

Original Article

**Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale
Haloxylon scoparium POMEL**

Yasmina LOUERRAD*, Rihab HADDI & Meriem KAID HARCHE

Laboratoire des Productions valorisations végétales et microbiennes (LP2VM), département de biotechnologie, faculté des sciences, université des sciences et de la technologie d'Oran, Mohamed Boudiaf – USTOMB. BP 1505- El Mnaouer Oran 3100, Algérie.

*Auteur correspondant. Email: yasmine.biotech@gmail.com

Mots clés :

Haloxylon scoparium
Stress oxydant
Peroxydation lipidique
Polyphénols
Favonoïdes

Résumé

Le stress oxydant et les modifications oxydatives sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Dans ce contexte le présent travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'une plante médicinale ; *Haloxylon scoparium* (Pomel), connue sous le nom de Remth, vis-à-vis d'une agression oxydante des érythrocytes par deux agents ; le NaCl et le H₂O₂. Ainsi que la mesure de la peroxydation lipidique par la détermination des quantités de MDA. L'évaluation de l'activité antioxydante a montré un effet protecteur modéré de l'extrait aqueux de la plante. La détermination du degré de la peroxydation lipidique pour les échantillons traités par NaCl révèle des taux élevés en MDA alors que le témoin présente une valeur de 0,432 nmol/ml. L'échantillon traité par H₂O₂ présente une quantité de 1.430 nmol/ml de MDA, alors que le témoin présente 0,577 nmol/ml. En conclusion l'extrait *Haloxylon scoparium* (Pomel) est doté d'un pouvoir antioxydant qui a peut être été influencé par différents facteurs tel que la concentration élevée des agents stressants.

Keywords:

Haloxylon scoparium
Oxidative stress
Lipid peroxidation
Polyphenols
Flavonoids

Abstract

Lipid peroxidation Study in the medicinal plant *Haloxylon scoparium* POMEL. Oxidative stress and oxidative modifications are involved in many physiological and pathological processes. In this context, the present work focuses on the study of the antioxidant activity of the aqueous extract of a medicinal plant ; *Haloxylon scoparium* Pomel, known under the name of Remth, towards an oxidant assault of erythrocytes by two agents; NaCl and H₂O₂, then an assessment of lipid peroxidation was performed by the TBARS test. Finally, a phytochemical study was carried out by spectrophotometric assay of total polyphenols and flavonoids. Evaluation of antioxidant activity showed a moderate protective effect of the aqueous extract of the plant. Determining the degree of lipid peroxidation in the samples treated with NaCl revealed elevated levels of MDA, while the control has a value of 0.432 nmol / ml. The sample treated with H₂O₂ has an amount of 1.430 nmol / ml MDA , while the control has 0.577 nmol / ml. In conclusion extract *Haloxylon scoparium* (Pomel) has an antioxidant which may have been influenced by various factors such as the high concentration of stressors.

INTRODUCTION

La valorisation de ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus

importante dans notre pays. Le Sahara dans sa partie Nord, ainsi que la steppe Algérienne

possèdent une végétation riche en plantes médicinales. Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme sources d'antioxydants, qui peuvent être employées pour se protéger contre les effets du stress oxydant (Mata *et al.*, 2007). Dans cette étude, notre choix s'est porté sur une plante utilisée depuis longtemps, dans la pharmacopée traditionnelle, il s'agit d'*Haloxylon scoparium* (Pomel), connue sous le nom de Remth, qui est largement répandue dans la steppe Algérienne et le Sahara septentrional utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle et reconnue pour ses vertus thérapeutiques. Elle est employée pour traiter les infections des yeux, elle est également indiquée en cas d'indigestion, piqûres de scorpion, dermatoses, dorsalgie (Baker, 1996; Iwasa *et al.*, 2001). Elle a été décrite en tant qu'une plante riche en alcaloïdes, polyphénols et flavonoïdes (Benkrief *et al.*, 1990; Jarraya *et al.*, 1993, 2008, Jarraya et Damak, 2001), mais relativement peu a été étudiée sur sa phytochimie. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante de cette plante vis-à-vis d'une agression oxydante des érythrocytes par deux agents ; le NaCl et le H₂O₂, guidée par des tests biologiques *in vitro* ensuite une évaluation de la peroxydation lipidique a été effectuée par le test des TBARS. Dans une deuxième partie, une étude phytochimique a été réalisée par évaluation de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

MATERIEL ET METHODES

La plante ayant fait l'objet de notre étude, *Haloxylon scoparium* (Pomel), a été récoltée en Mars 2008, dans la région de Béchar, L'extrait aqueux lyophilisé de la plante a été obtenu à partir de la tige et des feuilles de *Haloxylon scoparium* (Pomel). Le sang humain a été prélevé à partir d'un sujet sain et collecté dans des tubes héparinés le jour même du test, le prélèvement a été fait par un laboratoire d'analyses médicales.

Induction du stress oxydatif

Le principe de ce test consiste à soumettre une suspension d'hématies à une agression oxydante par différents agents (NaCl et H₂O₂) en présence et en absence de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Haloxylon scoparium* (Pomel).

Lavage des hématies : Le sang total préalablement hépariné est centrifugé à 3700 tours/mn pendant 20mn. Après élimination du sérum, le culot (contenant les hématies) est lavée trois fois avec une solution isotonique (tris-NaCl) à pH 7.2 ; pendant chaque lavage la suspension est homogénéisée par le vortex puis centrifugée pendant 20mn.

Induction du stress par le chlorure de sodium (Selon Moreira *et al.*, 2011) : Afin de déterminer la concentration de NaCl qui provoque un stress oxydatif, l'attaque radicalaire a été induite par l'addition à 100 µL de globules rouges, 5ml d'une solution de NaCl à différentes concentrations (3, 5 et 7g/l), ainsi qu'un témoin positif (l'eau distillée) et un témoin négatif (NaCl à 9 %). Après incubation pendant 30 mn à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 10 mn et la lecture des densités optiques est effectuée à 540 nm.

Induction du stress oxydatif par l'eau oxygénée (Selon Low *et al.*, 2007) : 100 µl d'hématies sont ajoutés à 100µl d'azide de sodium à 100 mM ; après incubation pendant 5 mn, 100 µl d'eau oxygéné, est additionné ; on incube pendant 30 mn, le mélange est centrifugé pendant 10 mn et les densités optiques sont lues à 540 nm.

Evaluation de l'activité antioxydante

En présence de chlorure de sodium : 100 µl de globules rouges sont mélangés avec 100 µl d'extrait d'*Haloxylon* à différentes concentrations (1, 2.5, 5, 7.5, et 10%), qui sont préparées à partir d'une solution mère à 10%, après une incubation de 10 mn à température ambiante, 5ml de NaCl à une concentration de 3 et 5g/l sont ajoutés, après incubation 30 mn, le mélange est centrifugé pendant 10 mn. L'évaluation du pouvoir hémolytique a été effectuée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540nm.

En présence de l'eau oxygénée : 100 µl de l'extrait à différentes concentrations (1, 2.5, 5, 7.5, et 10%) ont été additionnés à 100 µl d'hématies, après homogénéisation et incubation pendant 10 mn ; on ajoute 100 µl d'azide de sodium, 100 µl d'eau oxygénée et on incube pendant 30 mn, le mélange est centrifugé pendant 10 mn, et les densités optiques sont lues à 540 nm.

Le témoin positif en absence de l'extrait et le témoin négatif ont été préparés dans les mêmes conditions.

Evaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est évaluée par la mesure du MDA (malondialdéhyde) avec le test TBARS (thiobarbituric reactive species), selon (Quitaniha *et al.*, 1982). 200 µl de surnageant est prélevé à partir de la suspension d'hématies traitée par le NaCl à (3 et 5 g/l) et l'H₂O₂, on ajoute 0.8 ml de NaCl à 0.9 % , 20 µL de buthyl-hydroxy anizol (BHA) (2% dans l'éthanol) (Sigma-aldrich) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) (Sigma-aldrich) (TBA dans du HCl à 0.25 N) en concentration finale d'acide thrichloroacétique (TCA à 15 %) sont ajoutés). Après incubation à 100 °C pendant 30 mn et refroidissement dans la glace pendant 5 mn, les

échantillons sont centrifugés à 3700 tours / mn pendant 10 mn. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=535$ m.

La concentration des MDA (Sigma-aldrich) est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec le 1,1,3,3 tétraméthoxypropane.

Etude phytochimique

Dosage des Phénols totaux: La teneur en composés phénoliques de l'extrait a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Singleton et Rossi, 1965). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique.

Dosage des flavonoïdes: La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (Kim *et al.*, 2003) Une gamme étalon est réalisée avec la catéchine.

RESULTATS

Induction du stress oxydatif

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de NaCl à différentes concentrations ainsi que l' H_2O_2 provoque en effet une hémolyse des érythrocytes à différents degrés.

Evaluation de l'activité antioxydante

En présence de NaCl 3 g/l : L'évaluation du pouvoir antioxydant de *Haloxylon scoparium* (Pomel) en présence de NaCl à une concentration de 3 g/l n'a montré aucun effet protecteur, avec des taux d'hémolyse compris entre 99.55% et 100% pour toutes les concentrations de l'extrait (Figure 1).

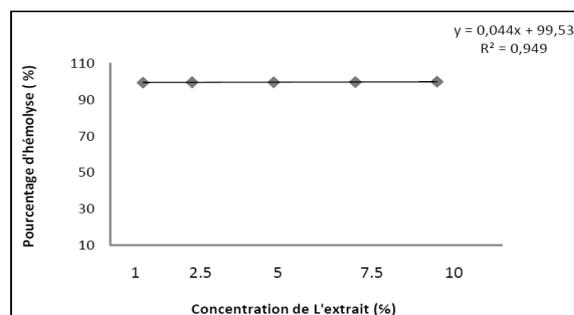


Figure 1. Courbe représentant le taux d'hémolyse en pourcentage en fonction des concentrations de l'extrait aqueux en présence de NaCl à 3g/L.

En présence de NaCl à 5 g/l : A la concentration de 5g/l de NaCl, nous avons remarqué une corrélation entre l'augmentation du taux de l'activité hémolytique et l'augmentation de la concentration de l'extrait.

Cependant cette augmentation de l'activité hémolytique reste faible avec des taux compris entre 63.85 et 81.76% comparé au témoin positif qui représente 100% (Figure 2).

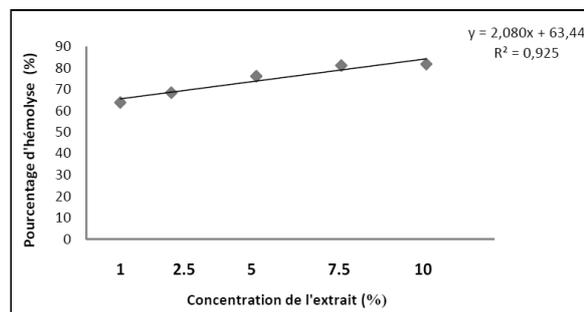


Figure 2. Courbe représentant le taux d'hémolyse en pourcentage en fonction des concentrations de l'extrait aqueux en présence de NaCl à 5g /L.

En présence de H_2O_2 : Les résultats obtenus suite au stress induit par l' H_2O_2 , indiquent un effet protecteur remarquable de l'extrait, et ceci par une diminution très nette des taux d'hémolyse compris entre 9.79 et 38.08% (Figure 3).

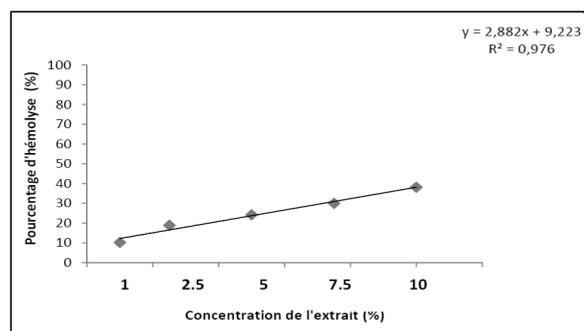


Figure 3. Courbe représentant le taux d'hémolyse en pourcentage en fonction des concentrations de l'extrait aqueux en présence du H_2O_2 .

Evaluation de la peroxydation lipidique

Les résultats du dosage des TBARS montrent une quantité élevée en malondialdéhyde dans l'échantillon traité par le NaCl à 3 g/l égale à 2.032 nmol/ml et une quantité égale à 1.635 nmol/ml à la concentration 5 g/l de NaCl, alors que le témoin présente une valeur de 0.432 nmol/ml (Figure 4 et 5). Nous avons déterminé le taux des MDA par le test des TBARS, leur accumulation est un indicateur des dommages causés par le stress. Nos résultats montrent une augmentation des taux des MDA par rapport aux témoins, cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse.

Etude phytochimique

Notre étude phytochimique par dosages spectrophotométrique a révélé des teneurs en polyphénols et flavonoïdes respectivement de 161,49 mg/ g et 58,59 mg / g d'extrait aqueux lyophilisé (Tableau 1).

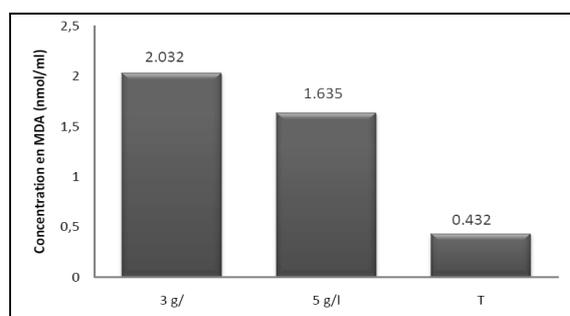


Figure 4. Histogramme représentant la quantité en MDA à différentes concentrations de NaCl.

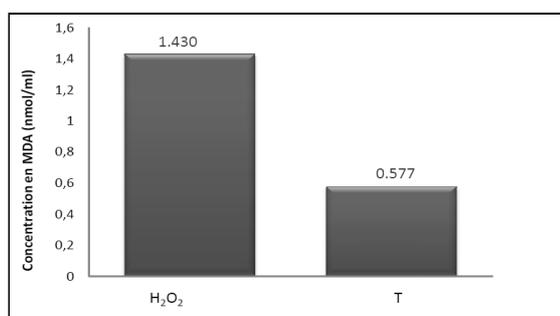


Figure 5. Histogramme représentant la quantité en MDA dans les échantillons traités par H₂O₂.

Tableau 1 : Résultats du dosage de phénols totaux et de flavonoïdes de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Haloxylon scoparium* POMEL.

| Extrait aqueux lyophilisé d' <i>Haloxylon scoparium</i> (Pomel) | Flavonoïdes (mg) / g d'extrait lyophilisé | Polyphénols totaux (mg) / g de poudre lyophilisée |
|---|---|---|
| | 58,59 | 161,49 |

DISCUSSION

Les études de Tracy et Rice (2008) ont montré que la fragilité membranaire des érythrocytes suspendus dans des solutions à osmolarité décroissante se traduit par une lyse cellulaire. D'après Rocha *et al.* (2009) il existe une corrélation entre le taux d'hémoglobine libérée et la fragilité osmotique membranaire. Zhu *et al.* (2001) ont observé que l'oxydation lipidique des membranes cellulaires induit une hémolyse. Nos résultats concordent avec ceux de Rocha *et al.* (2009) et Moreira *et al.* (2011) qui montrent que l'activité hémolytique a été observée à partir d'une concentration de NaCl égale à 5g/l. D'après Margetis *et al.* (2007) suite à un stress oxydatif les cellules réagissent en accumulant les ERO et l'hémoglobine est exposée à la surface cytoplasmique ce qui entraîne une perte de l'élasticité membranaire. Concernant le stress induit par l'H₂O₂, nos résultats concordent avec l'étude faite par Rocha *et al.* (2009) qui montre que l'ajout de H₂O₂ à différentes concentrations à une suspension d'hématies provoque une hémolyse qui est plus prononcée par l'addition de l'azide de sodium. Les résultats de l'étude phytochimique concordent avec une étude faite par Rached *et al.*, 2010 qui a montré que l'extrait lyophilisé aqueux de *Haloxylon scoparium* est riche en polyphénols (163,16 mg / g) et flavonoïdes (38,90 mg / g) présente en effet une activité antioxydante notée suite à une réaction positive au DPPH. Une étude faite par Moreira *et al.* (2011) montre l'effet antioxydant du Propolis au niveau des érythrocytes vis-à-vis à un stress induit par différentes concentrations de NaCl, cet effet est dû à sa richesse en composants phénoliques et flavonoïdes.

En effet, les flavonoïdes préviennent des dommages oxydatifs causés dans les érythrocytes, et cette protection peut être due à la chélation du fer dans la cellule. L'une des cibles biologiques les plus vulnérables lors d'un stress oxydatif est l'endommagement des AGPI, d'où une peroxydation lipidique qui va affecter la perméabilité membranaire (Ferrali *et al.*, 1997 ; Demiral et Turkan, 2005 ; Valko *et al.*, 2006). L'évaluation de la peroxydation lipidique montre une augmentation des taux des MDA par rapport aux témoins, cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse. Nos résultats concordent avec ceux de Rocha *et al.* (2009) qui montrent une augmentation des taux des MDA avec l'augmentation de la concentration de l'agent stressant. En conclusion les substances phénoliques et les flavonoïdes attribuent aux plantes un pouvoir protecteur contre le stress oxydatif. Cependant cet effet protecteur peut être influencé par plusieurs facteurs tels que, les teneurs de ces composés chimiques dans les plantes qui varient essentiellement selon leur origine (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008), la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et la durée de conservation (Ozguven *et al.*, 1998). Le présent travail a porté sur l'étude de l'extrait aqueux lyophilisé préparé à partir des tiges et des feuilles d'*Haloxylon scoparium* (Pomel), nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et son activité antioxydante.

CONCLUSION

La présente étude décrit un moyen simple et rapide d'évaluation du potentiel antioxydant de molécules hydrophiles, en les soumettant à un système oxydant générateur de radicaux libres. L'étude de l'effet anti-lipoperoxydant de l'extrait sur les érythrocytes a montré que la plante possède une activité antioxydante, mais cette capacité est faible pour pouvoir protéger la membrane plasmique des érythrocytes contre les dommages causés par les agents oxydants. L'activité antioxydante retrouvée dans l'extrait d'*Haloxylon scoparium* (Pomel) confère à la plante des vertus thérapeutiques contre certaines pathologies.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier l'équipe du laboratoire de production et valorisation microbienne de l'université de l'USTO.

REFERENCES

- Baker B.J. 1996. Carboline and isoquinoline alkaloids from marine organisms. In: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, edited by W. S. Pelletier, New York: Pergamon. 10: 357-407.
- Benkrief R., Brum-Bousquet M., Tillequin F., Koch M. 1990. Alkaloids and flavonoid from aerial parts of *Hammada articulata* spp *scoparia*. *Les Annales Pharmaceutiques Françaises*. 48: 219-224.
- Demiral T., Turkan I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.
- Ebrahimzadeh M.A., Pourmmodar F., Hafezi S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology*. 32: 43-49.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*. 416: 123-129.
- Iwasa K., Moriyasu M., Tachibana Y., Kim H.S., Wataya Y., Wiegrebe V., Bastow K.F., Cosentino L.M., Kozuka M., Lee K.H. 2001. Simple isoquinoline and benzylisoquinoline alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic and anti-HIV agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 9: 2871-2884.
- Jarraya R., Chaieb M., Damak M. 1993. Screening des plantes à alcaloïdes au sein de la flore Tunisienne. *Plant Medicinal Phytotherapy*. 26: 177-189.
- Jarraya R., Damak M. 2001. Alkaloids extracted from the leaves of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 4: 941-948.
- Jarraya R., Bouaziz A., Hamdi B., Ben Salah A., Damak M. 2008. Methylisosalsoline from *Hammada scoparia*. *Acta Crystallographica*. 64: 1714-1719.
- Kim D.O., Jeong S.W., Lee C.Y. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326.
- Low F.M., Hampton M.B, Peskin A.V., Winterbourn C.C. 2007. Peroxiredoxin 2 function as a noncatalytic scavenger of low level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*. 109: 2611-2617.
- Margetis P., Antonelou M., Karababa F., Loutradi A., Margaritis L., Papassideri I. 2007. Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis-evidence for in vivo oxidation and lipid rafts protein variations. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 38: 210-220.
- Mata A.T., Proenc C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*. 103: 778-786.
- Moreira L.L., Dias T., Dias L.G., Rogao M., Da Silva J.P., Estevinho L.M. 2011. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 520-526.
- Özgüven M., Tansi S. 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 22: 537-542.
- Park H.J., Cha H.C. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean Journal of Biological Society*. 7: 327-330.
- Quintanilha A.T., Packer L., Szyszlo J.M., Racanelly T.L., Davies K.J. 1982. Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 393: 32-37.
- Rached W., Benamar H., Ben naceur M., Marouf A. 2010. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of Biological Sciences*. 10: 316-324.
- Rocha S., Costa E., Coimbra S., Nascimento H., Catarino C., Rocha-Pereira P., Quintanilha A., Belo L., Santos-Silva A. 2009. Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane

- imposed by hydrogen peroxyde-induced oxidative stress. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 43: 68-73.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*. 16: 144-153.
- Tracy E., Rice H. 2008. Partial splenectomy for hereditary spherocytosis. *Pediatric Clinics of North America Hematology*. 55: 503- 519.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interactions*. 160: 1- 40.
- Zhu C., Agar N., Jones G. 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences*. 69: 75-86.