d'équilibre du malondialdéhyde (MDA) et le niveau total de glutathion.

V.3.1.1. Effet de l'*Atriplex halimus* sur la biochimie sanguine (ALT et AST)

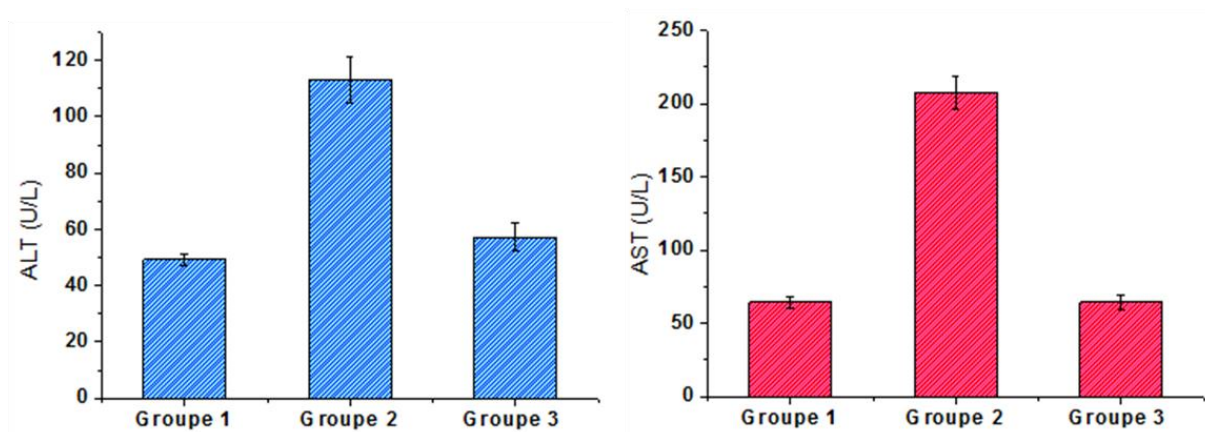


Figure V5: Variation des taux d'ALT et d'AST chez les souris des 3 groupes.

Comme le montre la figure V.5, l'administration d'une dose unique de CCl₄ de l'ordre de 0,2 ml (groupe 2) entraîne une élévation très significative des taux de l'ALT et d'AST comparés avec les taux du témoin positif (groupe1), par contre les taux d'ALT et d'AST

des souris traitées avec les extraits de l'*Atriplex halimus* (groupe 3) sont légèrement plus élevés que ceux des souris non intoxiqués (le groupe 1 physiologique).

V.3.1.2. Effet de l'*Atriplex halimus* sur la biochimie du foie (MDA et Tglu)

D'après la figure V.6, nous constatons que le taux du MDA du groupe intoxiqué (groupe 2) est le plus élevé en le comparant aux ceux des deux autres groupes. Le groupe traité avec l'extrait présente un taux du MDA légèrement plus élevé que celui du groupe physiologique (groupe1). Le taux de Tglu du groupe intoxiqué (groupe 2) est le plus faible contrairement aux deux autres qui présentent des taux plus importants mais le taux de Tglu du groupe 1 (Physiologique) reste le plus élevé.

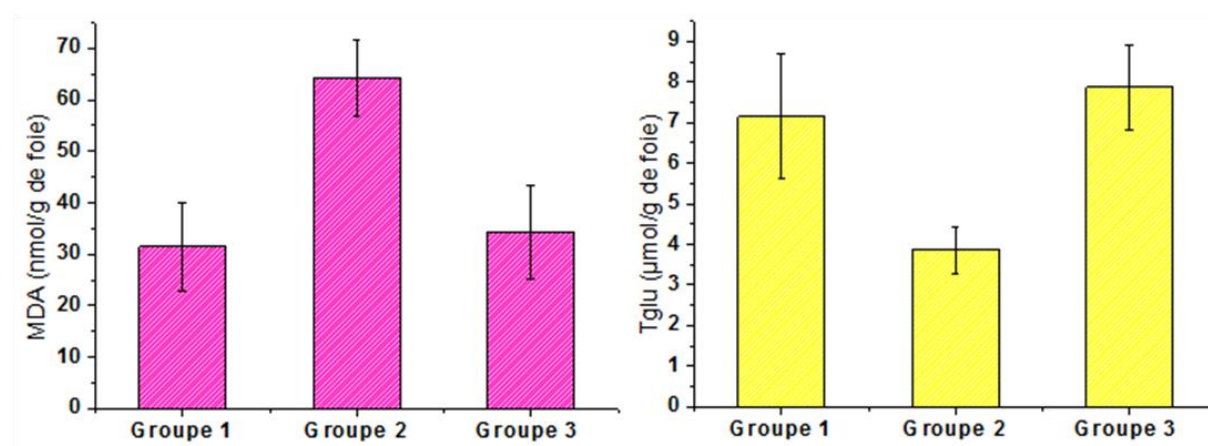


Figure V.6: Variation des taux d'MDA et de Tglu chez les souris des 3 groupes.

V.3.1.3. Discussion

La toxicité du CCl₄ est principalement due à la formation de deux radicaux libres les CCl₃• et le CCl₃O• [105,106], ces radicaux libres vont interrompre les processus physiologiques des différents organes (principalement le foie, les reins, les poumons et la rate) [107]. Ces interruptions vont provoquer des troubles des bilans biochimiques et des destructions des tissus viscéraux.

L'utilisation des plantes médicinales comme l'*Atriplex halimus* dans le traitement des intoxications au CCl₄ est due à leur grand pouvoir antioxydant. Effectivement dans la partie précédente du présent travail (chapitre IV) l'extrait éthanolique de l'*Atriplex halimus* a montré un pourcentage d'inhibition du blanchiment du β-carotène de l'ordre de 59.73%,

une autre étude réalisée par [16] a aussi montré une bonne activité antioxydante de l'extrait de l'*Atriplex halimus* par la méthode du piégeage du radical DPPH.

V.3.2. Effet de l'*Atriplex halimus* sur les caractéristiques anatomiques et histologiques du foie lors de l'hépatotoxicité aiguë induite au CCl₄

V.3.2.1. Étude macroscopique

Les animaux du 1er lot (témoin positif) présentent des foies à l'aspect normal de couleur rouge brune et d'une consistance molle et ferme au toucher. Quant au 2ème lot (témoin négatif), ils présentent des caractéristiques d'un foie malade de couleur jaunâtre, granité, friable au toucher avec des punctuations rougeâtres. L'aspect de foie d'atrophie jaune le plus souvent observé est caractéristique de foies ayant subi une atteinte toxique [108]. Les animaux du 3ème lot, ceux qui ont subi le traitement préventif (traité et intoxiqué) présentent des foies en meilleur état que ceux des foies des souris du 2ème lot, de couleur rouge brune claire, fermes au toucher avec des lésions moindres.



Figure V.7: Photographies du foie d'une souris du lot 1 physiologique (gauche), du lot 2 témoin négatif CCl₄ (milieu) et du lot 3 traité avec CCl₄ + 200mg/Kg d'extrait (droite).

V.3.2.2. Étude microscopique

Les microphotographies montrant les structures des tissus hépatiques des différents lots sont données dans la figure V.8.

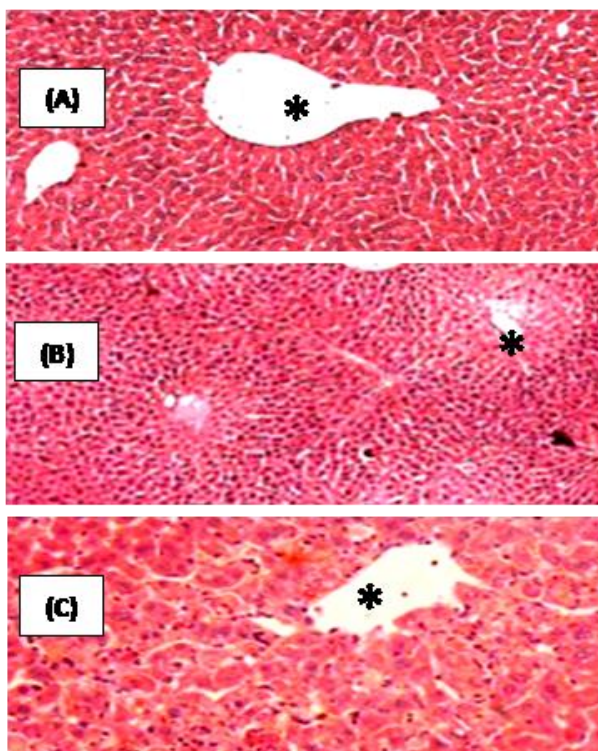


Figure V.8 : Microphotographies montrant les structures histologiques des tissus hépatiques des différents lots, (A) lot physiologique 1, (B) lot 2 témoin négatif traité par le CCl₄ et (C) lot 3 traité par le CCl₄ + 200mg/kg d'extrait, (*) représente des inflammations portales. (Grossissement X40)

1er lot (témoin positif) : Les coupes observées montrent l'organisation histologique d'un foie normal. Les hépatocytes sont disposés en travées centrées autour des veines centrolobulaires. La veine porte est située au milieu

2ème lot (témoin négatif) : L'observation des coupes réalisées montre un aspect de foie d'hépatite toxique aiguë, massive, nécrosante, congestive et une infiltration des cellules inflammatoires. L'architecture des hépatocytes est méconnaissable. La veine porte est invisible, elle s'est rétrécie et c'est dû au ballonnement des hépatocytes.

3ème lot (traité et intoxiqué) : Grâce à l'administration des extraits de l'*Atriplex halimus* les foies des souris traitées puis intoxiquées présentent des lésions moindres que celles observées sur les foies des souris intoxiquées. La nécrose hépatique bien que systématisée n'aboutit pas à une désorganisation complète de l'organisation histologique du foie telle qu'observée chez les souris intoxiquées.

V.3.2.3. Discussion

L'administration préventive des extraits de l'*Atriplex halimus* entraîne une réduction des taux de l'alanine aminotransférase (ALT) et de l'aspartate aminotransférase (AST). L'intoxication aiguë au CCl₄ induit une hépatopathie qui se définit par une anomalie des tests biochimiques (élévation de l'activité sérique des transaminases au-delà de deux fois la normale) et des lésions de nécrose hépatocytaire localisée dans les zones centro-Iobulaires. Selon une étude réalisée par [109], ces lésions régressent avec le temps si bien qu'au bout de 6 jours de traitement l'activité sérique des transaminases reviennent à la normale.

V.4. Conclusion

A partir de la présente étude nous pouvons conclure que le traitement préventif par l'*Atriplex halimus* contre les agents hépatotoxiques chimiques comme le CCl₄ s'est révélé efficace. Les molécules bioactives contenues dans cet extrait permettent la normalisation des activités sériques de l'alanine aminotransférase et de l'aspartate aminotransférase ainsi que la diminution du niveau d'équilibre du malondialdéhyde et l'augmentation du niveau total de glutathion. Les résultats de cette étude ont révélé que l'extrait présente une très bonne action hépatoprotectrice qui permet la réduction des lésions hépatocellulaires induites par CCl₄.

Chapitre VI :

***Formulation d'une émulsion buvable
pour la délivrance de l'extrait de l'A.
Halimus.***

VI.1. Introduction

L'Atriplex halimus est une plante riche en sels minéraux et en molécules organiques hydrosolubles et liposolubles. L'un des problèmes majeurs lors de l'administration des extraits bioactifs de l'*Atriplex halimus* par voie orale et son goût désagréable. Dans le but d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et masquer le goût désagréable de l'extrait, nous avons choisis une forme pharmaceutique de type émulsion buvable.

Sachant que l'extrait de *l'Atriplex halimus* contient un mélange de molécules hydrophiles et lipophiles, nous avons choisis un système de délivrance de type double émulsion (W1/O/W2).

La première phase aqueuse (W1) va contenir les molécules organiques hydrophiles et des sels minéraux. La phase huileuse (O) va contenir les molécules organiques lipophiles, cette émulsion primaire (W1/O) va être stabilisée par la lécithine de soja comme tension actif. La double émulsion finale (W1/O/W2) n'est que la dispersion de l'émulsion primaire (W1/O) dans la phase aqueuse (W2), cette double émulsion sera stabiliser par deux hydrocolloïdes qui sont la gomme xanthane et la gomme arabique.

VI.2. Matériel et méthodes

VI.2.1. Matériel

La lécithine de soja a été procurée de chez Bellat (industrie agroalimentaire, Alger, Algérie), la gomme xanthane a été procurée de chez Sidal (Groupe industriel pharmaceutique, Alger, Algérie) et l'huile de tournesol de marque Fleurial® (Cevital, Algérie) a été acheté au supermarché à Blida, Algérie. La gomme arabique a été achetée de chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). L'eau utilisée est une eau bidistillée, tous les autres produits utilisés sont de grade analytique.

VI.2.2. Formulation des émulsions

Les doubles émulsions sont préparées en deux étapes. La première étape est la formulation de l'émulsion primaire et la deuxième étape est la dispersion de l'émulsion primaire dans une nouvelle phase aqueuse.

Première étape : L'extrait est dispersé dans l'eau (W1), ensuite mélangé à l'huile (O) contenant la lécithine de soja, l'émulsion primaire (W1/O) est préparée en homogénéisant le système à l'aide d'un agitateur Ultra-turrax (IKA, Allemagne) durant 5 minutes à 4500 RPM.

Deuxième étape : En premier lieu, la phase aqueuse (W2) est préparée en mélangeant la gomme xanthane, la gomme arabique et l'eau, les suspensions de polymères préparées sont laissées sous agitation durant 24 heures pour permettre aux polymères de bien s'incorporer à l'eau. Ensuite, l'émulsion primaire (W1/O) est mélangée à la phase aqueuse W2 à l'aide d'un agitateur Ultra-turrax durant 2 minutes à 2000 RPM.

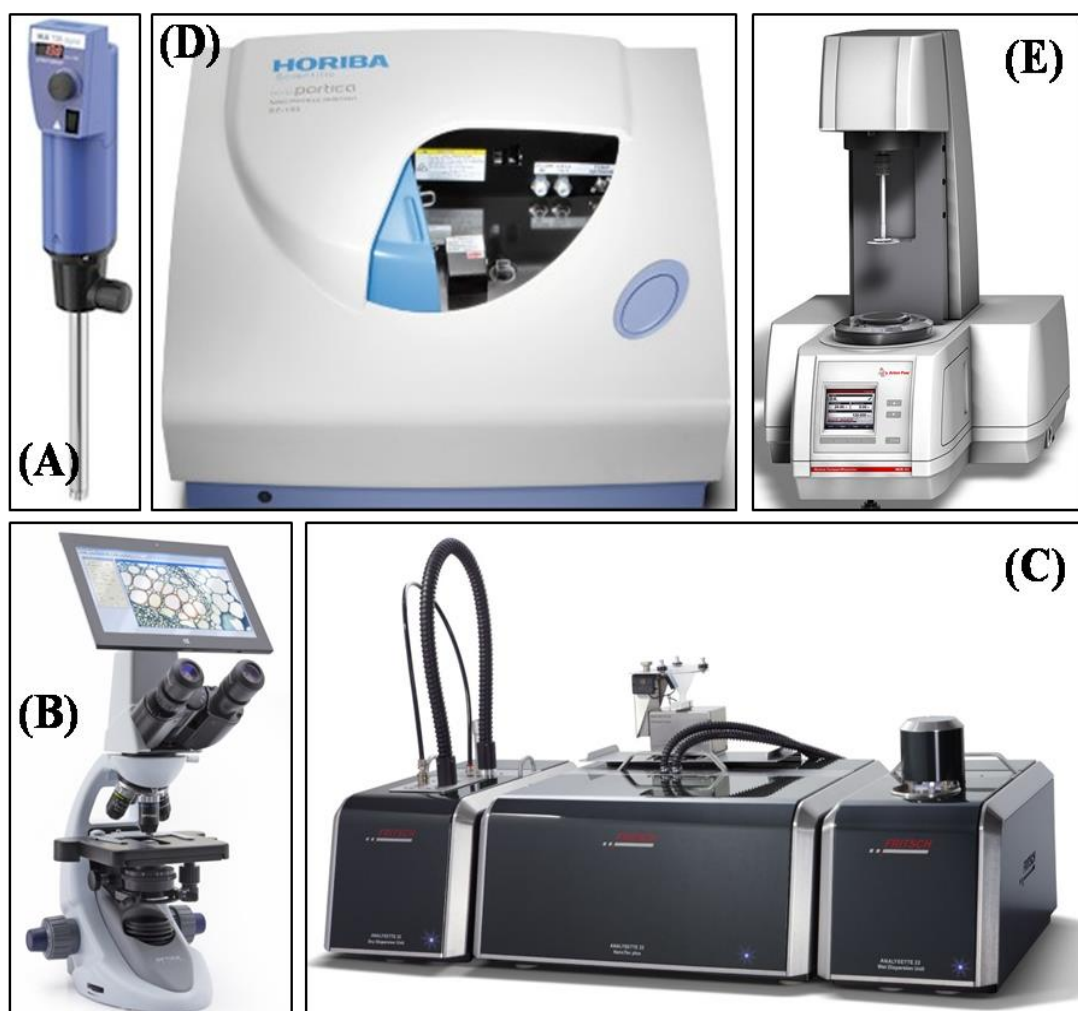


Figure VI.1 : photographies des équipements utilisés, (A) Agitateur Ultra-turrax, (B) Microscope optique, (C) Granulomètre laser, (D) Zétamètre et (E) Rhéomètre.

VI.2.3. Caractérisation des émulsions

VI.2.3.1. La microscopie optique

L'observation des émulsions préparées a été réalisée en utilisant un microscope de type Optika (Italie) munie d'un appareil photo. Les échantillons ont été observés à un grossissement X40.

VI.2.3.2. Granulométrie laser

La taille des gouttelettes a été déterminée à l'aide d'un granulomètre laser de type analysette 22 MicroTec plus (Fritsch, Allemagne).

Les résultats sont exprimés en diamètre moyen calculé automatiquement par le logiciel en utilisant la formule suivante :

$$D_M = \frac{\sum_{i=1}^n f_i \cdot x_i}{\sum_{i=1}^n f_i}$$

Où : 'DM' est le diamètre moyen, 'n' le nombre de classes divisant l'échantillon, 'xi' est le diamètre représentative et 'fi' est la fréquence. Toutes les mesures ont été triplées et réalisées à 25°C.

VI.2.3.3. Potentiel zêta

Tout d'abord les formulations ont été diluées à 1/100 (V/V), puis les solutions sont introduites dans la cellule de mesure du potentiel zêta ensuite le potentiel est mesuré à l'aide d'un zétamètre de type Horiba Nano-Partica SZ-100 series instrument (Horiba Instruments Inc, Irvine, CA, USA). Toutes les mesures ont été triplées et réalisées à 25°C.

VI.2.3.4 Rhéologie

L'étude rhéologie des 9 formulations a été réalisée à l'aide d'un rhéomètre de type MCR 302 (Anton Paar, Autriche). L'appareil nous permettra d'obtenir les différentes courbes d'écoulements $\tau = f(\gamma)$.

En appliquant loi en puissance $\tau = K\gamma^n$, on peut déterminer les deux paramètres « n » et « k ».

“ n ” : est un exposant à déterminer (toujours inférieur à 1 pour le comportement rhéofluidifiant et supérieur à 1 pour le rhéoépaississant), il traduit l'écart avec le comportement newtonien pour lequel $n = 1$ et il est appelé indice de structure. “K” : est l'indice de consistance.

VI.2.4. Étude de stabilité

VI.2.4.1. Stabilité accélérer

La stabilité accélérer a été réalisée par centrifugation à 1000, 2000 et 3000 rpm durant 5 minutes, pour chaque formulation. L'appréciation de la stabilité a été déterminée par l'observation d'éventuelles crémage ou/et séparation de phase.

VI.2.4.2. Stabilité au stockage

Les différentes émulsions ont été mise dans des tubes à essais de 12.5 cm de hauteur, les différents tubes contenant les émulsions sont stockés à températures ambiante (25°C) et à l'étuve (50°C), durant 30 jours.

Tout au long de cette période les tubes sont soigneusement vérifiés pour la détermination d'éventuels phénomènes de déstabilisation, comme la sédimentation, crémage et la séparation de phase.

-Les indices de crémage pour chaque émulsion sont calculés à J_0 , J_{10} , J_{20} et J_{30} en utilisant la formule suivante:

$$C_i = \frac{H_c}{H_0}$$

Sachant que : “ C_i ” est l'indice de crémage, “ H_0 ” est la hauteur de l'émulsion stable à J_0 et “ H_c ” est la hauteur de la fraction du crémage.

VI.2.5. Design expérimental

Dans le but d'optimiser les paramètres de la formulation de la double émulsion (W1/O/W2), nous avons utilisé un plan factoriel complet à 2 niveaux, 3 facteurs et 1 point au centre, 2^3+1 donc un total de 9 expériences. La matrice des expériences est donnée dans le tableau VI.1.

Le premier facteur est le ratio W1:O, son niveau haut (+1) est 4:6 et son niveau bas (1) est 2:8. Le deuxième facteur est le ratio (W1/O):W2, son niveau haut (+1) est 4:6 et un niveau bas (-1) est 2:8 . Le troisième facteur est la quantité de la gomme arabique dans la phase W2, son niveau haut est 10% et son niveau bas est 5%.

Les réponses étudiées sont : L'indice de crémage a 25°C (réponse 1) et a 50°C (réponse 2).

L'exploitation des résultats a été effectuée en utilisant le logiciel MODDE6.0 (version 2001, Suède).

Tableau VI.1: Optimisation des paramètres d'une émulsion de l'extrait de l'*Atriplex Halimus*.

N°	Le ratio W1:O (F1)	Le ratio (W1/O):W2 (F2)	Gomme arabique (F3)	F1	F2	F3
1	+1	+1	+1	4 :6	4:6	10%
2	-1	+1	+1	2:8	4:6	10%
3	+1	-1	+1	4:6	2:8	10%
4	-1	-1	+1	2:8	2:8	10%
5	+1	+1	-1	4:6	4:6	5%
6	-1	+1	-1	2:8	4:6	5%
7	+1	-1	-1	4:6	2:8	5%
8	-1	-1	-1	2:8	2:8	5%
9	0	0	0	3:7	3:7	7.5%

VI.3. Résultats et discussion

VI.3.1 Formulation et caractérisation des émulsions

Toutes les émulsions préparées ont montré une couleur beige opaque, un aspect homogène et un gout fade ; Le gout salé de l'extrait a complètement disparu (cette évaluation des caractéristiques organoleptiques a été réalisée par un groupe de 3

personnes). Toutes les émulsions ont montré des caractéristiques organoleptiques pratiquement similaires.

Pour toutes les formulations l'aspect microscopique des émulsions est présenté dans la figure VI.2. Nous avons observé la structure des doubles émulsions qui est constituées de gouttelettes sphériques avec des bords bien délimités dispersés dans la phase continue, ces gouttelettes contiennent à l'intérieur d'autres gouttelettes de taille plus petite.

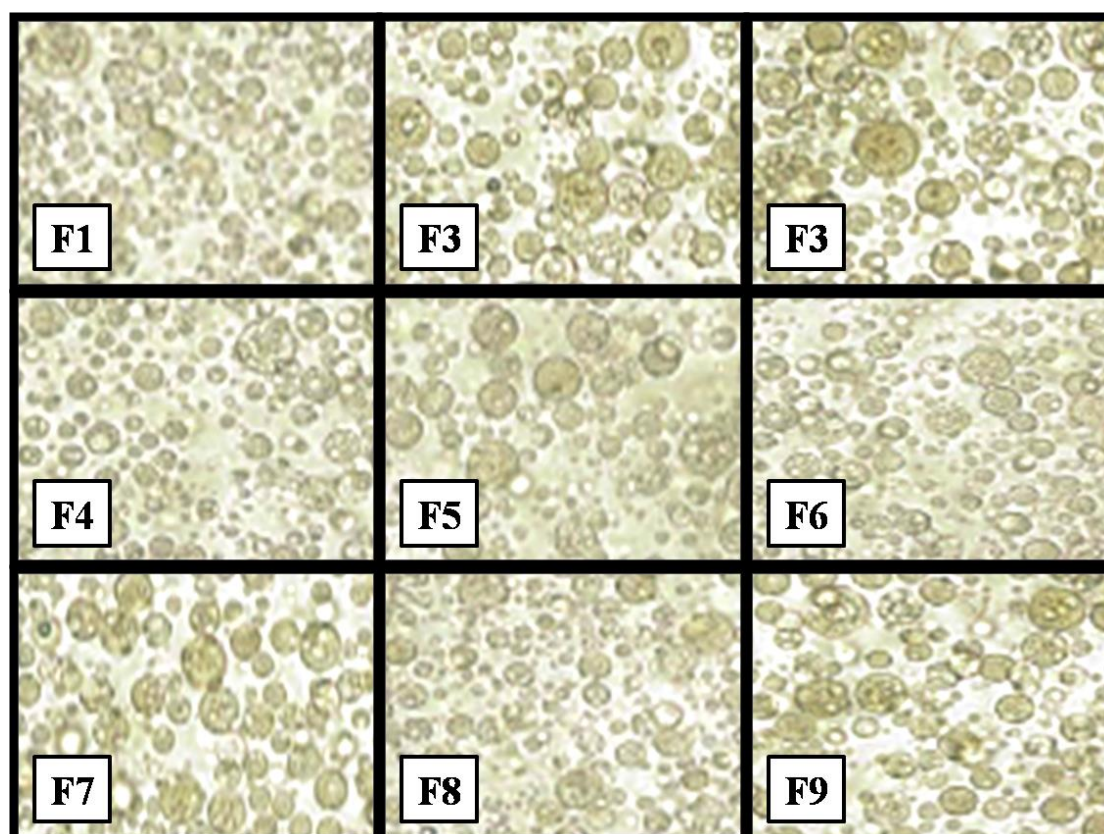


Figure VI.2 : Microphotographies des émulsions avec un grossissement X40.

Le tableau VI.2, regroupe des résultats des caractéristiques physicochimiques (diamètre moyen et potentiel zêta) et rhéologiques (n , k et η_{100}).

D'après le tableau VI.2, nous observons que les différentes valeurs du potentiel zêta des doubles émulsions sont supérieures à -30 mV, ces valeurs nous indiquent que les systèmes dispersés sont électriquement stables. Effectivement, selon l'étude réalisée par [110], les valeurs du potentiel zêta qui sont supérieures à 30 mV ou inférieures à -30 mV permettent la stabilisation des systèmes dispersés. Ces charges négatives du

potentiel zêta sont dues à la nature des stabilisants utilisés, la gomme arabique et la gomme xanthane sont tous les deux des polysaccharides chargés négativement [111].

Les valeurs des diamètres moyens se rapprochent, et elles sont toutes aux alentours de dix micromètres. Par contre les caractéristiques rhéologiques des formulations sont différentes (tableau VI.3). La figure VI.3 représente les courbes d'écoulements des formulations.

L'étude rhéologique en utilisant le modèle de puissance nous a permis de déterminer les valeurs de l'indice de structure (n), l'indice de consistance (K) qui sont les coefficients qui régissent ce modèle. Après élaboration des modèles rhéologiques, nous avons pu déterminer les viscosités à un taux de cisaillement de 100s^{-1} (η_{100}).

Les résultats obtenus ont montré que les viscosités sont influencées par la quantité de l'agent viscosifiant contenue dans la phase W2 (la gomme xanthane), la quantité de l'huile représentant la phase organique (o) et la quantité de gomme arabique.

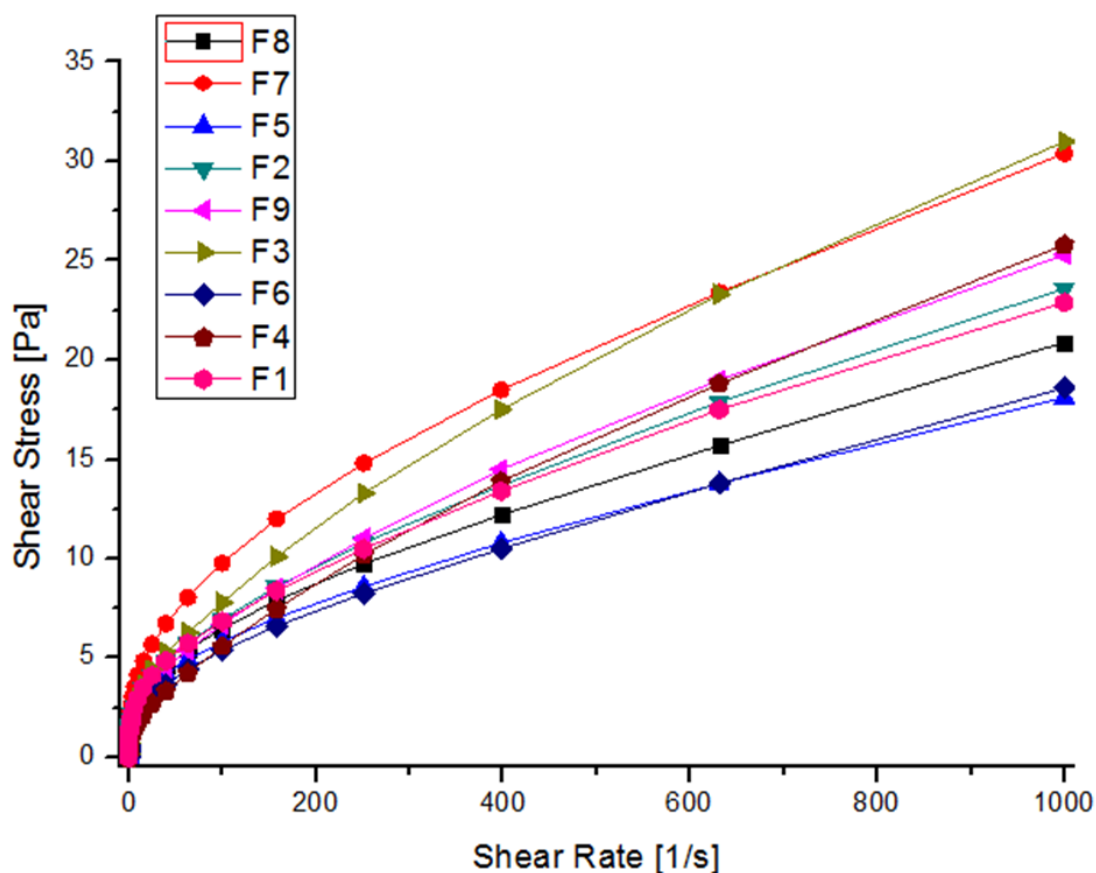


Figure VI.3 : Les courbes d'écoulement des émulsions.

Tableau VI.2 : Les caractéristiques physico chimiques et rhéologiques des émulsions.

Formulation	Potentiel zêta (mV)	Diamètre moyen (μm)	η_{100}	n	k
F1	-33.09 \pm 7.54	9.43 \pm 0.13	77.96	0.437	0.971
F2	-34.80 \pm 2.41	9.14 \pm 0.99	65.73	0.415	1.685
F3	-38.44 \pm 5.12	8.64 \pm 0.21	93.63	0.441	1.023
F4	-36.07 \pm 4.74	9.02 \pm 0.97	120.07	0.470	1.075
F5	-31.52 \pm 2.14	11.51 \pm 1.05	113.92	0.531	0.750
F6	-31.86 \pm 3.85	10.89 \pm 0.79	72.65	0.534	0.900
F7	-32.46 \pm 6.21	10.45 \pm 0.85	65.06	0.432	0.899
F8	-32.81 \pm 4.48	10.67 \pm 0.98	105.25	0.572	0.467
F9	-34.05 \pm 5.10	9.24 \pm 0.54	86.51	0.523	1.08

VI.3.2 Étude de stabilité des émulsions

L'étude de stabilité accélérée par centrifugation a montré que toutes les formulations sont stables après 5 min de centrifugation à 1000, 2000 et 3000 RPM.

Par contre l'étude de stabilité au stockage à différentes température a montré que certaines formulations sont plus stables que d'autres et que la formulation optimum est la formulation F3.

La figure VI.3 représente les photographies des émulsions après formulation (à J0) et après 30 jours de stockage à 25°C et à 50°C. La Figure VI.4 représente l'évolution des indices de crémages pour les formulations au cours du stockage à 25°C et à 50°C.

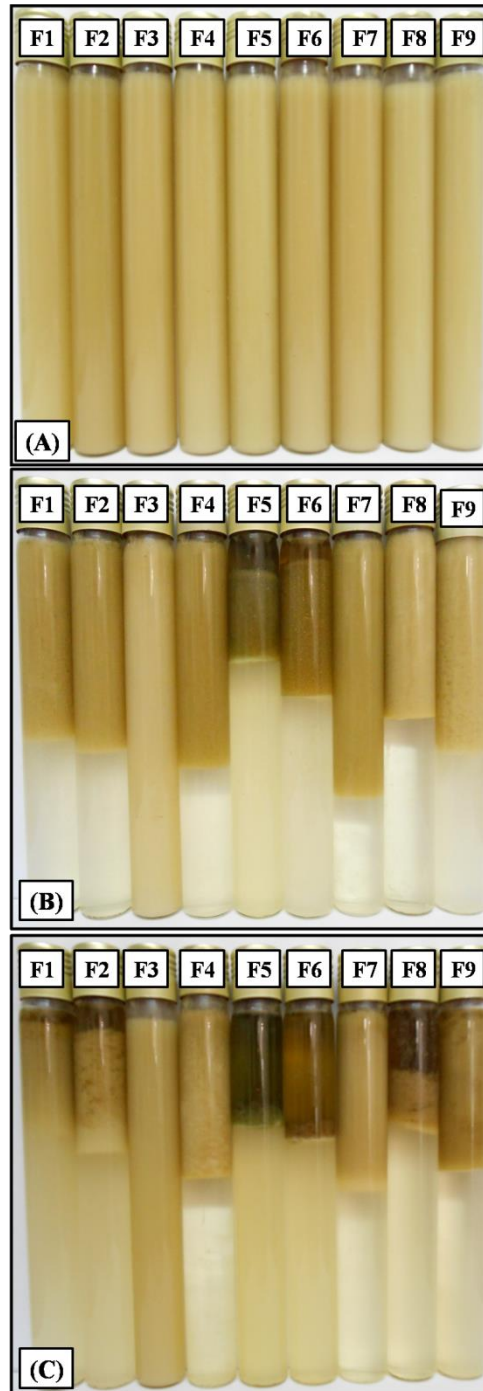


Figure VI.4 : Photographies des émulsions après formulation à J_0 (A) et après 30 jours de stockage à 25°C (B) et à 50°C (C).

Nous observons que les indices de crémages des doubles émulsions diminuent à 50°C de manière plus rapide comparé à 25°C, cette diminution est due à la déstabilisation thermodynamique des systèmes étudiés.

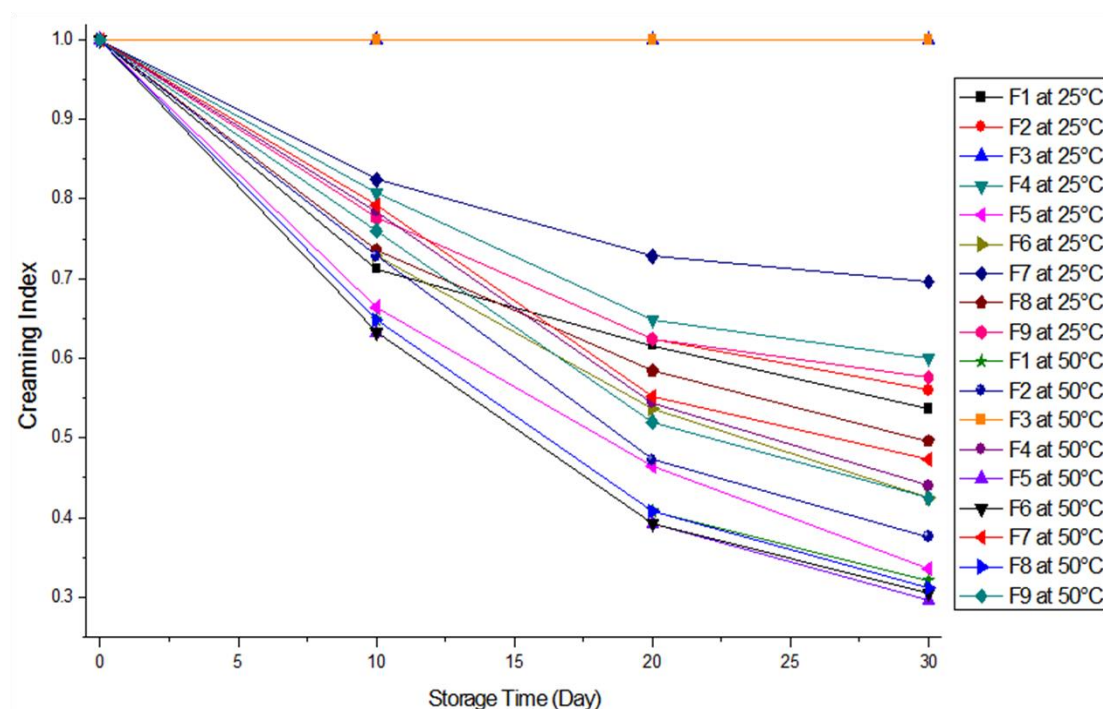


Figure VI.5 : Évolution des indices de crémages pour les formulations au cours du stockage à 25°C et à 50°C

VI. 3.3. Effets des facteurs et leur interaction sur les indices de crémages

Les effets des facteurs et leurs interactions sur les réponses étudiés (ratio W1:O, le ratio (W1/O):W2 et la quantité de la gomme arabique) sont donnés dans la figure VI.6.

D'une façon général le facteur 2 (le ratio (W1/O):W2) est le facteur le plus influant sur toutes les réponses (l'indice de crémage a 25°C et 50°C), comparé au facteur 1 (le ratio W1:O), au facteur 3 (la quantité de la gomme arabique) et aux l'interactions entre les trois facteurs.

Le facteur 2 (le ratio (W1/O):W2) influe négativement sur les deux réponses (l'indice de crémage a 25°C et 50°C), tandis que le facteur 1 (le ratio W1:O), et le facteur 3 (la quantité de la gomme arabique) influent positivement.

Les interactions entre les facteurs 1et 2 (le ratio W1:O, le ratio (W1/O):W2), et les facteurs 2 et 3 (le ratio (W1/O):W2), la quantité de la gomme arabique) influent négativement, tandis que l'interaction entre le facteur 1(le ratio W1:O) et le facteur 3 (la quantité de la gomme arabique) influent positivement.

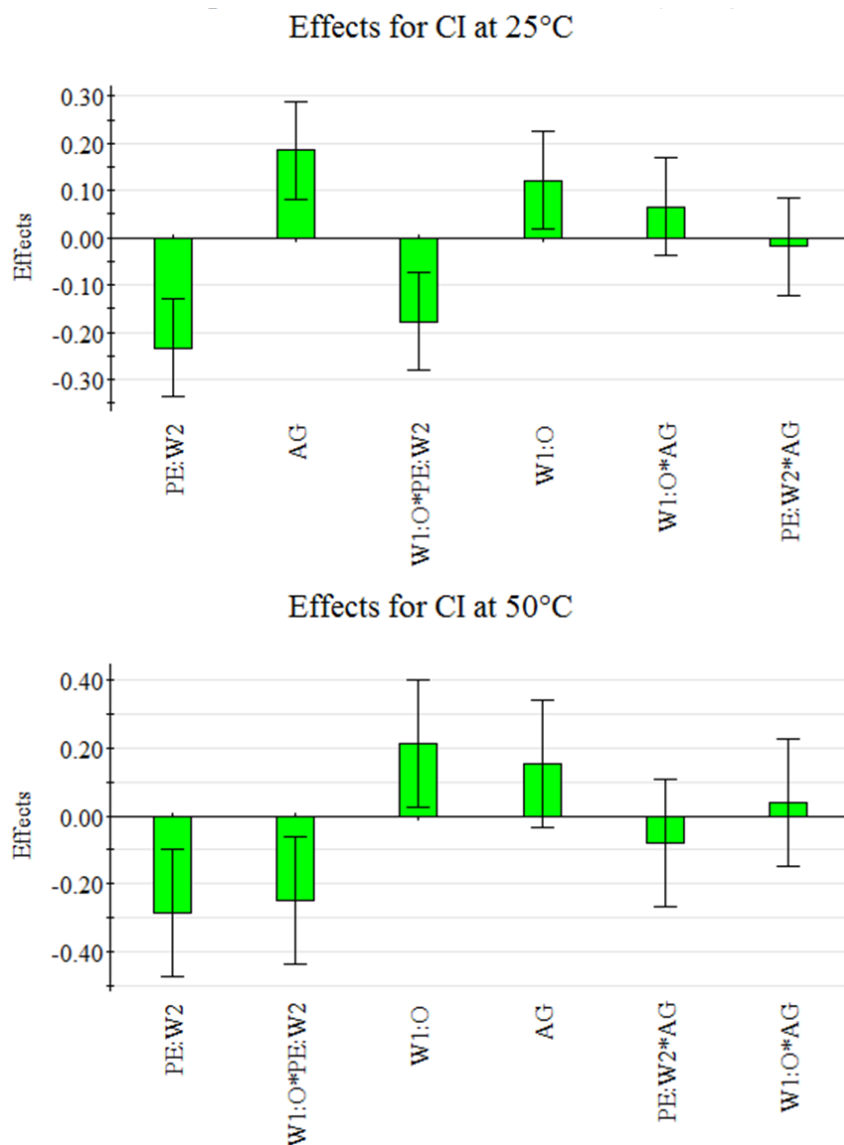


Figure VI.6 : Effets des facteurs sur les indices de crémage à 25°C et à 50°C.

VI. 3.4. Modélisation mathématique et prédiction des indices de crémages

Les figures VI.7 et VI.8 représentent les surfaces de réponse montrant les réponses prédites en fonction des 3 facteurs pour l'indice de crémage à 25°C et à 50°C, respectivement. Nous remarquons que l'indice de crémage augmente proportionnellement au ratio W1:O et inversement au ratio (W1/O):W2, tandis que cette augmentation est proportionnelle à la quantité de la gomme xanthan.

Le tableau VI.3 représente les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé.

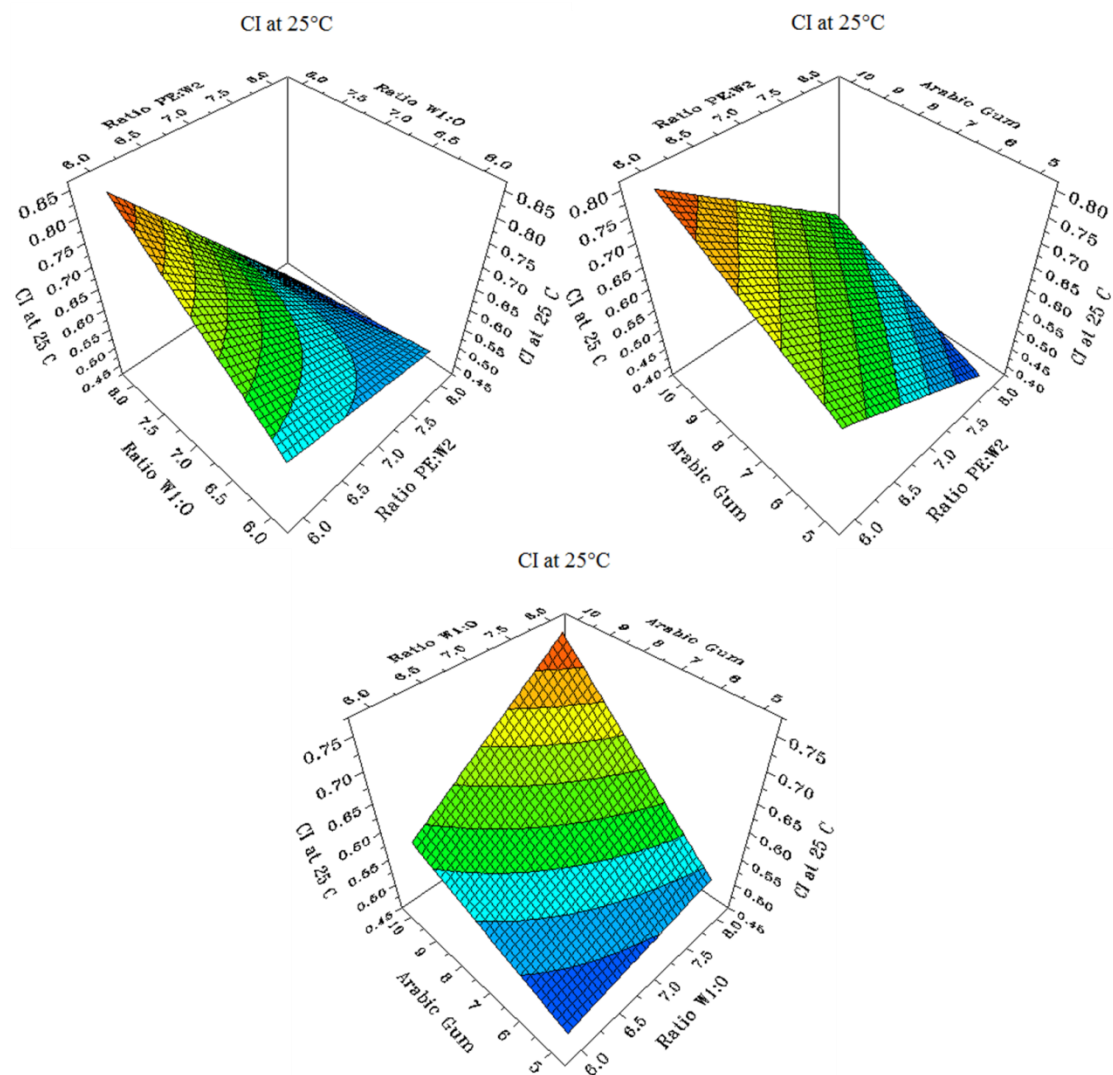


Figure VI.7 : Surfaces des réponses permettant la prédiction des indices de crémaiges à 25°C.

Tableau VI.3 : les modèles mathématiques qui régissent les paramètres étudiés de notre procédé de formulation.

Réponse :	Modèle mathématique :	Valeur P :
Indice de crémaige à 25°C.	$CI_{25} = 0.580444 + 0.061 (W1:O) - 0.117 (PE:W2) + 0.093 (AG) - 0.089 (W1:O*PE:W2) + 0.033 (W1:O*AG) - 0.00899998 (PE:W2*AG).$	0.024
Indice de crémaige à 50°C.	$CI_{50} = 0.455556 + 0.1075 (W1:O) - 0.1435 (PE:W2) + 0.0765 (AG) - 0.1235 (W1:O*PE:W2) + 0.0205 (W1:O*AG) - 0.0405 (PE:W2*AG).$	0.047

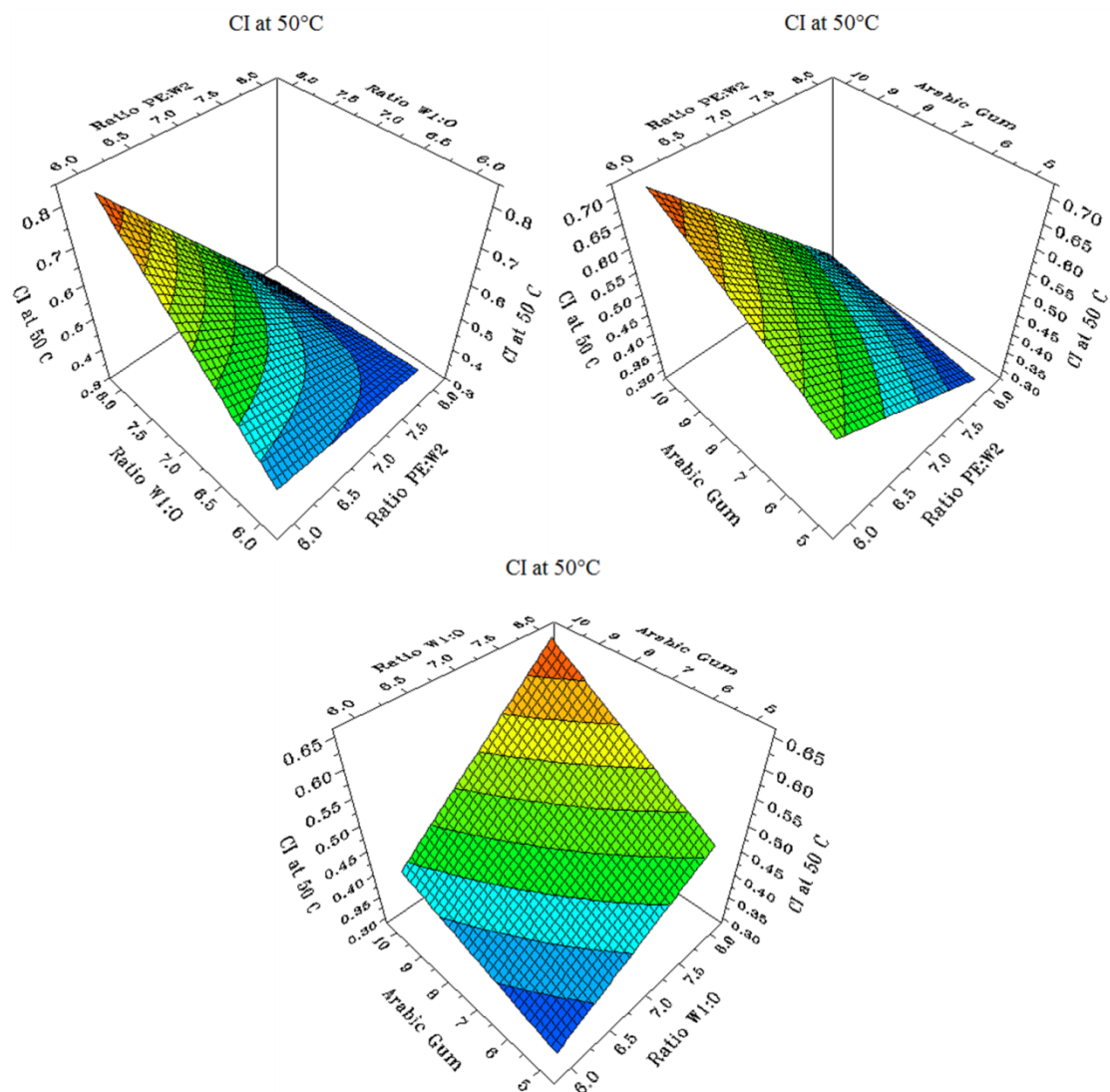


Figure VI.8 : Surfaces des réponses permettant la prédiction des indices de crémages à 50°C.

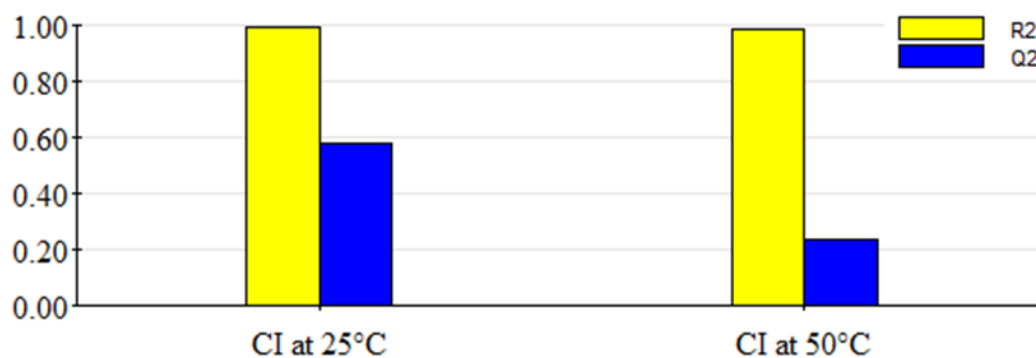


Figure VI.9 : Histogrammes représentant les coefficients de corrélations et de prédictions.

L'étude statistique des modèles mathématiques par le programme Anova a permis de donner des valeurs P de 0.024 pour l'indice de crémage à 25°C et 0.047 pour l'indice de crémage à 50°C.

La figure VI.9 représente les coefficients de corrélation (R^2) et de prédiction (Q^2) pour les deux réponses. Nous pouvons dire que les résultats obtenus montrent de très bonnes corrélations entre eux tandis que la prédiction des résultats en dehors des intervalles étudiés reste difficile.

VI.3.5. Discussion des mécanismes de stabilisation des doubles émulsions préparés

La figure VI.7 montre une représentation schématique de la structure des systèmes élaborés, montrant les différents mécanismes de stabilisation mis en jeu.

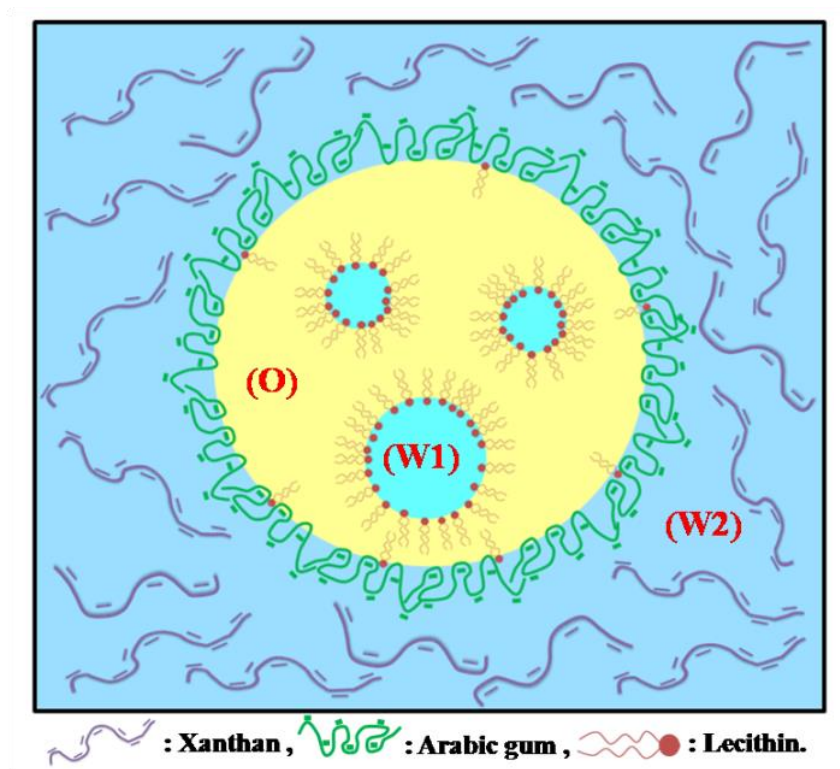


Figure VI.10 : Représentation schématique de la structure des systèmes élaborés, montrant les différents mécanismes de stabilisation mis en jeu

Selon les résultats obtenus la stabilisation des doubles émulsions est principalement assurée par deux mécanismes.

Le premier mécanisme est basé sur la diminution de la tension interfaciale entre l'émulsion primaire W1/O et la phase contenu W2, cette diminution est assurée par gomme arabique. Effectivement, la gomme arabique a la capacité de s'adsorber sur les surfaces interraciales [112].

La figure VI.10 montre la représentation schématique de cette adsorption, ce phénomène permet de réduire la tension interfaciale mais aussi contribuer à la formation du nuage électrique autour des gouttelettes appelé le potentiel zêta.

Le deuxième mécanisme est basé sur l'augmentation de la viscosité de la phase continue par l'agent viscosifiant contenu dans la phase W2. L'augmentation de la viscosité permet de diminuer le mouvement des gouttelettes dans la phase contenue et diminuer leurs collisions, ce qui permet d'éviter le phénomène de coalescence des gouttelettes qui est une déstabilisation irréversible des systèmes dispersés et qui aboutit à la séparation de phases [113].

Ce deuxième mécanisme est très sensible à la température car la viscosité des suspensions d'hydro colloïdes est étroitement lié à la température, cette viscosité diminue lorsque la température augmente [114]. Ce comportement explique clairement la différence entre les indices de crémages à 25°C et à 50°C.

VI.4. Conclusion

En conclusion, une émulsion buvable de type W1/O/W2 contenant les molécules bioactives de l'*Atriplex halimus* et stabiliser par un mélange de gomme xanthane et de gomme arabique a été préparé avec succès. Les paramètres optimales pour cette formulation sont un ratio W1:O de 4:6, un ratio PE:W2 de 2:8 et une quantité de gomme arabique de 10%.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le premier objectif assigné par cette étude été l'optimisation des paramètres d'extraction des molécules bioactives ayant le plus grand pouvoir antioxydant. Une fois notre objectif atteint une identification structurale des composés chimiques présents dans la partie aérienne de l'*Atriplex halimus* a été réalisée par la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la fluorescence X ; afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Nous avons pu identifier des composés de la famille des acides phénoliques, des coumarines et des flavonoïdes qui présentent des intérêts biologiques. L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer et d'optimiser l'activité antioxydante de l'*Atriplex halimus*.

La deuxième étape été basé sur l'évaluation de l'activité hépatoprotectrice in-vivo des molécules extraites à partir de l'*Atriplex halimus*. Les résultats de cette étude ont révélé que les molécules bioactives présentent une action protectrice significative dans la réduction de la lésion hépatocellulaire induite par le CCl₄.

Dans la dernière partie du présent travail nous avons choisi une forme galénique appropriée qui est une émulsion buvable. Dans le but d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, masquer le gout désagréable de l'extrait et opter pour une formulation stable. A cette effet une double émulsion de type W1/O/W2 contenant les molécules bioactives de l'*Atriplex halimus* et stabilisée par un mélange de gomme xanthane et de gomme arabique a été préparée avec succès.

Bibliographie

- [1] YBERT, E., & DE MEUX, A. L. (2001). Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales. Identification, préparations, soins.
- [2] Small, E., & Catling, P. M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. NRC Research Press.
- [3] Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022-1037.
- [4] 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 Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(3), 181-184.
- [5] Lakhdari, W., & Dehliz, A. (2016). Ethnobotanical study of some plants used in traditional medicine in the region of Oued Righ (Algerian Sahara). *Journal of Medicinal Plants*, 4(2), 204-211.
- [6] Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., amine Bekkar, A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of ethnopharmacology*, 175, 626-637.
- [7] Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé Volume 86, août 2008, 577-656.
- [8] Al- Turki, T. A., Omer, S., & Ghafoor, A. (2000). A synopsis of the genus *Atriplex* L.(Chenopodiaceae) in Saudi Arabia. *Feddes Repertorium*, 111(5-6), 261-293.
- [9] Talamali, A., Bajji, M., Le Thomas, A., Kinet, J. M., & Dutuit, P. (2003). Flower architecture and sex determination: how does *Atriplex halimus* play with floral morphogenesis and sex genes?. *New Phytologist*, 157(1), 105-113.
- [10] Quézel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2.
- [11] Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). *Abrèges botanique systématique moléculaire*. 14ème édition révisée, Masson.
- [12] OZENDA P. (2004) - Flore et végétation du Sahara. Ed.Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 622 p.

- [13] Le Houérou, H. N. (1992). The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry systems*, 18(2), 107-148.
- [14] Le Houérou, H. N. (2000). Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semiarid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 14(2), 101-135.
- [15] Al-Owaimer, A. N., El-Waziry, A. M., Koohmaraie, M., & Zahran, S. M. (2011). The use of ground date pits and *Atriplex halimus* as alternative feeds for sheep. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5), 1154-1161.
- [16] Najar, T., Héliali, S., & Nasr, H. (2011). Valorisation des plantes tolérantes à la salinité par les petits ruminants. In *Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterranean Seminars*. OEP, Office de l'Élevage et des Pâturages, Tunis Belvédère (Tunisia); IRESA, Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricole, Tunis Belvédère (Tunisia); CIHEAM-IAMZ.
- [17] Franclet, A., & Le Houérou, H. N. (1971). *Les Atriplex en Tunisie et en Afrique du Nord*. 249 p., 27 figs, 50 phot. FAO, Rome, Italie. English translation by the US Forest Service Microf, (17909).
- [18] Boussaid, M., Ben Fadhel, N., Zaouali, Y., Ben Salah, A., & Abdelkefi, A. (2004). *Plantes pastorales en milieux arides de l'Afrique du Nord*. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 55-59.
- [19] Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chimie*, 12(12), 1259-1266.
- [20] Emam, S. S. (2011). Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *J Nat Prod*, 4, 25-41.
- [21] Pei, Y. Q. (1983). A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives. *Epilepsia*, 24(2), 177-182.
- [22] Aharonson, Z., Shani, J., & Sulman, F. G. (1969). Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*)—a feeding source of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia*, 5(6), 379-383.

- [23] Beloued, A. (2001). *Plantes médicinales d'Algérie*. éd. office des Publications Universitaires, Alger, 284 p
- [24] Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*, 1(8), 945.
- [25] Rahman, I. (2002). Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 1(3), 291-315.
- [26] Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *Productions animales*, 15(1), 67-82.
- [27] Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- [28] Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75(2), 199-212.
- [29] Smith, M. A., Hirai, K., Hsiao, K., Pappolla, M. A., Harris, P. L., Siedlak, S. L., & Perry, G. (1998). Amyloid β Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress. *Journal of neurochemistry*, 70(5), 2212-2215.
- [30] Smith, A. R., Shenvi, S. V., Widlansky, M., Suh, J. H., & Hagen, T. M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1135-1146.
- [31] Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology*, 13(3), 135-160.
- [32] Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1-15.

- [33] Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., & Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease: a critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Annals of Internal Medicine*, 123(11), 860-872.
- [34] Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., & Fonseca, M. J. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *The AAPS Journal*, 5(2), 111-115.
- [35] Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., & Akev, N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110(3), 571-583.
- [36] Duarte, T. L., & Lunec, J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free radical research*, 39(7), 671-686.
- [37] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- [38] Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. CRC press.
- [39] Decker, E. A., Elias, R. J., & McClements, D. J. (Eds.). (2010). *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications: management in different industry sectors*. Elsevier.
- [40] Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- [41] Brzozowska, J., Hanower, P., & Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12(10), 2353-2357.
- [42] Loche, J. (1966). *Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac* (Doctoral dissertation).
- [43] Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). Synergistes naturels des auxines et des giberellines. *Bull. Soc. Fr.*, 26: 2237-2240.

- [44] Alibert, G., Brulfert, J., & Boudet, A. M. (1981). Effect of photoperiod on enzymes involved in polyphenol biosynthesis in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Plant Science Letters*, 23(3), 341-348.
- [45] Heimeur, N., Idrissi Hassani, L. M., & Amine Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in biology and biotechnology*, 3, 37-42.
- [46] DuBois, G. E., Crosby, G. A., & Saffron, P. (1977). Nonnutritive sweeteners: taste-structure relationships for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195(4276), 397-399.
- [47] Tsimogiannis, D. I., & Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 140-146.
- [48] Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS letters*, 85(2), 215-218.
- [49] Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2), 67-202.
- [50] Edenharder, R., & Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), 1-18.
- [51] Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59(3), 113-122.
- [52] Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- [53] Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food.
- [54] Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., & Berghe, D. V. (1998). Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71-76.

- [55] Lunte, S. M. (1987). Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet—visible and electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 384, 371-382.
- [56] Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.
- [57] Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- [58] Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- [59] Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- [60] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- [61] Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- [62] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205.
- [63] Unten, L., Koketsu, M., & Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(6), 2009-2012.
- [64] Leybros, J., & Fremeaux, P. (1984). Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédés)*, J 2780.
- [65] Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1), 23-30.

- [66] Nostro, A., Germano, M. P., D'angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology*, 30(5), 379-384.
- [67] Dibert, K., Cros, E., & Andrieu, J. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of food engineering*, 10(3), 199-214.
- [68] Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2), 209-215.
- [69] Lalou, A. (1995). Mise au point d'un procédé d'extraction des hémicelluloses à partir d'un substrat végétal ligno-cellulosique: application au cas des coques de tournesol (Doctoral dissertation).
- [70] Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), 805-817.
- [71] Tzia, C., & Liadakis, G. (Eds.). (2003). *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press.
- [72] Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., & Ang, P. O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3862-3866.
- [73] Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.
- [74] Prati, S., Baravelli, V., Fabbri, D., Schwarzinger, C., Brandolini, V., Maietti, A., & Bonetti, A. (2007). Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *Journal of separation science*, 30(4), 491-501.
- [75] Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- [76] Galvan D'Alessandro, L. (2013). Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits (Doctoral dissertation, Lille 1).

- [77] d'Alessandro, L. G., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42-47.
- [78] Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- [79] Fattahi, M., & Rahimi, R. (2016). Optimization of Extraction Parameters of Phenolic Antioxidants from Leaves of *Capparis spinosa*. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2321-2334.
- [80] Cisse, M. (2010). Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques: application à *Hibiscus sabdariffa* (Doctoral dissertation, Montpellier 1).
- [81] Laaboudi, W., Ghanam, J., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2015). Ecoextraction of phenolic compounds from Moroccan olive fruits and leaves and their potential use as antimicrobial agents. *Eur J Sci Res*, 132, 255-65.
- [82] Nantenainjanahary, I. (2015). Étude de la stabilisation des molécules bioactive extraites de *Marrubium Vulgar L* par microencapsulation (Mémoire de master, Université SAAD DAHLAB-BLIDA).
- [83] Wiley-VCH Publishers, 3rd ed. (2003). The values for relative polarity are normalized from measurements of solvent shifts of absorption spectra and were extracted from Christian Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*.
- [84] Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-648.
- [85] Ainsworth, E. a., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- [86] Sun, T., Ho, C-H. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743 -749.
- [87] AOAC. (1990). Official method of analyses. In: Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. AOAC, Washington, DC.

- [88] GÎRD, C. E., NENCU, I., COSTEA, T., DUȚU, L. E., POPESCU, M. L., & CIUPITU, N. (2014). QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM SALVIA OFFICINALIS L. LEAVES. FARMACIA, 62(4), 649–657.
- [89] Loftsson, T., & Hreinsdóttir, D. (2006). Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. Aaps Pharmscitech, 7(1), E29-E32.
- [90] Otal, J., Orengo, J., Quiles, A., Hevia, M. L., & Fuentes, F. (2010). Characterization of edible biomass of *Atriplex halimus* L. and its effect on feed and water intakes, and on blood mineral profile in non-pregnant Manchega-breed sheep. Small ruminant research, 91(2), 208-214.
- [91] Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2005). Solubility of NaCl, NaBr, and KCl in water, methanol, ethanol, and their mixed solvents. Journal of Chemical & Engineering Data, 50(1), 29-32.
- [92] Bharmoria, P., Gupta, H., Mohandas, V. P., Ghosh, P. K., & Kumar, A. (2012). Temperature Invariance of NaCl Solubility in Water: Inferences from Salt–Water Cluster Behavior of NaCl, KCl, and NH₄Cl. The Journal of Physical Chemistry B, 116(38), 11712-11719.
- [93] Lyman, W. J., Reehl, W. F., & Rosenblatt, D. H. (1990). Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds.
- [94] Noubigh, A., Abderrabba, M., & Provost, E. (2007). Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. The Journal of Chemical Thermodynamics, 39(2), 297-303.
- [95] Emam, S. S. (2011). Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. J Nat Prod, 4, 25-41.
- [96] Clauser, M., Dall'Acqua, S., Loi, M. C., & Innocenti, G. (2013). Phytochemical investigation on *Atriplex halimus* L. from Sardinia. Natural product research, 27(20), 1940-1944.
- [97] El-Aasr, M., Kabbash, A., El-Seoud, K. A. A., Al-Madboly, A., & Ikeda, T. (2016). Antimicrobial and immunomodulatory activities of flavonol glycosides isolated from *Atriplex halimus* L. Herb. J Pharm Sci Res, 8, 1159-1168.

- [98] Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
- [99] Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., & Ooi, K. L. (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 1-10.
- [100] BENHAMMOU, N. (2012). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Doctoral dissertation)*.
- [101] Guillouzo, A., Clerc, C., Malledant, Y., Chesne, C., RATANASAVANH, D., & GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1989). Cytoprotection. VI: Modèles d'étude de la cytoprotection hépatique. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 13(8-9), 725-730.
- [102] Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
- [103] Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols*, 1(6), 3159-3165.
- [104] Bancroft, J. D., & Layton, C. (2013). *The Hematoxylin and eosin. Theory & Practice of histological techniques*. 7th ed., Churchill Livingstone of El Sevier, Philadelphia, 173-214.
- [105] RECKNAGEL, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 19(2), 145-208.
- [106] Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A., & Waller, R. L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 43(1), 139-154.
- [107] Jiang, L., Huang, J., Wang, Y., & Tang, H. (2012). Metabonomic analysis reveals the CCl₄-induced systems alterations for multiple rat organs. *Journal of proteome research*, 11(7), 3848-3859.
- [108] KOLB., E. (1975). *Physiologie des animaux domestiques*. Ed. Vigot & Frères, 918 pges.

[109] Lanhers, M. C., Joyeux, M., Soulimani, R., Fleurentin, J., Sayag, M., Mortier, F., & Pelt, J. M. (1991). Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta medica*, 57(02), 110-115.

Annexes

Annexe I : Tables ANOVA pour l'extraction.

Rendement	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	5	1814.06	362.811			
Constant	1	1405.83	1405.83			
Total Corrected	4	408.227	102.057			10.1023
Regression	3	407.848	135.949	358.703	0.039	11.6597
Residual	1	0.379003	0.379003			0.615632
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--
Pure Error	0	--	--			--

Activité antioxydante	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	5	12567.4	2513.49			
Constant	1	12355.4	12355.4			
Total Corrected	4	212.017	53.0042			7.2804
Regression	3	211.948	70.6493	1026.93	0.023	8.40531
Residual	1	0.0687967	0.0687967			0.262291
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--
Pure Error	0	--	--			--

dosage des phénols totaux	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	5	105906	21181.1			
Constant	1	104211	104211			
Total Corrected	4	1695.02	423.754			20.5853
Regression	3	1693.17	564.391	306.28	0.042	23.7569
Residual	1	1.84273	1.84273			1.35747
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--
Pure Error	0	--	--			--

Taux de matière minérale	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	5	5385.75	1077.15			
Constant	1	3967.74	3967.74			
Total Corrected	4	1418	354.5			18.8282
Regression	3	1417.33	472.443	703.704	0.02	21.7358
Residual	1	0.671367	0.671367			0.81937
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--
Pure Error	0	--	--			--

Annexe II : Tables ANOVA pour la formulation.

CI25	DF	SS	MS	F	p	SD	
			(variance)				
Total	5	105906	21181.1				
Constant	1	104211	104211				
Total Corrected	4	1695.02	423.754			20.5853	
Regression	3	1693.17	564.391	306.28	0.042	23.7569	
Residual	1	1.84273	1.84273			1.35747	
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--	
Pure Error	0	--	--			--	

CI50	DF	SS	MS	F	p	SD	
			(variance)				
Total	5	105906	21181.1				
Constant	1	104211	104211				
Total Corrected	4	1695.02	423.754			20.5853	
Regression	3	1693.17	564.391	306.28	0.042	23.7569	
Residual	1	1.84273	1.84273			1.35747	
Lack of Fit (Model Error)	1	--	--	--	--	--	
Pure Error	0	--	--			--	