

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abbès Laghroure-Khenchela

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master académique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Etude phytochimique et évaluation de l'activité biologique de l'extrait méthanolique de l'Ephedra alata de la région de khenchela

Présenté par :

BADIS AFAF

KHEMILI NOURA

Soutenu le : 06/07/2019

Membres du jury :

Président : M^{me} BOUAKKAZ Amel

MCB Univ. Khenchela

Promoteur : M^r HABIBATNI Sofiane

MCB Univ. Khenchela

Examineur : M^{me} DJEMIL Randa

MCB Univ. Khenchela

Promotion : 2018/2019

Laboratoire où le travail a été réalisé :

Laboratoire de l'université Abbes Laghroure-Khenchela

CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie) Constantine





Remerciement

*À l'aide de dieu tout puissant , qui nous a aidé a compléter ce modeste
travail*

*Au terme des années de préparation de mémoire de master , nous tenons à
remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribuées à*

l'aboutissement de ce travail :

*Nous remercions également M. Habibatni Sofiane pour la qualité du
sujet , son support et les orientation durant toute la réalisation de ce
mémoire par ses conseils qui nous ont appris la patience.*

*À « Mme Bouakkaz Amel » de bien vouloir présider ce jury et
d'examiner ce travail.*

À « Mme Djemis Randa » d'avoir accepté examiner et juger ce travail

*Nous remercions Dr Bencsuici Chouki de nous avoir accueillie dans
CRBT , pour sa gentillesse et bienveillance .*

Merci a tous les gens qui nous aidés de prés et de loin .



Dédicace

*A mes chers parents ,ma mère Dhrifa et mon père Abderrahmaine
Pour leur patience ,leur amour, leur soutien et leur encouragement
tout au long de ma vie.*

Ma chère sœur :

Noura

A mes frères : Akram , Loay , Mouhamed

*A mon binôme Noura qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce travail et à sa famille*

A mes meilleurs amis :

Ismahane, Wafa, Bochra, Omaira, Karima

A mes collègues de la promotion de master

"Biochimie Appliquée "

*A mon encadreur HABIBATNI SOFIANE qui ma fait
l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction ,pour sa grande
patience,pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

BadisAfaf



Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents ,ma mère Zinab et mon père Brahim

*Pour leur patience ,leur amour,leur soutien et leur
encouragement tout au long de ma vie.*

A mes frères Mourad ,Radhwane et Mohamed.

A mes soeurs Asma et Nadhira .

A toute ma famille KHEMILI de prés ou de loin .

*A mon encadreur HABIBATNI SOFIANE qui ma fait
l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction ,pour sa
grande patience,pour sa disponibilité et ses conseils
judicieux.*

*A mon binôme Afaf qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce travail et à sa famille*

*A mon marie Youcef pour ces encouragements ,sa fidélité
et sa gentillesse*

A la promotion de master 2 biochimie appliquée

A mes amies

Khemili Noura

Résumé:

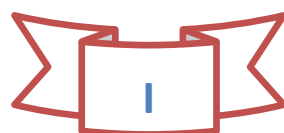
La présente étude s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation d'une plante médicinale de la région de kenchela, *Ephedra alata alenda*, dotée d'une grande importance pharmacologique dans le monde et réputée par sa résistance à la sécheresse.

L'étude phytochimique a montré la présence de divers métabolites secondaires dans les tiges de la plante tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins, les saponosides et les terpènes.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a montré une forte activité l'extrait de la plante contre la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, et une faible activité inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.

L'évaluation du potentiel antioxydant de l'extrait par Trois méthodes différentes : le test de DPPH, le test ABTS et CUPRAC ont révélé une activité anti-radicalaire plus faible par rapport aux autres espèces de ce genre. La teneur des flavonoïdes est importante dans l'extrait méthanolique. Activité anti-inflammatoire de l'extrait est plus importante

Mots clés: *Ephedra alata alenda*, activité antibactérienne, DPPH, ABTS et CUPRAC, Flavonoïdes, anti-inflammatoire.



Abstract:

This study is part of the contribution to the valorization of a medicinal plant of the Khenchela region, *Ephedra alata alenda*, endowed with great pharmacological importance around the world and renowned for its high tolerance to water deficiency.

The phytochemical screening had identified various secondary metabolites in both parts of the plant; alkaloids, polyphenols, tannins (catechin in the aerial part and gallic in the underground part), reducing compounds, saponosides and terpenes. The disk diffusion method in agar medium showed strong activity of plant extracts against the growth of *Staphylococcus aureus*, and low inhibitory activity of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* growth. The aerial part was the most active. The evaluation of the antioxidant potential of extracts by three different methods: DPPH, ABTS and CUPRAC tests, revealed a higher antiradical activity of the plant compared to other species of this genus around the world.

The extract of the branches of the plant showed a large yield for the inflammation compared to the extract of flower,

Keywords: *Ephedra alata alenda*, ethnobotanical survey, antibacterial activity, DPPH, TPC, Positive correlation, (+) pseudoephedrine, alkaloids.



الملخص

تتدرج هذه الدراسة في اطار المساهمة في ثمين نبتة طبية من منطقة خنشلة، *Ephedra alata* , المعروفة بخصائصها الصيدلانية عبر انحاء العالم المشهورة بتحملها لنقص المياه.

الفحص الكيميائي يسمح بتحديد عدة مركبات ثانوية في الجزء الهوائي للنبتة العفص , الصابونين, التريبينات

طريقة الإنتشار على القرص في وسط جيلوزي أظهرت فعالية قوية لمستخلصات النبتة ضد نمو البكتيريا E-coli , Pseudomonas وفعالية ضعيفة ضد نمو بيكتيريا Staphylococcus , Listéria , الغصن هو الأكثر فعالية ضد نمو البيكتيريا.

تقييم الإمكانية المضادة للأكسدة بطرق مختلفة, إختبار Dpph و ABTS و CUPREC اظهر نشاط مضاد للاغصان الحرة للنبتة مقارنة بانواع اخري حول العالم .

اظهر مستخلص الاغصان الخاصة بنبتة , *Ephedra alata alenda* ومردود كبير بالنسبة لنشاط ضد الالتهاب مقارنة بمستخلص الازهار لنفس النبتة

الكلمات المفتاحية ABTS , Dpph , CUPREC , *Ephedra alata alenda* , نشاط الإلتهاب , نشاط مضاد للبيكتيريا , مضاد الأكسدة , فحص كيميائي



Abréviation

ABTS	Acide 2-2azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline -6-sulphonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non Stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
BHA	Hydroxyanisol butylé
BHT	ButylHydroxytoluène
CH ₃ COOK	Acétate de potassium
Cm	Centimètres
DPPH	Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ERN	Espèce réactive de nitrogène
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FeCl ₃	Chlorure de fer
GC	Glucocorticoïdes
HCL	Acide chlohydrique
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
MeOH	Méthanol
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
nm	Nanomètre
R	Rendement
RL	Radical libre
Uv	Ultra violet

Liste des figures

Figure 01	<i>Ephedra Alata</i>	4
Figure 02	Tiges et Fleurs D' <i>Ephedra Alata</i>	5
Figure 03	Répartition géographique de l' <i>Ephedra</i> dans le monde	5
Figure 04	Carte géographique de Khenchela	6
Figure 05	Structure chimique de l' α -terpinéol	7
Figure 06	Structure chimique de linalool	7
Figure07	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	11
Figure 08	Structure chimique de tyrosol et hydroxytyrosol	11
Figure 09	La formule des alcaloïdes	13
Figure 10	Quelques exemples des alcaloïdes	14
Figure 11	Structure chimique des flavonoïdes	16
Figure 12	Classification des flavonoïdes	17
Figure 13	Effet des radicaux libres sur la membrane cellulaire	20
Figure 14	Représentation schématique des divers activateurs et inhibiteurs de production d'espèces réactives de l'oxygène	22
Figure 15	Systèmes Antioxydants D'enzyme	23
Figure16	Modèle de la balance d'équilibre de stress oxydatif	25
Figure17	L'oxydation des protéines après attaque radicalaire	26
Figure18	Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN	27
Figure19	Mécanisme de peroxydation lipidique	27
Figure20	L'inflammation et le système immunitaire	28
Figure21	Principales étapes de l'inflammation aiguë	29
Figure22	Initiation de l'inflammation	30
Figure23	La phase cellulaire	31
Figure24	Phase de réparation et résolution	31

Figure25	Carte géographique représente la localisation d'obtention de plante Ephédra Alata (Chechar - khenchela).	36
Figure26	Les tiges sèches	37
Figure27	Tiges sèches broyées	37
Figure28	Protocole de macération	39
Figure29	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH'entre l'espèce radicalaire DPPH' et un antioxydant (AH).	43
Figure30	Protocole de l'activité antibactérienne de l'éphédra alata	49
Figure31	Protocole de l'activité anti-inflammatoire d'extrait méthanolique (Tiges).	52
Figure32	Histogramme présente les rendements hydroalcooliques	54
Figure33	Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml.	57
Figure34	Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/mg).	57
Figure35	Histogramme CI ₅₀ des extraits et des standards	59
Figure36	Histogramme de CI ₅₀ des extraits des standards	60
Figure37	Histogramme A0.50 des extraits et des standards	61
Figure38	Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de <i>Escherichia coli</i>	62
Figure39	Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Figure40	Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de <i>Listeria monocytogenes</i>	63
Figure41	Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Figure42	Les résultats de l'activité antibactérienne	64
Figure43	Histogramme de % inhibition de la dénaturation des protéines pour les deux extraits et diclofenac(250µg/ml).	66

Liste des tableaux

Tableau 01	Nom vernaculaires de la plante	3
Tableau 02	Position systématique du Sous espèce <i>Ephedra Alata</i>	4
Tableau 03	Principaux alcaloïdes isolés du genre <i>Ephedra</i> autres que l'éphédrine	15
Tableau 04	Les espèces réactives de l'oxygène	21
Tableau 05	Les systèmes de défense antioxydant	24
Tableau 06	Plantes à activité anti-inflammatoires	33
Tableau 07	Le volume total de chaque macération	38
Tableau 08	Les souches bactériennes utilisées.	46
Tableau 09	Le rendement de l'extrait méthanolique des tiges d' <i>Ephedra alata</i>	53
Tableau 10	Résultats des tests photochimiques de l'extrait Méthanoliques	55
Tableau11	L'activité anti-radicalaire des extraits parle test DPPH.	58
Tableau 12	L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits parle test ABTS	59
Tableau 13	L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits parle test CUPRAC	60
Tableau 14	Zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extraisméthanolique, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur milieu MH (mm).	61
Tableau 15	Les résultats de l'activité anti-inflammatoire	65

Table des Matières

Résumé	I
Abstract	II
المخلص	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VII
Table des Matières	VII
Introduction	1
Chapitre I : Aperçu sur la plante Ephédra Alata	
I- Généralités sur la plante	3
I-1-Genre <i>Ephédra</i>	3
I-2-Noms vernaculaires de la plante	3
I-3- Position systématique du Sous espèce <i>Ephedra Alata</i>	4
I- 4-Description botanique de l'espèce <i>Ephédra Alata</i>	4
I-5-Répartition géographique	5
I- 6-Composition Chimique de la plante	6
I-7-Usages traditionnels de la plante	8
II- Activités biologiques de la plante (Travaux antérieurs)	8
Chapitre II : Les métabolites secondaires	
I -Généralité	10
I -1-Les métabolites primaires	10
I-2-Les métabolites secondaires	10
I-2-1-Les polyphénols	10
I-2-1-1-Polyphénols simples	11
I-2-1-2-Polyphénols complexes	11
I-2-1-3-Activités biologiques des polyphénols	12
I-2-2-Les Tanins	12
I-2-2-2-Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins	12
I-2-2-3- Les tanins des espèces de <i>L'ephedra</i>	13
I-2-3-Les Alcaloïdes	13
I-2-3-1- Les propriétés des alcaloïdes	14
I-2-3-2- Les alcaloïdes des espèces de <i>L'ephedra</i>	14
I-2-4- Les flavonoïdes	16
I-2-4-1-Définition	16
I-2-4-2-Structure chimique des flavonoïdes	16
I-2-4-3- Rôle biologique	18

I-2-4-4- Les flavonoïdes des espèces de l' <i>Ephedra</i>	18
I-2-5-Les saponosides	18
I-2-5-2-Propriétés biologiques des saponosides	19
Chapitre III : Les activités biologiques	
I- Activité antioxydante	20
I-1-Radicaux libres	20
I-1-1-Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	20
I-1-2-Défense antioxydant	21
I-2-Les antioxydants	22
I-2-1-Les antioxydants non enzymatiques	23
I-2-2-Les antioxydants enzymatiques	23
I-3-Stress oxydatif	24
I-3-1-Définition et origine	24
I-3-2 –Les cibles potentielles des ERO	25
II- l'activité anti-inflammatoire	28
II-1-Inflammation aiguë	28
II-1-1- Phase vasculaire (initiation)	29
II-1-2- Phase cellulaire (amplification)	30
II-1-3-Phase de résolution et la réparation	31
II-2-Inflammation chronique	32
III- Les anti-inflammatoires	32
III-1-Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	32
III-2-Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)	32
IV- Activité antibactérienne	33
IV-1-Antibiotiques	34
IV-2- Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne	34
IV-2-1- Antibiogramme	34
IV-3 - Description des bactéries étudiées	35
IV-3-1- Escherichia coli (Gram -)	35
IV-3-2 –Pseudomonas aeruginosa (Gram -)	35
IV-3-3- <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	35
IV-3-4-Listeria (Gram +)	35
Partie Expérimentale	
Chapitre I : Matériel et méthodes	
I-Matériel végétale	36
I-1- la Récolte	36
I-2-Séchage	37
I-3-Broyage	37
II- Méthode d'extraction solide / liquide	37
II-1- Macération	37
II-1-1-Matériels et produits	38
II-1-2-Mode opératoire	38
III- Le Rendement	40
IV- Analyse qualitative des extraits de plante	40
IV-1-Screening phytochimique	40
IV-1 -1-Matériels et produits	40

IV-1-1-Mode opératoire	41
V-Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)	42
V-1- Principe de la réaction	42
V-2- Procédure	42
V-3-Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin	43
VI-Activités biologiques	43
VI -1- Activité antioxydante	43
VI -1-1- Test du DPPH radical libre	43
VI-1-2- Test du ABTSscavengingactivity	44
VI-1-3- Test du CUPRAC (CupricReducingAntioxidantCapacity)	45
VI -2- L'activité antibactérienne	46
VI-2-1-Les souches testées	46
VI-2-2-Matériels et produits	46
VI-2-3-Mode opératoire	46
VI-3-L'activité anti inflammatoire	50
VI-3-1-Matériels et produits	50
VI-3-2-Mode opératoire	50
Chapitre II : Résultats et Discussion	
I-Rendement de l'extrait	53
II-Screening phytochimique	54
III-Dosage des flavonoïdes	58
IV- L'activité antioxydante	60
IV-1-Pouvoir de piégeage du radical libre DPPH.	60
IV-2-Test du ABTS scavenging activité	61
IV-3-Test du CUPRAC (CupricReducingAntioxidantCapacity)	62
V-L'activité antibactérien	63
VI- Activitié anti-inflammatoire	65
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	69
Annexe	



Introduction



Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales **(Kebili, 2016)**

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. **(Barnes, 1998)**

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes .et la flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, demeure très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique **(Boulberhane et Nabti, 2017)**.

Les métabolites secondaires sont aussi très exploités par l'homme dans les différents domaines à savoir dans le domaine culinaires comme colorants et arômes, dans le domaine agricole comme herbicides et dans le domaine médicinal comme antibiotiques, antioxydant, drogues.....etc **(Elbidi ,2016)**

Les membres de la famille des Ephedraceae, représentés par un seul genre «Ephedra», sont connus pour leurs nombreux usages en médecine traditionnelle dans le monde. Ephedra alata alenda récoltée dans la région de **Khenchela**, valorisation l'une de ces sous espèces Ephedra .

Notre étude est échelonnée à travers le mémoire sur trois parties:

- ❖ La première partie, est composée de 3 chapitre , une synthèse bibliographique sur les aspects botaniques et phytochimique de la plante. Des généralités, sur les activités antibactérienne et antioxydante, ainsi que les métabolites secondaire : les alcaloïdes et les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes y sont aussi développées et l'intérêts pharmacologique de la plante.
- ❖ La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes.

- ❖ Enfin, la troisième partie est consacrée aux résultats et discussions avec quelque perspectives



Partie Bibliographique



I- Généralités sur la plante

I-1-Genre *Ephédra*

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephédra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009) est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se termine par une pointe souvent acérée. Au niveau des nœuds, qui sont écartés de 4 à 6 cm, les feuilles réduites en écailles apparaissent triangulaires qui se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuille. De petites fleurs apparaissent en été (Limberger *et al.*, 2013).

L'origine de l'*Ephédra* a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (environ 200 millions d'années passant dans le Trias moyen) (Huang et Price, 2003).

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtes secs de montagnes (Limberger *et al.*, 2013).

I-2-Noms vernaculaires de la plante

Tableau 01 : Nom vernaculaires de la plante (Limberger *et al.*, 2013).

Nom anglais	<i>Ephédra</i>
Nom français	<i>Ephédra</i> raisin de mer
Nom en arabe	Alenda
Nom local Algérie	Alenda, Azrem, Arzoum ,, Antalth, Arsaste , Dhaneb El Khayl ,

I-3- Position systématique du Sous espèce *Ephedra Alata*Tableau 02: Position systématique du Sous espèce *Ephedra Alata*(Ozenda, 1991).

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Gnetopsida
Ordre	Ephedrales
Famille	Ephedraceae
Genre	Ephedra
Espèce	<i>Ephedra Alata</i>
Sous espèce	<i>Ephedra Alata alenda</i>

I- 4-Description botanique de l'espèce *Ephédra Alata*

L'*éphédra* est un arbuste de 50 cm à 1 mètre de hauteur. Les tiges fortes, fines, cylindriques et ramifiées confèrent un aspect touffu, vert glauque. Elles supportent des feuilles opposées, longues, brunes, mortes et membraneuses sur les pieds âgés. C'est un arbrisseau trapu et dioïque (il y a des mâles et des femelles) (Evans, 2009)

A chaque ramification, il présente une gaine (feuille modifiée) de forme allongée et bilobée. Les fleurs sont de couleur jaune et les fruits rouges sont des akènes (un fruit à graine unique) qui ressemblent à des baies ou à des grains de raisins (Derbel *et al.*, 2010).

Figure 01 : *Ephedra Alata* (Anonyme A)

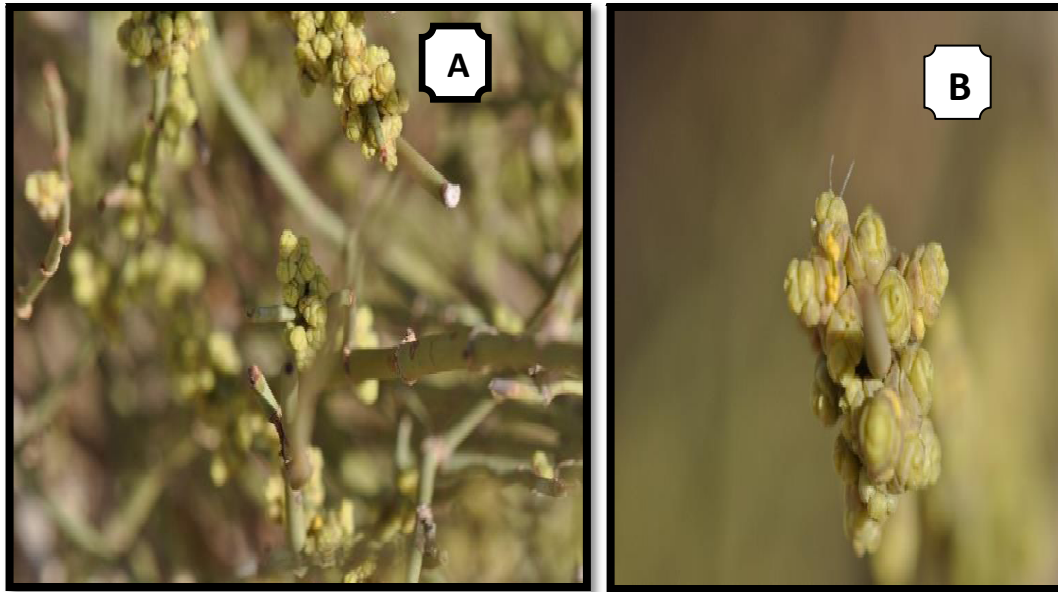
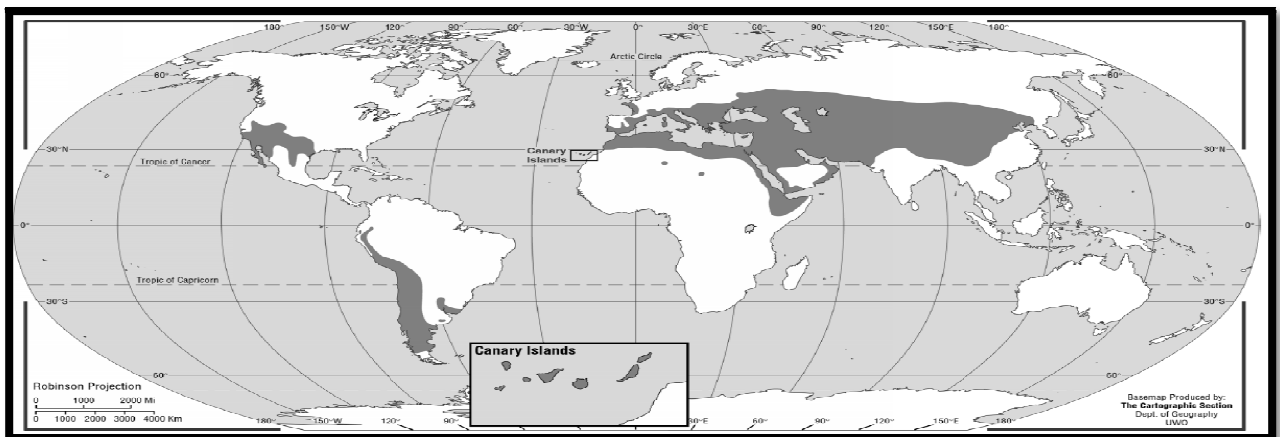


Figure 02:(A) Tiges et (B)Fleurs(*Ephedra Alata*)(Anonyme A)

I-5-Répartition géographique

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes, (Limberger *et al.*, 2013) et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Hegazi et El-Lamey, 2011).



Site de répartition des espèces de genre *Ephedra*

Figure 03 :Répartition géographique de l'*Ephedra* dans le monde (Caveney *et al.*, 2001).

L'espèce *Ephedra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie (Ozenda, 1991).

En Algérie, *Ephedra alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).

Dans la région de Khenchela, l'éphédra est une plante vivace qui grandit dans les collines de montagne et terres non agricoles et sur les banques des vallées sèches dans Chechar (Tabergda, Siair, Djalal, Chehada, khirane, Désert El mamcha, Henchir ...).



Figure 04: Carte géographique de Khenchela (Anonyme A).

I- 6-Composition Chimique de la plante

Les espèces de l'*Ephedra* constituent une source naturelle de nombreux phytoconstituants à savoir : les huiles essentielles, les alcaloïdes, les tanins, les saponines, les proanthocyanidines, les acides phénoliques, et les flavonoïdes qui sont : la vicénine II, la lucénine III, lekaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3- rhamnoside et l'herbacétine 7-O-glucoside (Hegazi et El-Lamey, 2011 ; kebili 2016).

Les propriétés biologiques traditionnelles sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine tels que : la (-) éphédrine et l'(+), pseudoéphédrine, ils

représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes surtout dans la plante séchée (Caveney *et al.*, 2001; Soni *et al.*, 2004; Phinney *et al.*, 2005). Ces deux substances stimulent le système nerveux central. L'éphédrine est une substance proche de l'adrénaline, aux effets moins puissants mais dont la durée d'action est bien plus durable (Aouadhi, 2010).

Plus de 50 espèces d'éphédra sont originaires de deux hémisphères, mais la détection des alcaloïdes de la série de l'éphédrine a été limitée à des espèces en Eurasie dont l'*Ephedrasinica* est la principale source, tandis que les espèces américaines telle que *E. nevadensis* connue comme Mormon ou le thé de désert sont considérées comme dépourvues de ces métabolites (Abourashed *et al.*, 2003; Limberger *et al.*, 2013).

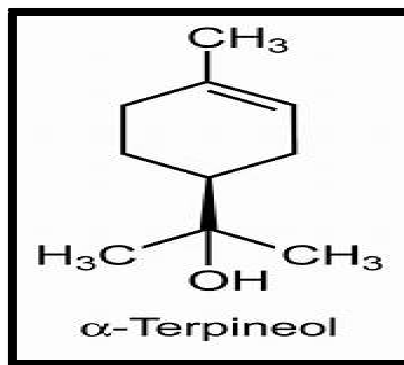


Figure 05 : Structure chimique de l' α -terpinéol (Aouadhi, 2010).

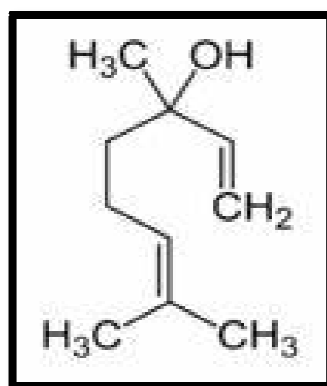


Figure 06 : Structure chimique de linalool (Aouadhi, 2010).

I-7-Usages traditionnels de la plante

En Algérie, *E.alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes. Au Maroc, elle est utilisée pour lutter contre le diabète. Ainsi, les tiges broyées d'*Ephedra alata* et cuites dans du beurre, seraient ingérées par les femmes du Sahara pour avorter (**Ould El Hadj et al., 2003 ; Ghourri et al., 2013**).

En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**).

En Asie, elle est utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (**Caveney et al., 2001**).

Une étude réalisée par **Boozer et al., 2001** a montré qu'un mélange d'*Ephedra* et de *guarana* favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids.

L'extrait alcoolique de *E.alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun (**Shabana et al., 1990**).

Les espèces *Ephedra* ont aussi des effets néfastes (**Ma et al., 2007**). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une bronchodilatation, une agitation et une mydriase.

I-8 -Toxicologie

Les espèces de *Ephedra* ont des effets bénéfiques et néfastes (**Ma et al., 2007**). Cliniquement, il peut en résulter une hypertension, une hypersudation, une broncho dilatation, une agitation et une mydriase. L'utilisation de *Ephedra* est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques (**Peters et al., 2005**). Ces effets peuvent être les raisons pour lesquelles l'utilisation de *Ephedra* est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiqué pour une utilisation à long terme (**Chen et al., 2010**).

II- Activités biologiques de la plante

❖ Activité antimicrobienne

Des études ont montré qu'*Ephedra alata* possède une activité antivirale élevée contre le HSV (Herpes simplex virus) (**Mohamed Soltan et Kamal Zaki, 2009**).

L'extrait aqueux de *E. alata* égyptienne présente un potentiel d'inhibition significatif in vitro et in vivo contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* (Al-Qarawiet *et al.*, 2011).

Ghanem et El-Magly (2008) ont montré que l'extrait acétonitrile de l'*E. alata* de l'Égypte présente simultanément, une forte activité contre des bactéries à GRAM⁺ et à GRAM⁻ ainsi que des champignons et levures. L'*E. alata* de la région de Ouargla testée par (Kessal et Bouafia 2003 ; Chebouat *et al.*, 2014) s'est révélée avoir des activités plus ou moins importantes sur la croissance de bactéries à GRAM positif et à GRAM négatif selon la souche ciblée.

❖ Effet anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de l'*E. sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aiguë (Ling *et al.*, 1995). Par ailleurs, il a suggéré que la pseudoéphédrine est le principe actif responsable de l'activité anti-inflammatoire montrée par l'*E. intermedia* (Hikino *et al.* 1980). D'autres ont rapporté que la partie aérienne des espèces d'*Ephedra* contient de l'éphédroxane qui s'est révélée également posséder une activité anti-inflammatoire. (Konno *et al.* 1979).

I- Généralité

Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux ou d'animaux. On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires (Hartmann. 2007).

I-1-Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont essentiels pour la survie de la cellule ou de l'organisme, notamment les glucides qui représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose), les lipides qui constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires et enfin, les amino-acides qui constituent une source primaire de construction des protéines (Diallo. 2000).

I-2-Les métabolites secondaires

Chaque espèce végétale produit des métabolites secondaires, qui possèdent des structures très complexes et sont classés en plusieurs grands groupes. Parmi ces substances on trouve, les alcaloïdes (composés azotés), des composés phénoliques (les flavonoïdes, les tanins, les saponosides) et les huiles essentielles qui possèdent un intérêt dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mundaf. 2010).

I-2-1-Les polyphénols

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils englobent plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques (Bruneton. 1999 ; Zerargui. 2015).

La structure chimique est commune pour tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés, ils sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et les éléments qui les relient. Ces molécules présentent toutes un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbones (phénol) lui-même porteurs de fonctions hydroxyles (OH) (Zerargui. 2015).

On distingue les phénols simples, parmi eux les acides phénoliques, les flavonoïdes, les phénols complexes comme les tanins, lignanes (Boros et al., 2010).

I-2-1-1-Polyphénols simples

❖ Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (**Achat. 2013**).

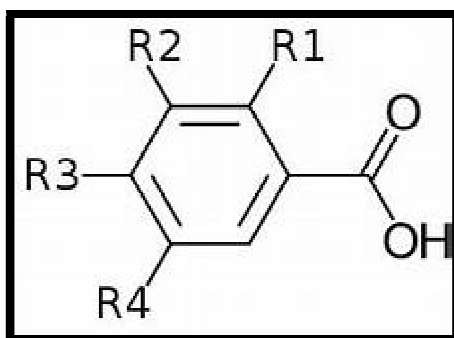


Figure 07 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (**Zerargui. 2015**).

❖ Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe (**Boros et al., 2010**).

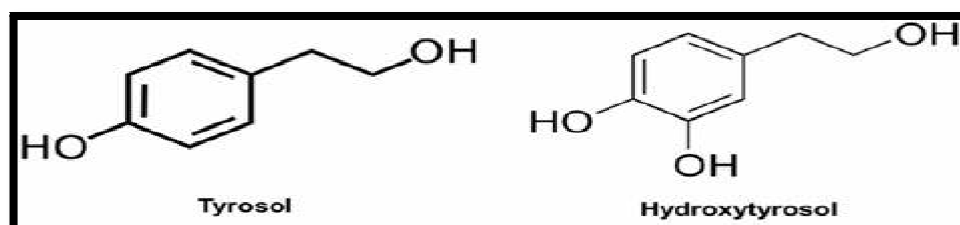


Figure 08 : Structure chimique de tyrosol et hydroxytyrosol (**Boros et al., 2010**).

❖ Les stilbènes

Ce sont des composés ayant comme structure de base le 1,2-diphényléthylène ($C_6-C_2-C_6$) dont quelques représentants sont: le pinosylvine et l'hydrangénol (**Kebbab. 2014**).

I-2-1-2-Polyphénols complexes

❖ Les lignanes et les lignines

Les monolignols (dérivés de l'acide cinnamique) servent de précurseurs pour les composés de type phénylpropanoïde tels que les lignanes et les lignines.

Les lignanes ont une structure de type (C_6C_3), ils sont constitués de deux unités propylbenzène (C_6C_3).

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et se forment par polymérisation oxydative de trois monolignols qui sont les alcools *p*-coumariques, coniferiques et sinapiques (Sakagami et al., 2005).

I-2-1-3-Activités biologiques des polyphénols

Chez les plantes, les polyphénols ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils protègent la plante contre les radiations UV et participent à deux principaux processus : la photosynthèse et la respiration. Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire pour éloigner les prédateurs (Merghem, 2009 ; Bouguendoura, 2011 ; Khelfallah, 2013).

Chez l'homme les composés phénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils ont été décrits comme neuroprotecteurs, antiviral, antioxydants, antiagrégants plaquettaires, anti-inflammatoires, anti-allergènes, anti thrombotiques et des antitumoraux (Crozier et al., 2010).

I-2-2-Les Tanins

Ils sont d'origine végétale et non azotée. Ce sont des composés polyphénoliques hydrosoluble, de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes (Kamra et al., 2006). Ces substances ont en effet de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. (Khenaka,2011 ; Haslam, 1998). La masse moléculaire des tanins est comprise entre 500 et 3000 (PM) (Ghestem et al., 2001 ; Atefeibu, 2002).

I-2-2-2-Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins

- Les tannins sont utilisés principalement en tant qu'anti- inflammatoire, digestif, diurétique et dans le traitement de l'hypertension artérielle (Chung et al., 1998).
- Ces composés ont des propriétés antioxydants.

Leurs propriétés astringentes expliquent les effets observés (Merghem. 2009) :

-Par voie interne : anti diarrhéique et antiseptiques.

-Par voie externe : imperméabilisation de la peau.

I-2-2-3- Les tanins des espèces de *L'ephedra*

Les tanins, principalement les proanthocyanidines, ont été caractérisés par des réactions colorimétriques. Ces composés sont produits en grande quantité dans les tiges de nombreuses espèces *Ephedra* appartenant aux deux continents, eurasiens (tels que : *E.*

intermedia, *E. przewalskii*, *E. alata*, *E. distachya* et *E. fragilis*) et américains tels que *E. californica*, *E. nevadensis* et *E. torreyana* (Zang et al., 2013). Ces molécules contribuent au goût astringent de l'*Ephedra* (Soni et al., 2004).

I-2-3-Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels généralement alcalins. On trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes (Judd et al, 2002). Ils possèdent une structure chimique basique, azotée, généralement hétérocyclique sauf quelques substances dans lesquelles l'azote est extracyclique (c'est le cas de la éphédrine par exemple). Les alcaloïdes ont souvent une forte activité biologique, toxique ou thérapeutique et les plus souvent cités sont notamment : la colchicine, la cocaïne, la morphine, la quinine, l'atropine et la caféine (Bruneton, 1999; Boughrara, 2016).

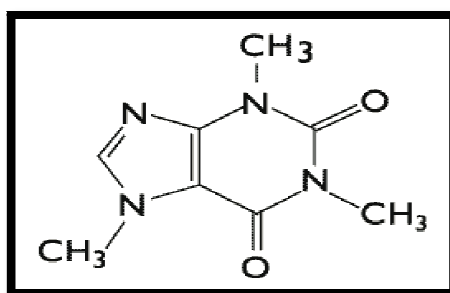


Figure 09: La formule des alcaloïdes (Wilhelm, 1998)

I-2-3-1- Les propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont utilisés dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétylcholine, norepinephrine, acide aminobutyrique, dopamine et la sérotonine. D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (résérpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) (Ferrari et al., 2013).

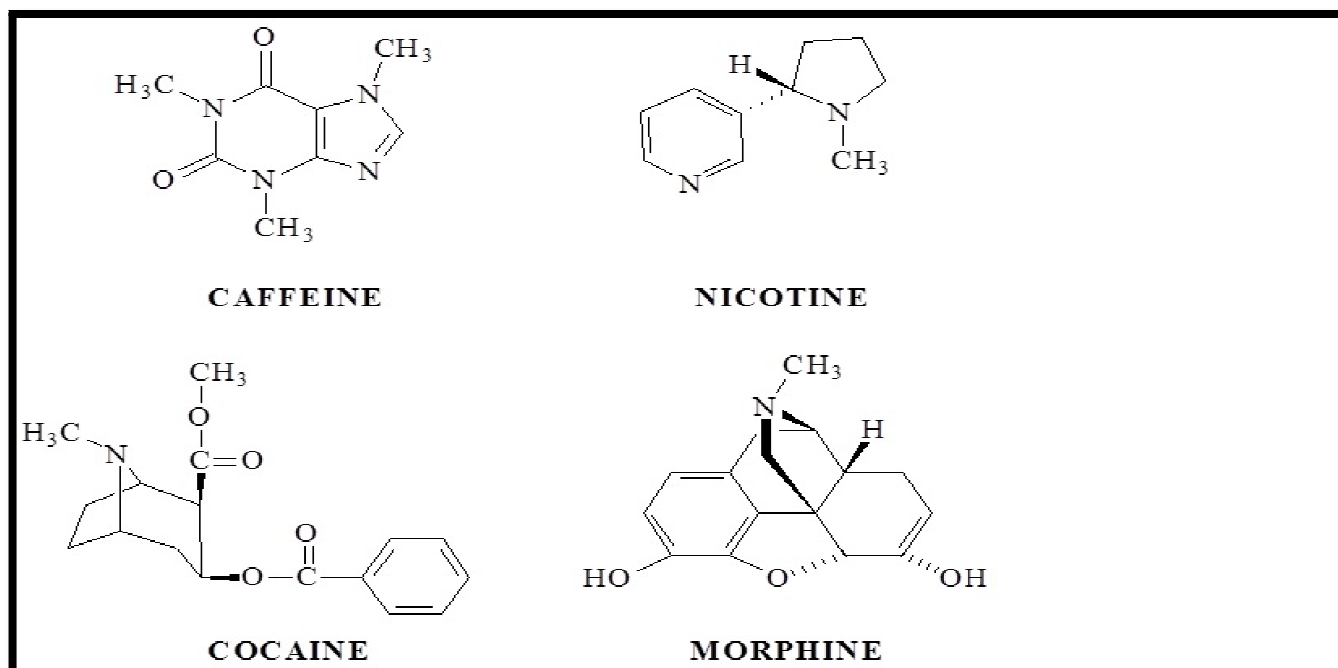
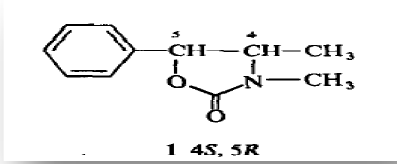
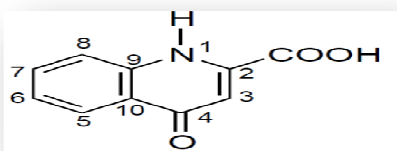
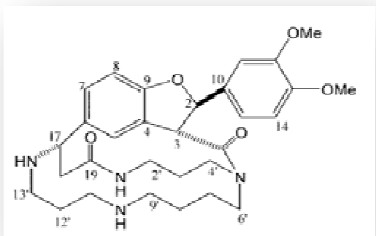
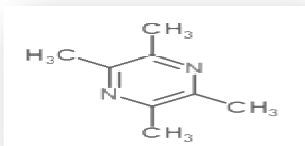


Figure 10: Quelques exemples des alcaloïdes (Ferrari *et al.*, 2013).

I-2-3-2- Les alcaloïdes des espèces de *L'ephedra*

Les propriétés biologiques traditionnelles de *l'ephedra* sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine tel que : la (-) éphédrine et l'(+) pseudoéphédrine , ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes surtout dans la plante séchée (**Phinney *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2004; Caveney *et al.*, 2001**). Ces deux substances stimulent le système nerveux central. L'éphédrine est une substance proche de l'adrénaline, aux effets moins puissants mais dont la durée d'action est bien plus long (Aouadhi, 2010).

Tableau 03: Principaux alcaloïdes isolés du genre *Ephedra* autres que l'éphédrine (kebili, 2016).

Alcaloïde	Structure chimique	Source	Référence
Ephedroxane		<i>Ephedra</i>	Konno <i>et al.</i> , 1979
Transtorine		<i>Ephedra transitoria</i>	Al-Khalil <i>et al.</i> , 1998
Ephedralone	même structure précédente avec O-CH ₃ en C7	<i>Ephedra alata</i>	Nawwar <i>et al.</i> , 1985
Ephedradines		<i>Ephedra aphylla</i>	Abdel-Kader <i>et al.</i> , 2003
Tétraméthylpyrazine		<i>Ephedra sinica</i>	Ling <i>et al.</i> , 1995

I-2-4- Les flavonoïdes:

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly-phénols (**Bouakaz, 2006**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havasteen. 2002**).

I-2-4-1-Structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (**Emerenciano *et al*, 2007**) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (**Narayana, 2001; Malešev et Kuntić, 2007**).

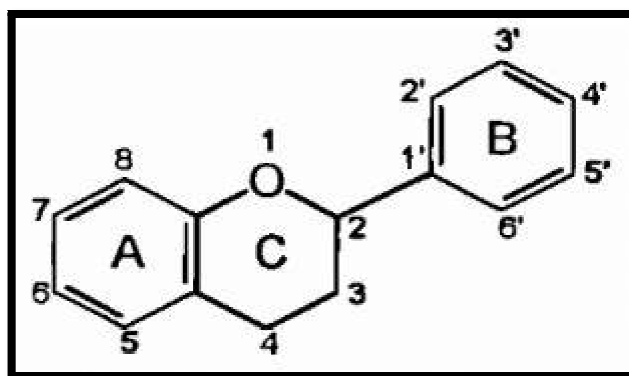


Figure 11 : Structure chimique des flavonoïdes (**Belloum, 2007**).

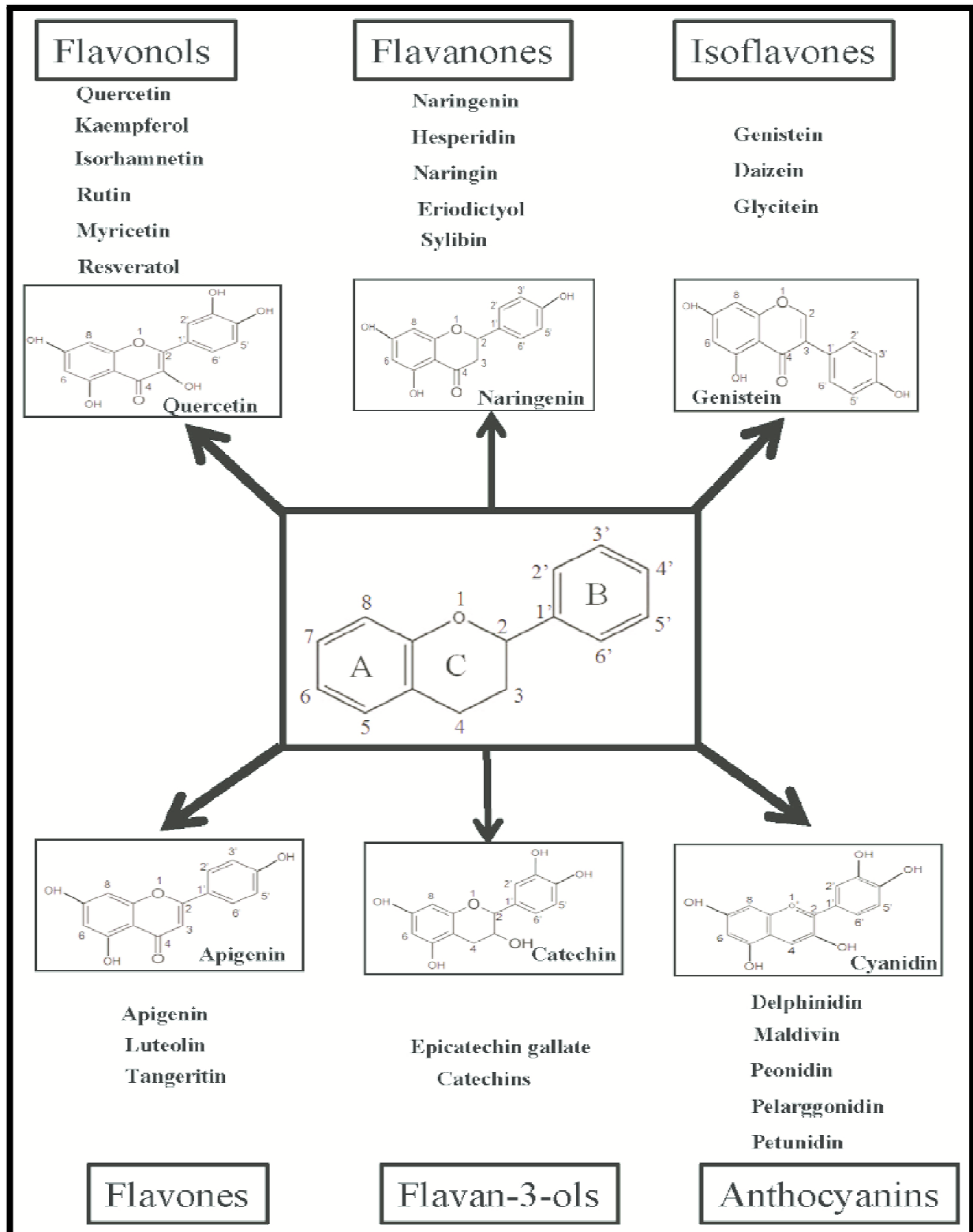


Figure 12 : Classification des flavonoïdes (Bouakaz, 2006).

I-2-4-2- Rôle biologique

Certains flavonoïdes ont des propriétés fongiques et insecticides qui protègent la plante contre l'attaque des champignons et des insectes.

Au niveau des feuilles et fleurs, les flavonoïdes ont un rôle attractif pour les abeilles ou répulsif sur les insectes herbivores entraînant ou non la consommation de feuillage.

Les flavonoïdes constituent une part non négligeable des phytoconstituants, de nombreuses plantes médicinales ayant une grande importance en phytothérapie actuelle. Les principes actifs sont divisés en nombreux sous-groupes: flavanes, flavanols, flavanones, flavones, catéchines ... (Merghem, 2009).

I-2-4-3- Les flavonoïdes des espèces de l'*Ephedra*

Les flavonoïdes des espèces de l'*Ephedra* comprennent principalement, flavonol-3-O-glycosides et proanthocyanidines (Nawwar *et al.*, 1984). Le flavonoïde glycosylé, herbacetin 7-O-neohesperidoside ainsi que plusieurs autres flavonoïdes tels que le symplocoside, la pollenitine B, le kaempferol 3-O-rhamnoside 7-O-glucoside et l'isovitexine 2-O-rhamnoside ont été identifiés à partir de l'extrait de l'espèce *Ephedra sinica* par Amakura *et al.* (2013). L'herbacetine 8-méthyl ether 3-O-glucoside-7-O-rutinoside, l'herbacetine 7-O-(6''-quinynglucoside), la vicénine II, la lucénine III, le kaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3-rhamnoside et l'herbacetine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés et identifiés de l'*Ephedra alata* (la plante entière). Aussi, l'herbacetine 7-O-glucoside a été rapporté dans l'espèce *E. lomatolepis* et l'herbacetine 8 méthyl ether 3-O-glucoside de *E. equisetina* (Nawwar *et al.*, 1984).

I-2-5- Les saponosides

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique).

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immuno-adjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille, 2000).

I-2-5-1-Propriétés biologiques des saponosides

Les saponosides ont une activité expectorante, ils rendent un peu moussant la muqueuse des bronches inflammatoires. De plus, ils sont de puissants hémolytiques, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire **(Bruneton, 1999)**.

D'autre part, les travaux de **(Ghedira, 2005)** ont mis en évidence l'activité antifongique de saponoside triterpénique extrait du lierre sur les levures et les dermatophytes.

I- Activité antioxydante

Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels et même pour le grand public.

L'activité antioxydante des composés phytochimiques attire l'attention de plusieurs chercheurs de fait de leur rôle important notamment dans la prévention de certaines maladies et de la conservation des aliments (Tili, 2015).

I-1-Radicaux libres

Les radicaux libres sont présents dans notre corps et sont générés par des processus physiologiques normaux y compris le métabolisme aérobie et des réponses inflammatoires pour éliminer les microorganismes pathogènes envahisseurs. Les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réappairer, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules. (Govindarajan et al., 2013) pouvant également causer des dommages cellulaires (Hussain et al., 2003).

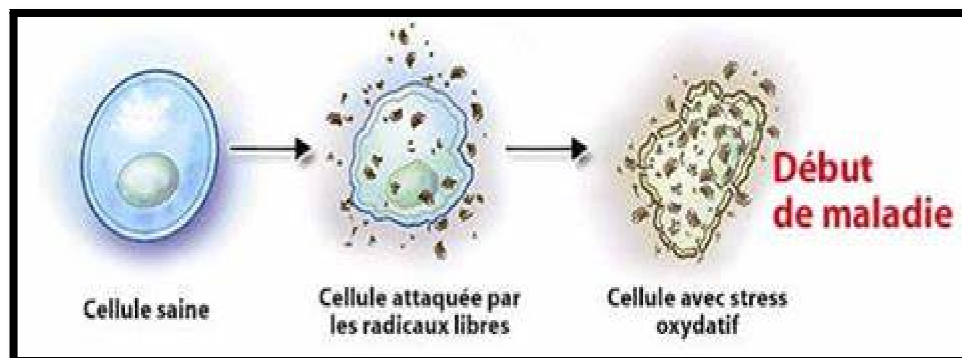


Figure 13 : Effet des radicaux libres sur la membrane cellulaire (Penna et al., 2009).

Les radicaux libres qui proviennent de l'oxygène sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Alors, que ceux qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont appelés espèces réactives de l'azote (ERN) (Penna et al., 2009).

I.1-1-Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène peut être source de vie pour les organismes aérobies. mais également une source d'agression pour ces organismes. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations

ionisantes et de métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles nommée Espèces réactives de l'oxygène qui sont: l'oxygène singulier O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , Radical hydroxyle (OH^\bullet) et anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Seifried, 2007).

Tableau 04: Les espèces réactives de l'oxygène (Seifried, 2007)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$)	-C'est un radical relativement issu de la réduction mono-électronique (addition d'un seul électron). selon la réaction : $O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet-}$. -Participe à l'inactivation des virus et bactéries
Radical hydroxyle (OH^\bullet)	Il est formé à partir de ($O_2^{\bullet-}$) et (H_2O_2) en présence d'ions ferriques selon : -Réaction d'Haber weiss : $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH^\bullet + OH^- + O_2$ -Réaction de fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} + OH^- \rightarrow OH^\bullet + Fe^{3+} + H_2O$ -provoqué des lésions oxydatives sur L'ADN, les protéines et les lipides.
Oxygène singulet (O_2^1)	C'est la forme excitée de l'oxygène moléculaire ou $O_2^{\bullet-}$, obtenu par appariement des deux électrons célibataire de l' O_2 . Selon la réaction: $O^{\bullet} + O^{\bullet} \rightarrow O_2^1$ -Il peut sous l'action des UV d'oxyder de nombreuses molécules.
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	-Le H_2O_2 est toxique pour la cellule, formé par dismutation, soit spontanée ou suit à l'action de l'enzyme de superoxydedismutase, selon la réaction : $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

I-1-2-Défense antioxydant

Les espèces réactives de l'oxygène à l'origine de la perturbation de l'homéostasie cellulaire peuvent être produites à la fois par des sources endogènes à travers le cytochrome P450 des mitochondries, les peroxysomes et les cellules inflammatoires, et par des sources exogènes telque le rayonnement, l'ozone, l'hyperoxie et les xénobiotiques. Les mécanismes de défense contre la toxicité des espèces réactives de l'oxygène sont nombreux (Govindarajan et al., 2005) et proviennent de diverses sources:

- La première source est endogène et est composée de protéines enzymatiques. Nous avons le complexe enzymatique superoxydedismutase, la catalase et le glutathion

peroxydase qui jouent un rôle indispensable dans cette défense (**Matés and Sánchez-Jiménez, 1999**).

- La seconde source, très importante, est l'alimentation et la médecine à travers lesquelles des petites molécules sont consommées. Ce sont les vitamines, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones et les alcaloïdes. Les parties les plus actives de ces molécules sont les hydroxyles libres, les noyaux aromatiques, les doubles liaisons éthyléniques souvent conjuguées, qui permettent de donner des électrons et de rester stables par mérorisation (**Heim et al., 2002**).

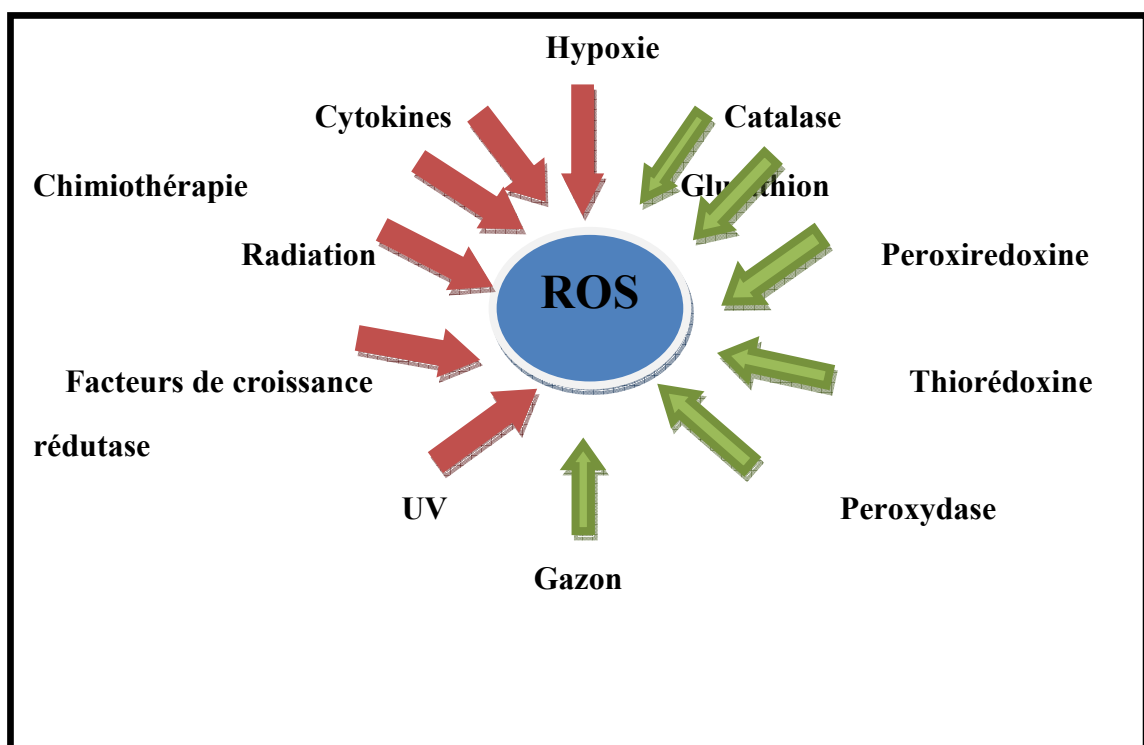


Figure 14 : Représentation schématique des divers activateurs et inhibiteurs de production d'espèces réactives de l'oxygène (**Reuter et al., 2010**).

I-2-Les antioxydants

Une molécule antioxydante est toute substance présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, qui est capable de retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO (**Vansant . 2004 ; Cano et al., 2006**).

Bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et filières très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique. Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine(**Achat, 2013**).

I-2-1-Les antioxydants non enzymatiques

Comme les vitamines E (α -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.(**Gardès-Albert et al.,2003**).

I-2-2-Les antioxydants enzymatiques

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène(**Favier, 2003**).Ces enzymes comprennent :

- ✓ superoxydedismutase
- ✓ le glutathion peroxyde
- ✓ réductase de glutathion
- ✓ catalases

Celles-ci forment les mécanismes de défense endogènes du fuselage pour aider à se protéger contre les dégâts des cellules induits par des radicaux libres. Ces enzymes exigent également des cofacteurs tels que le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc, et le manganèse pour l'activité catalytique optimale. Il a été suggéré qu'une consommation diététique inadéquate de ces minéraux de trace puisse compromettre l'efficacité de ces mécanismes de défense antioxydants. La consommation et l'absorption de ces minéraux importants de trace peuvent diminuer avec le vieillissement.

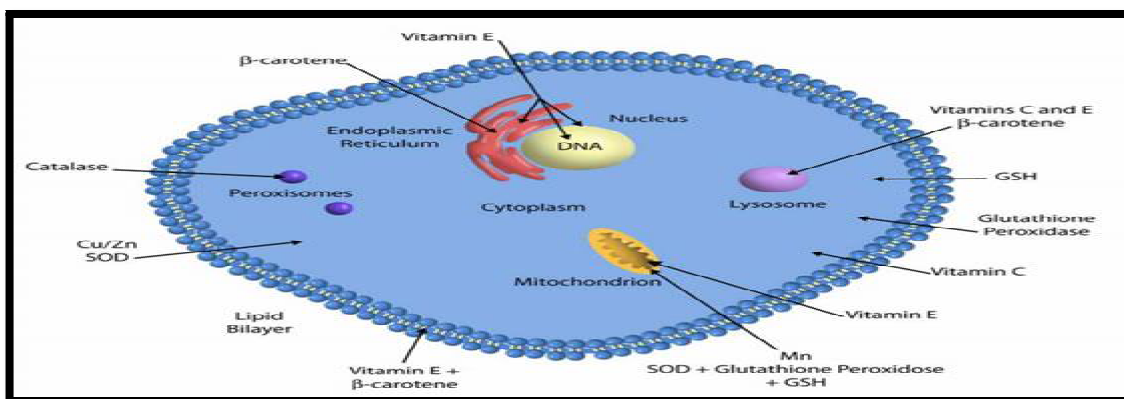


Figure 15: Systèmes Antioxydants D'enzyme(Anonyme B).

Tableau 05: Les systèmes de défense antioxydant (Favier, 2003).

Système enzymatique	
Supéroxyde dismutase (SOD)	<p>-Catalyse la dismutation de deux $O_2^{\circ-}$ et deux H^+ en H_2O_2. Suivant la réaction : $2H^{++} + 2O_2^{\circ-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$</p> <p>- Comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont l'activité est dépendante de la localisation et les apports nutritionnels en cuivre et a un moindre degré en zinc.</p>
Catalase	<p>-Transforme le H_2O_2 en simple molécule d'eau. Comme suite :</p> <p>$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$</p> <p>- lié au NADPH dans les peroxysomes qui la protège et améliore son activité et détruit le H_2O_2.</p>
Système non enzymatique	
Vitamine C	<p>- C'est un piègeur de $O_2^{\circ-}$, H_2O_2, OH°, et O_2^1, protège les biomembranes et les lipoprotéines, régénère la vitamine E.</p>
Vitamine E	<p>protège les cellules contre les dommages associés aux RL (inhibe la peroxydation lipidique).</p>
Glutathion	<p>- C'est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine et joue un rôle dans la protection des lipides, des protéines et l'ADN contre l'oxydation.</p>
Oligoéléments	<p>- Zn, Cu, Mg, Sn et Fe jouent le rôle des cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.</p>

I-3-Stress oxydatif

I-3-1-Définition et origine

Le stress oxydatif a été défini par (Reuter et al., 2010) comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes pro-oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Le stress oxydatif survient lors d'une production excessive de ces molécules réactives (des intoxications aux métaux lourds, l'irradiation, les ischémies/reperfusions, tabagisme, les maladies inflammatoires, le stress...etc) et /ou d'une défaillance dans les systèmes antioxydants à cause soit d'un déficit

nutritionnel comme les vitamines ou des anomalies génétiques (Pisoschi et Pop, 2015; Smaga et al., 2015).

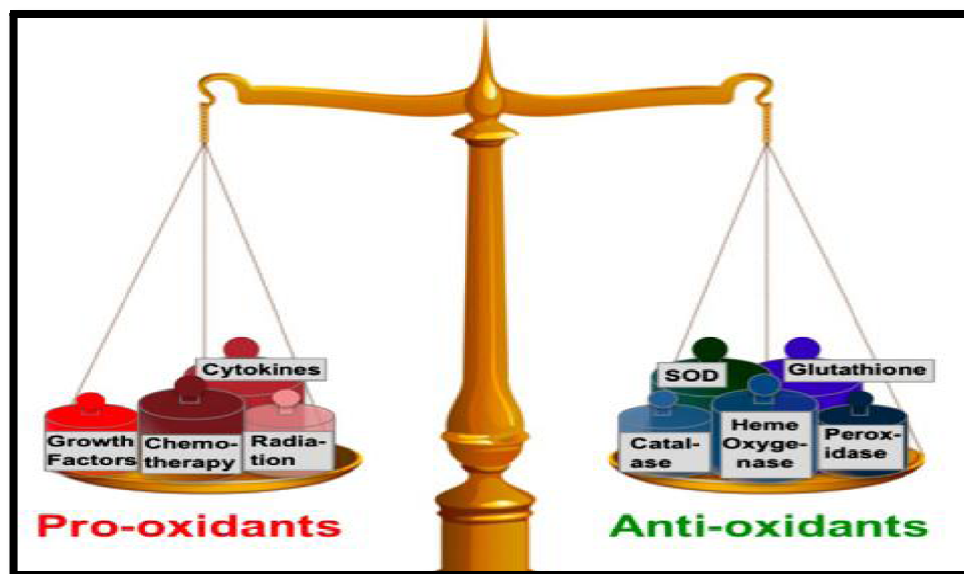


Figure 16: Modèle de la balance d'équilibre de stress oxydatif (Reuter et al., 2010).

La balance oxydative définit donc l'équilibre entre les systèmes pro-oxydants et les capacités antioxydants, dans les conditions normales, les antioxydants doivent être plus importants que les pro-oxydants, mais en conditions d'oxydation, les pro-oxydants emportent sur les antioxydants, qui peuvent conduire de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Heim et al., 2002; Noguchi, 2002). Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs de molécules très actives (Noguchi, 2002).

I-3-2 – Les cibles potentielles des ERO

Les radicaux libres présentent un paradoxe dans leur fonction biologique. Ils constituent des espèces hautement dangereuses susceptibles lors d'un stress oxydant, d'endommager par oxydation des différentes molécules biologiques notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Kohen et Nyska, 2002).

➤ L'oxydation des protéines

Les RL s'exercent sur les protéines, et particulièrement sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le groupement thiol des cystéines et de la méthionine, conduisant aussi à la formation des ponts disulfuriques et par conséquent l'agrégation des protéines. Les autres groupements fonctionnels des protéines sont aussi cibles d'attaque par les RL. Ainsi le OH^\ominus

attaque des groupements méthyles de valine, le groupement phényle des acides aminés tyrosine et groupement méthyle de l'alanine et le groupement amine de l'arginine et de la lysine (Figure 17) (Goto et Sadak, 2013).

Les RL sont aussi capables de couper les liaisons peptidiques et former des fragments protéiques. Ces modifications oxydatives des protéines conduisent généralement aux changements de la conformation spatiale et par conséquent l'altération de la fonction biologique de cette protéine (enzyme, récepteur, facteur de transcription...)

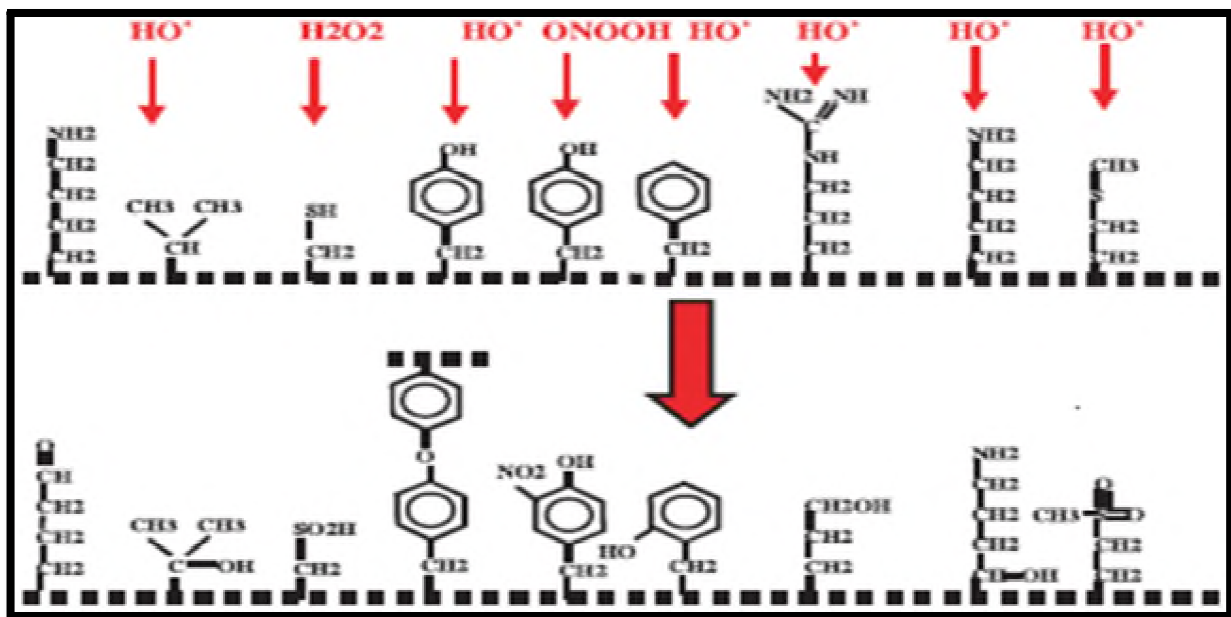


Figure 17: L'oxydation des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

➤ L'oxydation de l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est une cible majeure des espèces réactives oxygénées et azotées, conduisant alors à différents dommages comme la modification des bases, la formation des sites abasiques, les cassures de brins, les pontages DNA-protéines (Dizadaroglu et al., 2004 ; Raedschelders et al., 2012).

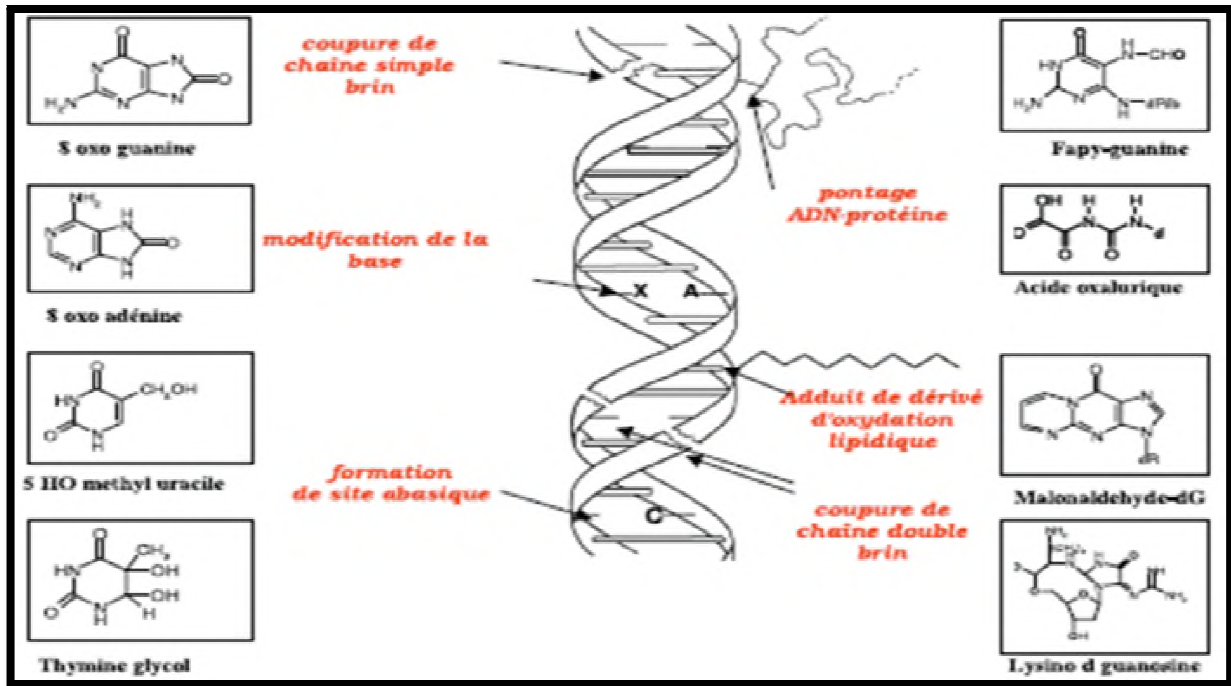


Figure 18 : Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN(Anonyme B).

➤ L'oxydation des lipides

Les membranes cellulaires riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) (oléique, linoléique, et arachidonique), sont très sensibles à l'oxydation par les RL en déclenchant une réaction en chaîne appelé lipoperoxydation cellulaire. La peroxydation de lipides induit une modification de fluidité, perméabilité et excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004 ; Valko *et al.*, 2009).

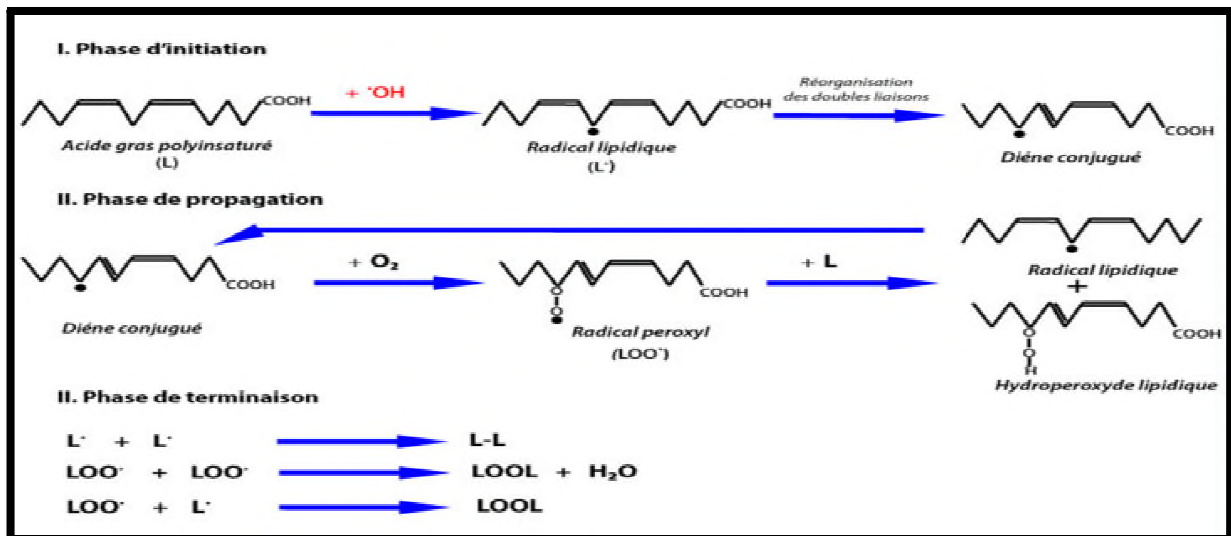


Figure 19: Mécanisme de peroxydation lipidique (Pham-Huy *et al.*, 2008).

II- l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse immunitaire naturelle, qui se développe suite à une lésion tissulaire provoquée par des facteurs physicochimiques (irradiations, brûlure, traumatismes mécaniques...) ou des infections microbiennes (bactériennes, virales ou parasitaire)(Noacket *al.*, 2018). Elle a pour but d'éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaire. Elle peut être aigue ou chronique(Majdalawieh et Fayyad, 2015).

L'inflammation se manifeste par quatre signes cardinaux(Sarkhel, 2015):

- Rougeur : due a la vasodilatation et l'hyperemie.
- Gonflement : occasionné par l'exsudation de liquide et de protéines plasmatiques dans lestissus, qui est due à une augmentation de la perméabilité membranaire.
- Chaleur : associée à une augmentation du débit sanguin et à une activité cellulaire accrue.
- Douleur : associée à la stimulation de neurones nocicepteurs par des médiateurs chimiques spécifiques.

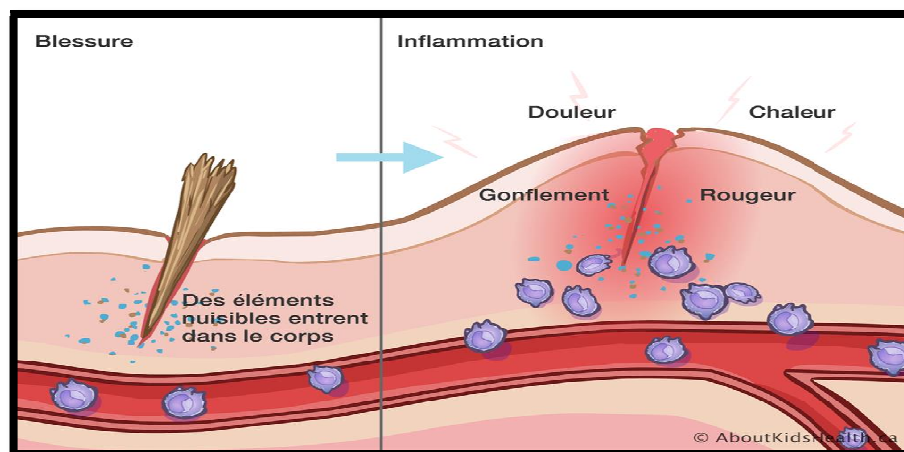


Figure 20 : L'inflammation et le système immunitaire(Sarkhel, 2015)

II-1-Inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate de quelques jours à quelques semaines, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Elle se traduit par quatre symptômes cardinaux: oedème, rougeur, douleur et chaleur. Cependant, un échec dans la résolution provoque une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à la progression en inflammation chronique (Khanna*et al.*, 2010; Lee et Surh, 2012 ; Rathinam et Fitzgerald, 2016) . Divisée en trois

grandes phases ; une phase vasculaire immédiate ; une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation.

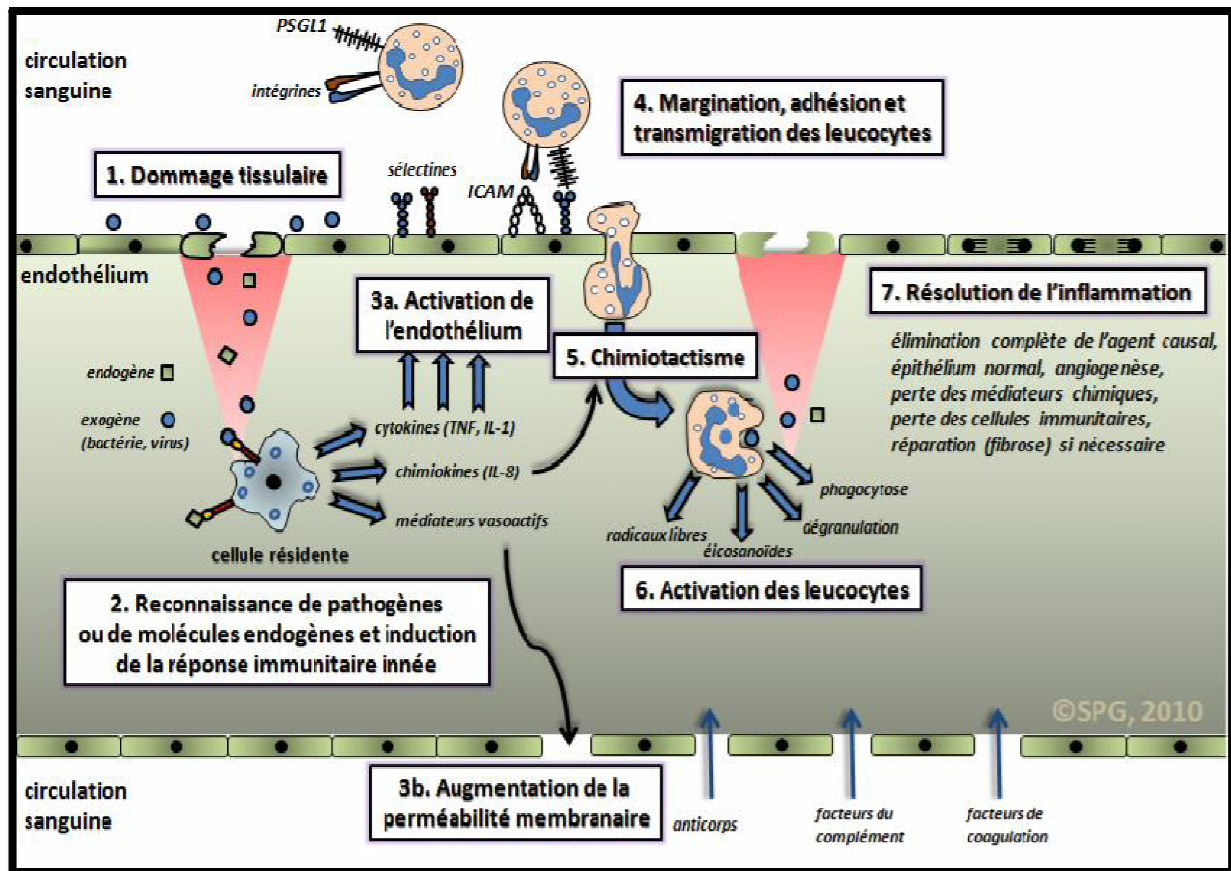


Figure 21 :Principales étapes de l'inflammation aiguë(Graval, 2010).

II-1-1- Phase vasculaire (initiation)

La réponse vasculaire (**Phase d'initiation**) comporte une vasoconstriction réflexe très brève suivie d'une vasodilatation durable suite à une lésion tissulaire ou un signal de danger endogène ou exogène, ce qui entraîne une exudation de liquide plasmatique et donc la formation d'œdème (**Dorwordetal., 2012**). L'augmentation de la perméabilité entraîne aussi la diapédèse et la migration extravasculaire des leucocytes. La brève vasoconstriction de quelques secondes va perturber le mouvement des plaquettes dans la circulation sanguine et entraîner leur activation. Les plaquettes activées produisent du thromboxane A2 aux propriétés agrégantes et vasoconstrictrices puissantes et favorisent la libération de médiateurs comme la sérotonine et l'histamine . La libération de ces facteurs vasoactifs entraînent une vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire et par conséquent l'exsudation plasmatique.L'augmentation du débit micro-circulatoire au

niveau du site enflammé explique partiellement l'apparition de la chaleur et de la rougeur. L'exsudation plasmatique induit un oedème par distension des tissus et provoque une hyper-pression sur les terminaisons nerveuses locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur.

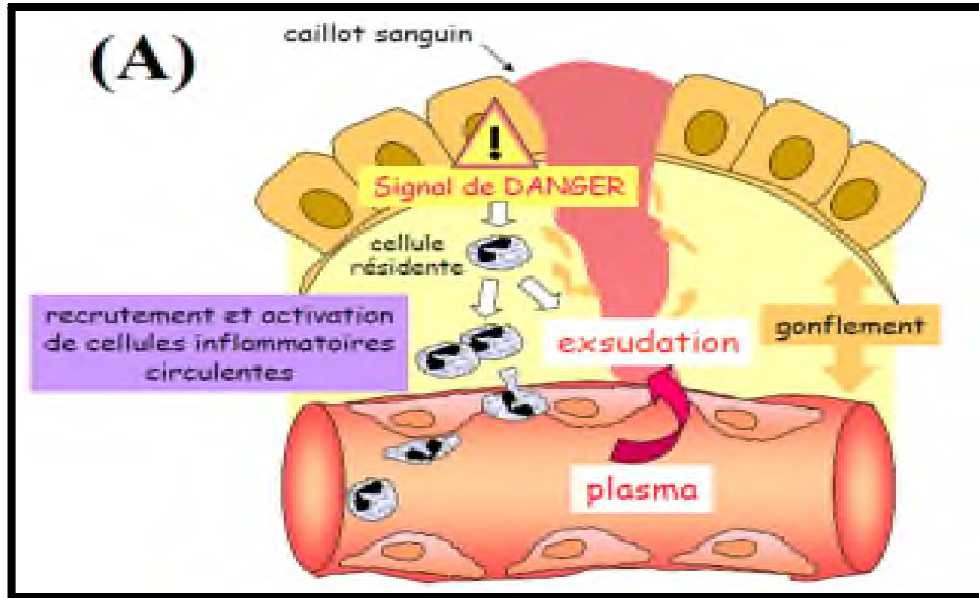


Figure 22 : Initiation de l'inflammation (Prinet *al.*, 2009).

II-1-2- Phase cellulaire (amplification)

La réponse cellulaire fait suite à la phase vasculaire. se déroule en trois étapes essentielles, la première met en jeu les cellules de l'immunité innée (Les polynucléaires neutrophiles et monocyte/macrophage), la seconde comprend une réponse non adaptative précoce (lymphocytes porteurs des récepteurs pour l'antigène) et la dernière étape, le développement d'une réponse immunitaire adaptative (activation des lymphocytes T (LT) et B (LB) spécifique) (Nathan, 2002 ;Dorwardet *al.*, 2012; Headland et Norling, 2015).

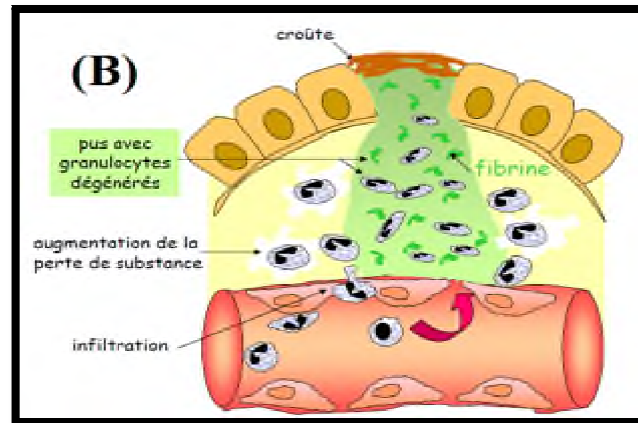


Figure 23 : La phase cellulaire (amplification)(Anonyme B)

II-1-3-Phase de résolution et la réparation

C'est la phase de résolution permettant la restauration du tissu lésé. En effet les conditions les plus favorables, les agents agresseurs et les débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages qui vont sécréter des médiateurs induisant ainsi la réparation tissulaire, les cellules fibroblastes et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation(Krishna et Upendra, 2012).

La cicatrisation s'effectue en trois phases principales:

- La phase inflammatoire s'accompagne d'une vasoconstriction qui favorise la libération des médiateurs inflammatoires.
- La phase proliférative caractérisée par la formation du tissu de granulation principalement par les fibroblastes et l'angiogenèse.
- La phase de remodelage caractérisée par la reformulation et l'amélioration des composants de la fibre de collagène qui augmente la résistance à la traction (Stevens et Lowe, 2009).

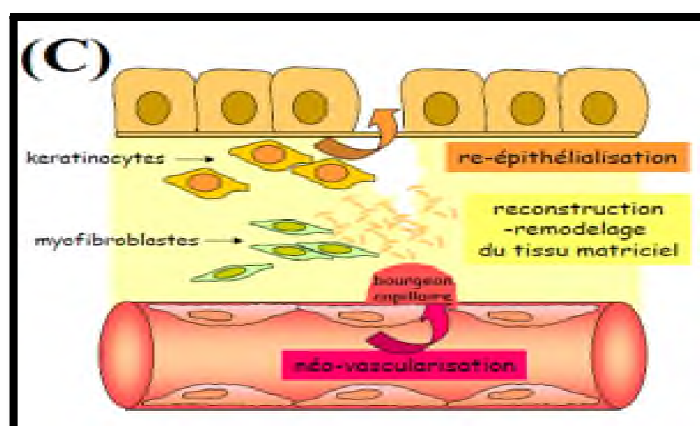


Figure 24 : Phase de réparation et résolution(Anonyme B)

II-2-Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aigüe, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette inflammation. L'inflammation chronique conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentative de réparation sont également présents (Lee et Surh, 2012; Park *et al.*, 2014).

III- Les anti-inflammatoires

III-1-Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Plusieurs classifications sont proposées, fondées soit sur la structure des AINS, la puissance, les modalités d'action et/ou la sélectivité anti-COX (Cuvillon et Viel, 2002). En effet, les AINS agissent tous en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase COX 1 et 2 (Risser *et al.*, 2009).

III-2-Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucocorticoid Response Element). Ce complexe intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles en réduisant la perméabilité capillaire, la production de facteurs chimiotactiques, la phagocytose, bloquant ainsi la libération de sérotonine, d'histamine et de bradykinines. De plus, les GC peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, comme la protéine activatrice-1 (AP-1), inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-2, TNF- α); récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 (Barnes, 1998 ; Rhen et Cidlowski, 2005).

III-3 Anti-inflammatoires naturels

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques, trouvés dans les plantes médicinales est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand (Barnes, 1998). Quelques exemples de plantes

douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le tableau6

Tableau 06: Plantes à activité anti-inflammatoires.

Plantes	Parties utilisées	Activités	Références
<i>Green tea</i>	Catéchine, acide Gallique	Stabilisation de la membrane d'érythrocytes en inhibant la peroxydation lipidique	Ma et al., 2000.
<i>Plumbago zeylanica</i> (Plumbaginaceae)	Racines	Fièvre, antioxydant et anti-inflammatoire	Raimi et Oyedapo, 2009.
<i>Cedrus deodara</i> (Pinacea)	Huile essentielle	Anti-inflammatoire et anti-rhumatisme	Shinde et al., 1999.
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Apiacées)	Graines	Antioxydant	Athamena et al., 2010
<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F	Racines	Anti-inflammatoire et anti-rhumatisme	Athamena et al., 2010

IV- Activité antibactérienne

Les infections microbiennes ont été la principale cause de maladies tout au long de l'histoire de l'humanité. Avec l'introduction des antibiotiques, on pensait que ce problème devait disparaître. Alors que l'utilisation répandue et parfois inappropriée de ces agents, ainsi que leur utilisation extensive comme activateurs de croissance dans l'alimentation animale ont poussé les bactéries à développer des mécanismes de résistance leur permettant de survivre avec succès au cours des 50 dernières années en face d'un assaut continu d'antimicrobiens (Davies, 1994; Lowy, 2003; Dzidic et al., 2008).

L'émergence de bactéries multirésistantes est un phénomène de préoccupation pour le clinicien et l'industrie pharmaceutique, car il est la principale cause de défaillance dans le traitement des maladies infectieuses (Davies, 1994).

Cette situation incite de chercher de nouvelles sources de substances antimicrobiennes. Les antimicrobiens d'origine végétale ont un énorme potentiel thérapeutique. Ils sont efficaces dans le traitement des maladies infectieuses, tout en atténuant ou en évitant un grand nombre d'effets secondaires qui sont souvent associés aux agents synthétiques (Arshad *et al.*, 2010)

IV-1-Antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle, semi-synthétique ou synthétique, capable à faible dose de tuer ou d'inhiber spécifiquement la croissance du germe par un mécanisme particulier jouant sur ses mécanismes vitaux (OkusaNdjolo., 2012). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne. Selon la structure chimique, les antibiotiques peuvent exercer leurs effets selon différents modes:

- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi: β -lactamines, glycopeptides,
- Antibiotiques altérant la membrane plasmique: polymixines, daptomycine,
- Antibiotiques inhibant la synthèse protéique (généralement par fixation sur les ribosomes): tetracyclines, chloramphenicol,
- Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques: rifampicine, etc. (Dzidicetal., 2008).

IV-2- Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'activité biologique d'un extrait est liée à sa composition chimique. Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou biocide et une inhibition de la croissance ou activité biostatique(Attou, 2011).

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car un antimicrobien peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Pibiri, 2006).

IV-2-1- Antibiogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Pibiri, 2006). L'aromatogramme se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum. La méthode est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée (Manuel terrestre de l'OIE, 2008). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Pibiri, 2006).

IV-3 - Description des bactéries étudiées

IV-3-1- *Escherichia coli* (Gram -)

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Baliere, 2016).

IV-3-2 – *Pseudomonasaeruginosa* (Gram -)

Les espèces *P. aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries finissent de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche. *Pseudomonasaeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Hichem, 2012).

IV-3-3 *Staphylococcus aureus* (Gram +)

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 μm , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire. (Bahri, 2014).

IV-3-4 *Listeria* (Gram +)

Le genre *Listeria* appartient au phylum des Firmicutes, proche du genre *Bacillus*. Elle fait partie de la classe des Bacilli, à l'ordre des Bacilliales et à la famille des Listeriaceae. Actuellement, 18 espèces de *Listeria* ont été identifiées : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. denitrificans*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*. (Pibiri, 2006).



Partie Expérimentale



Matériel et méthodes

La majorité de travail expérimental a été effectué au sein du laboratoire de **CRBT**(Centre de recherche en biotechnologie) et les testes phytochimiques ont été réalisés au laboratoire de biochimie et microbiologie de faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abbès Laghrour – Khenchela.

Les objectifs

- 1- Identifier les différents groupes chimiques présents dans les tiges *E.alata*.
- 2- Détermination de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne de l'extrait méthanolique des tiges de *E.alata*.

I-Matériel végétale

I-1- la Récolte

La partie aérienne (Tiges) de l'éphédra Alata a été récoltée au niveau de la région de Chechar , située à environ 50 km de la ville de khenchelale 03 février 2019.



Figure 25: Carte géographique représente la localisation d'obtention de plante Ephédra Alata (Chechar - khenchela).

I-2-Séchage

Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures (Chemat.2011) et cela pendant dix semaines.



Figure 26 : Les tiges sèches .

I-3-Broyage

La partie aérienne de l'éphédra (Tiges) séchée, est broyée jusqu'à obtenir une poudre très fine puis en passant la poudre à travers une passoire fine et mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) en voie de leur analyses .



Figure 27: Tiges sèches broyées .

II- Méthode d'extraction solide / liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer des métabolites secondaires(Chemat.2011).

II-1- Macération

La macération est une méthode qui consiste à laisser la poudre de plante en contact prolongé avec un solvant (Lagnika,2005).

Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires, généralement les solvants les plus utilisés sont méthanol l'éthanol, ou même l'eau pour l'extraction des composés polaires (**Rispail et al ;2005**).

II-1-1-Matériels et produits

➤ Matériels et appareillages

- Rota vapeur - Etuve - Balance
- Bécher - Erlenmeyer - Epruvettes graduées - Cristallisoir – Entonnoir
- Pissette – Thermomètre - Spatule - Papier filtre

➤ Solvants utilisés

- Méthanol

II-1-2-Mode opératoire

L'extraction est effectuée en utilisant 100g de la poudre de *Ephedra alata* introduit dans un bécher qui contient le mélange hydro-alcoolique : Méthanol/Eau (7 : 3) pendant 24h ; après la filtration de l'extrait par une pompe à vide, le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un rota-vapeur à une température de 40°C, l'extrait méthanolique obtenue est conservé jusqu'à l'utilisation. La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Tableau 07:Le volume total de chaque macération.

Macération	Durée	Volume des solvants	
		Méthanol	H ₂ O distillé
1 ^{ère}	24h	350 ml	150 ml
2 ^{ème}	24h	250 ml	70 ml
3 ^{ème}	24h	250 ml	70 ml

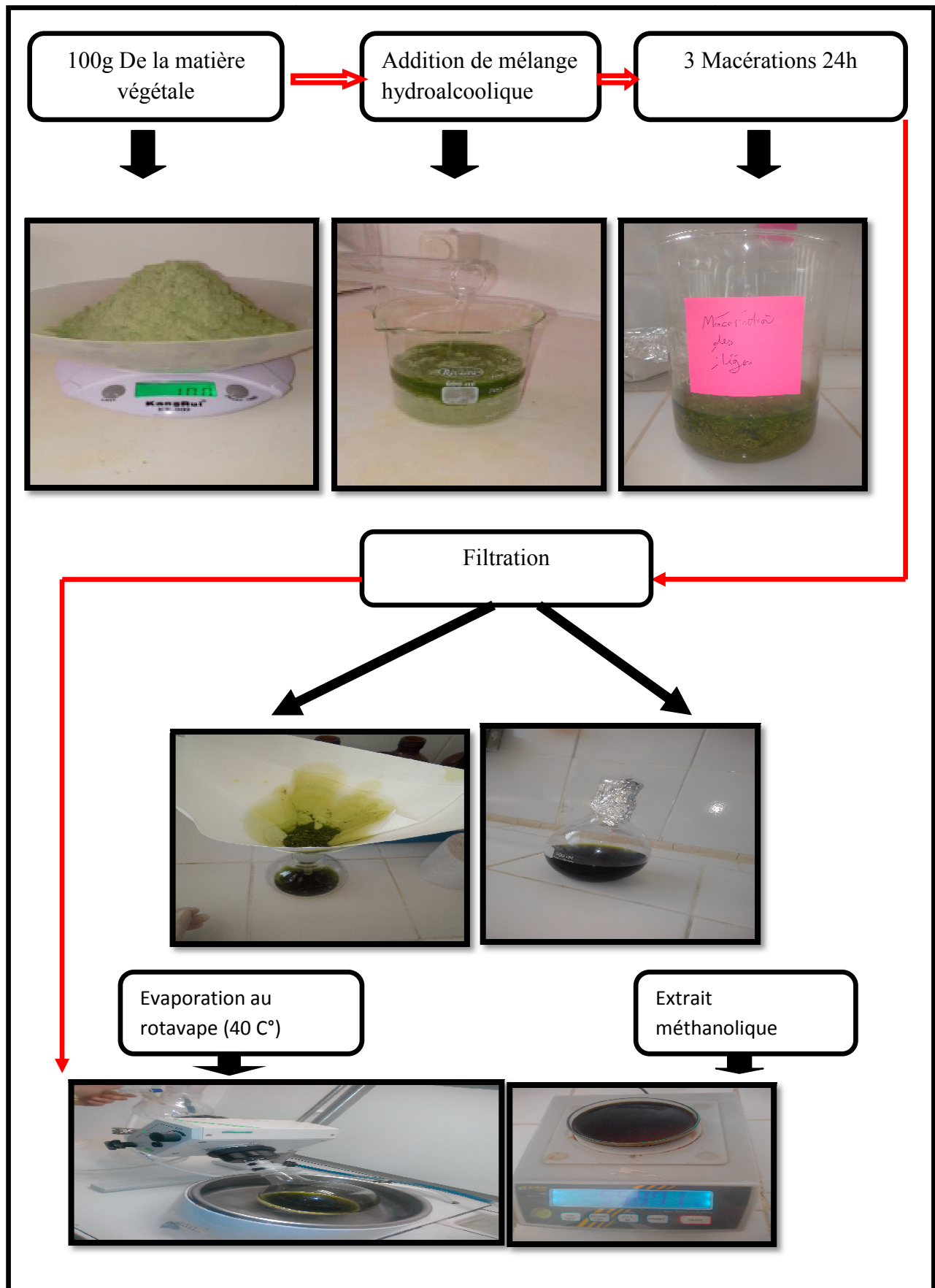


Figure 28: Protocol de macération.

III- Le Rendement

Le rendement de l'extrait est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante sèche. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R = 100 (m/m_0)$$

R : est le rendement en %.

m : est la masse de l'extrait.

m₀ : est la masse de la plante.

IV- Analyse qualitative des extraits de plante

IV-1-Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante. De ce point de vue, les techniques générales de screening phytochimique peuvent être d'un grand intérêt. Ces techniques permettent de détecter dans la plante, la présence des produits appartenant à des classes de composés ordinairement physiologiquement actifs.

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

(+++): Présence plus forte ; (++) : présence forte ; (+) : présence faible ; (-) : absence.

IV-1 -1-Matériels et produits

➤ Matériels et appareillages

- Bain marin - Lampe UV - Balance - Vortex.
- Tubes à essais - Entonnoir - Verre de montre - Pipette - Papier filtre.

➤ Produits Chimique

- FeCl₃
- Réactif de Mayer
- Soude 10%
- Acide sulfurique 1%
- Ether de pétrole
- Chloroforme
- D'anhydride acétique

IV-1-1-Mode opératoire

Le screening phytochimique nous permet de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau de la plante étudiée.

La détection de ces composés chimiques est basée sur :

- ✓ Des essais de solubilités des constituants.
- ✓ Des réactions de précipitation et de turbidité.
- ✓ Changement de couleur spécifique.
- ✓ Un examen sous la lumière ultraviolette(254 et 365 nm).

❖ Teste des alcaloïdes : Test de Mayer

Cent milligrammes d'extrait ont été introduits dans un tube à essai contenant 3 ml d'acide sulfurique 1% .L'ensemble a été porté à ébullition au bain-marie (100°C) pendant 5min. Après refroidissement et filtration, 5gouttes de réactif de Mayer ont été ajoutées. La formation d'un précipité blanc montre la présence des alcaloïdes.(Bruneton,1999).

❖ Test des tannins

Cent milligrammes d'extrait ont été dissouts dans 5ml d'eau distillée et la solution a été chauffée pendant 5min. Après refroidissement et filtration, 4gouttes de chlorure de fer 1% ont été ajoutés à 2 ml de filtrat. La présence des tannins a été montrée par la formation d'un précipité bleue.(Bruneton,1999).

❖ Test des coumarines

Cent milligrammes d'extrait ont été dissous dans 3 ml de méthanol contenu dans tube à essais, puis le tube a été recouvert d'un morceau de papier imbibé d'une solution de soude 10 %. L'absence de la fluorescence jaune-vert à l'UV (254 nm) montre l'absence des coumarines (Bruneton,1999).

❖ Test des composés phénoliques

Cent milligrammes d'extrait a été dissout dans 3 ml d'éthanol et 5 gouttes de FeCl₃ y ont été ajoutées. Le développement de la coloration verdâtre a indiqué la présence de phénols. La présence des composés phénoliques a été marquée par l'apparition de la coloration bleu-verdâtre.(Bruneton,1999).

❖ Les triterpènes et les stéroïdes : test de Liemermann-Buchard

Cent milligrammes d'extrait ont été dissouts dans 3 ml de chloroforme et 4 gouttes d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré y ont été ajoutées. La formation d'une phase supérieure rouge-violacé a indiqué la présence des triterpènes , alors que le développement d'une coloration bleue à l'interface montre la présence des stéroïdes. (Bruneton,1999).

❖ Test des anthraquinones

Cent milligrammes a été ajouté à 4 ml du mélange éther-chloroforme (1 :1 v/v). La solution ainsi obtenue a été traitée avec 4 ml de soude 10 % et l'apparition d'une coloration rouge montre la présence des anthraquinones.(Bruneton,1999).

❖ Test des anthocyanines

Cent milligrammes a été ajouté à 5 ml d'une solution d'acide sulfurique 1%. L'apparition d'une coloration orange montre la présence des anthocyanines.(Bruneton,1999).

❖ Test des saponines

Cent milligrammes d'extrait ont été introduit dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau et l'ensemble a été chauffé pendant 5 min. Après refroidissement et filtration, le filtrat a été introduits dans un second tube à essai et agité pendant 1 min. Après 15min de repos, l'épaisseur de la mousse a été mesurée à l'aide d'une règle graduée. Une hauteur de mousse d'au moins un centimètre a indiqué la présence des saponines.(Bruneton,1999).

❖ Flavonoïdes

2.5 ml de l'extrait aqueux dans 0.5 ml de HCL concentré. Le développement de la couleur rouge ou rose après 3 minutes ceci indique la présence des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

V-Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)**V-1- Principe de la réaction**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. La méthode de (Topnu et al.;2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

V-2- Procédure

50 μ l (S2) [extrait de plante] + 130 μ l [MeOH] + 10 μ l (S1) [CH_3COOK] + 10 μ l

[Al(NO₃)₃, 9H₂O] + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol [50 µl extrait + 150 µl méthanol].-

V-3-Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin (Annexe B).

VI-Activités biologiques

VI -1- Activité antioxydante

VI -1-1- Test du DPPH radical libre

➤ Principe de la réaction

D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant des groupes -SH, -NH et -OH. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce radical ne forme pas des dimères, il reste donc sous sa forme monomère qui est relativement stable (Popovicietal., 2009).

La réduction du DPPH[•] par un agent antioxydant en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle (Molyneux, 2004).

Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles), il est déterminée par spectrophotométrie en mesurant la diminution de son absorbance entre 515-518 nm (Molyneux, 2004). Le α-tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

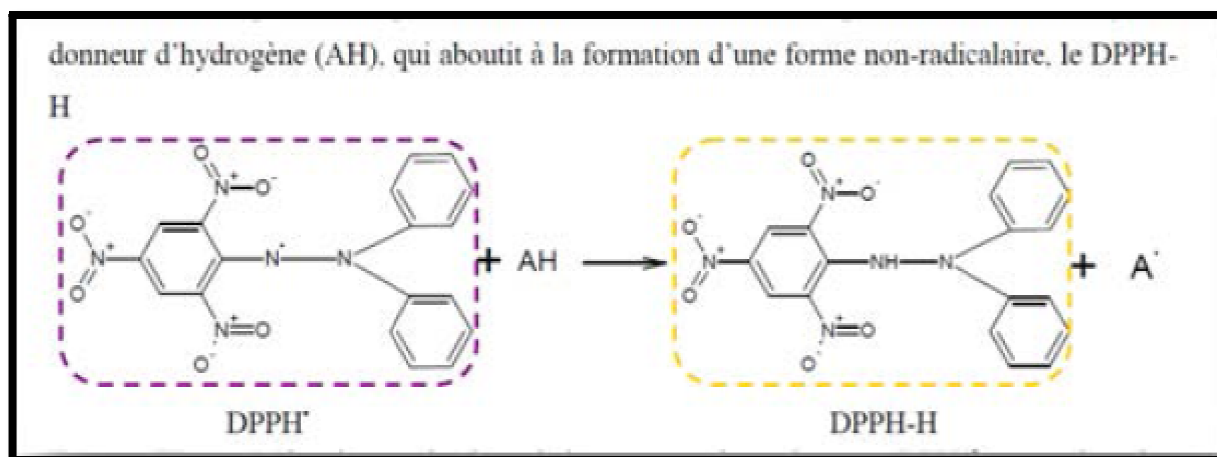


Figure 29: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH[•] entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH).

➤ Préparation du DPPH

Dissoudre 6 mg dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 517 nm dans le spectrophotomètre.

➤ Procédure

A 160µl (DPPH) rajoutez 40µl (extrait). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30min à la longueur d'onde de 515 nm. Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{[\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance du test}]}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

Où le contrôle est préparé, en parallèle, en mélangeant 160µL de méthanol avec 40µl de la solution méthanolique de DPPH.

Pour valoriser le pouvoir anti-radicalaire de nos extraits, l'activité antioxydante de BHA et Alpha. Tocophérol est mesurée de la même façon que l'échantillon.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant de nos extraits, nous avons introduit le paramètre IC50.

L'indice IC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH* avec 50%. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite (**Popovici et al., 2009**).

Les résultats sont exprimés en g/L et les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

VI-1-2- Test du ABTS scavenging activity

➤ Principe de la réaction

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de (**Re et al., 1999**).

➤ Procédure

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16 h ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

(ABTS) = 19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 ml H₂O + 3,3 mg (2.45mM) (K₂S₂O₈) + 5ml H₂O + attendre 16 heure à l'abri de la lumière.

M (ABTS) = 548,68 g/mol ,

M (K₂S₂O₈) = 270,32 g/mol,

A= 0.70-0.75 nm de l'ABTS,

➤ **Procédure**

160µl (ABTS) + 40µl (extrait) + attendre 10min + lecture à 734 nm.

L'activité ABTS a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

ABTS scavenging effect (%) = ((A control – A simple)/ A control) x 100.

VI-1-3- Test du CUPRAC (CupricReducingAntioxidantCapacity)

➤ **Principe de la réaction**

Le CupricReducingAntioxidantCapacity est déterminé par la méthode CUPRAC,

(Apak et al., 2004).

➤ **Procédure**

Préparation des solutions

- m=1.927 g Acétate d'ammonium (ACNH₄) + 25 ml (H₂O) → S1 transparent(pH=7.0).
- m=0.042625 g (Cu Cl₂, 2H₂O) + 25 ml (H₂O) → S2 bleu.
- m=0.039 g (Neocupronin) + 25 ml (EtOH) → S3.

1- ajouter la solution S1 au plat qui contient les extraits → pour lecture.

2- mélanger la solution S2 et S3 → pour lecture.

3- le CUPRAC prend une heure de temps pour lecture.

A 40 µl d'extrait rajoutez 60 µl (S1) + 50 µl (S3) + 50 µl (S2) + attendre 1 heure + lecture à 450 nm.

M (Cu Cl₂, 2H₂O) = 170.50 g/mol.

M (ACNH₄) = 77g/mol.

M (Neocupronin) = 208.27 g/mol.

VI -2- L'activité antibactérienne

VI-2-1-Les souches testées

Les souches bactériennes utilisées pour déceler l'activité antibactérienne de différents extraits de l'éphédra il s'agit de :

Tableau 08: Les souches bactériennes utilisées.

La souche	Gram	La référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 25933
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positif	ATCC 25922

Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) provenant du laboratoire de bactériologie « clinique mezdaouetkhenchela».

VI-2-2-Matériels et produits

➤ Matériels et appareillages

- L'étuve - Autoclave - Four pasteur
- Plaque chauffante - Bec benzène -Vortex – Balance
- Les boîtes de pétrie- Les tubes a essais - Micropipette - Pipette
- L'anse de platine - Ecouvillon stérile -Les disque (papier filtre) - Pince stérile

➤ Produits Chimique

- Miller Hinton
- Agar
- L'eau physiologie

VI-2-3-Mode opératoire

❖ Stérilisation du matériel

➤ Four pasteur

Il est utilisé pour la stérilisation de la verrerie vide (tubes à essai, pipettes, les flacons, pince) emballée dans du papier solide à 180°C pendant 30 minutes.

➤ **L'autoclave**

Le milieu de culture, les tubes à essai remplis d'eau physiologique (Annexe) utilisés dans la préparation des solutions bactériennes, les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) et les embouts jaune enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 60 minutes.

❖ **L'antibiogramme :**

➤ **Repiquage des souches bactériennes**

Les souches bactériennes à tester ont été repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées (Boughrara,2016).

• **Préparation des boîtes de pétri**

La gélose de Muller Hinton est coulée et répartie dans des boîtes de pétri stériles. Ces dernières sont séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi (Bouchouka,2016).

• **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland (Boughrara,2016).

• **Ensemencement**

- ✓ La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzène.
- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- ✓ L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas.
- ✓ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (Adouane, 2016).

- **Préparation des dilutions de l'extrait**

une série de dilutions ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$) de l'extrait méthanolique (MeOH) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée à partir d'une solution mère 200mg d'E-MOH préalablement dissouts dans un 1 ml DMSO(**Bougandoura, 2011**).

- **Dépôt des disques**

L'opération d'application des disques au niveau de boites de Pétrie est résumée dans les étapes suivant :

- ✓ Des disques de papier filtre de 6,0 mm de diamètre (Wattman n° 1) sont imprégnés individuellement avec 15 μ L d'extrait à différentes concentration.
- ✓ A l'aide d'une pince stérile on applique les disques à la surface des milieux déjàensemencés.
- ✓ Un disque de l'antibiotique (Gentamicine 30 μ l) est placé dans la boîte de Pétri comme contrôle positif.
- ✓ Un disque imprégné de 15 μ l de DMSO est utilisé comme témoin négatif.
- ✓ Les boites sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.
- ✓ Chaque test est réalisé en deux répétitions (**Bougandoura, 2011**).

- **Incubation et Lecture**

Après incubation 18-24 heures à 37°C dans l'étuve, les résultats sont observés, en mesurant les diamètres d'inhibition

Cette sensibilité est classée selon**Duraffourd, (1990)**comme suit :

- Non sensible pour un diamètre inférieur à 8mm.
- Sensible pour un diamètre de 9-14 mm.
- Très sensible pour un diamètre de 15-19 mm.
- Extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20 mm.

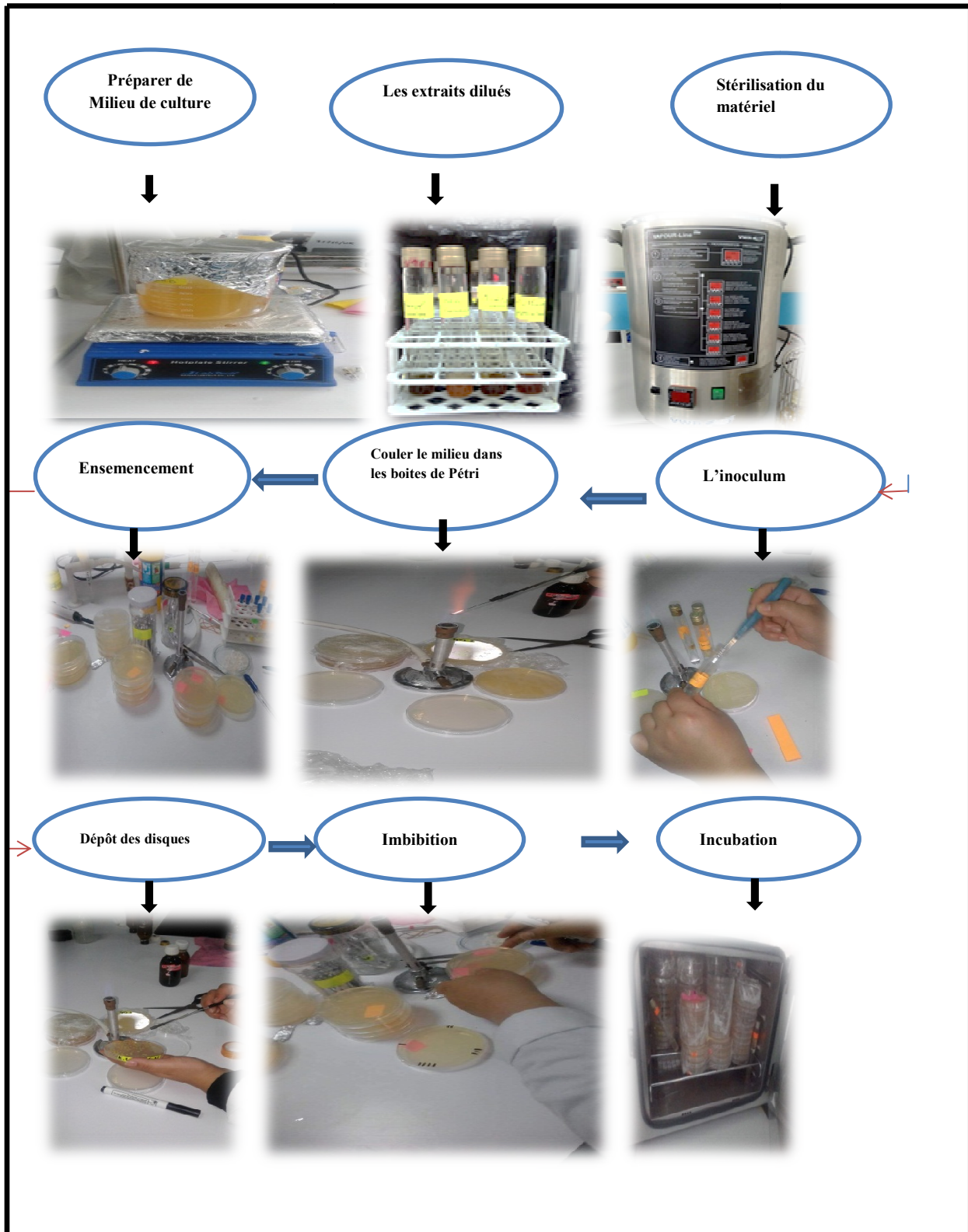


Figure30 : Protocole de l'activité antibactérienne de l'*éphédra alata* .

VI-3-L'activité anti inflammatoire

VI-3-1-Matériels et produits

➤ Matériels et appareillages

- Spectrophotomètre - Cuve spectre - Balance analytique - Bain-marie
- Les tubes à essais - Micropipette - Pipette –thermomètre

➤ Produits Chimique

- Sérum bovine albumine(BSA)5%
- Eau distille
- Diclofenac sodium (0.25 mg/ml).
- Acide citrique
- Na_2HPO_4

VI-3-2-Mode opératoire

L'activité anti-inflammatoire in vitro d'extrait méthanolique d'*Ephédra Alata* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste a préparé quatre solution :

1-La solution d'essai (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine Albumine (BSA) 5 % et 0,05 ml d'extrait aqueux avec une concentration de 0.25 mg/ml.

✓ La solution d'essai (0,5 ml)= 0,45 ml de a + 0,05 ml de b

a-Pour préparer la solution aqueuse de sérum bovine Albumine (BSA) 5 % :

-Solubiliser 0.5 g BSA dans 5 ml eau.

b-0.25 mg extrait de la plante dans 1 ml eau.

2- La solution control test (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

✓ La solution control test (0,5 ml)= 0,45 ml de a + 0,05 ml d'eau distillé.

3- La solution contrôle produit (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait aqueux avec une concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

✓ La solution contrôle produit (0,5 ml)= 0,45 ml d'eau distillé+ 0,05 ml de b

4- La solution standard test (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofenac sodium avec une concentration de 0.25 mg/ml.

- ✓ La solution standard test (0,5 ml)= 0,45 ml de a + 0,05 ml de diclofenac sodium 0.25 mg dans 1ml d'eau.
 - ✓ préparer la solution phosphate buffer saline :
Solution D : 1.9 g acide citrique / 100 ml de H₂O.
Solution F: 2.8 g de Na₂HPO₄ /100 ml de H₂O.
 - ✓ Pour 100 ml de solution pH=6.2, on mélange 16.9 ml de D et 33.1 ml de F puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.
- Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,2), les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline (Ph=6,2) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV -visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{OD de test solution} - \text{OD de test control}}{\text{OD de test control}} \right] * 100$$

OD: la densité optique.

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le diclofenac sodium (250ug/ml) (**Sangita et Priyanka, 2012**).

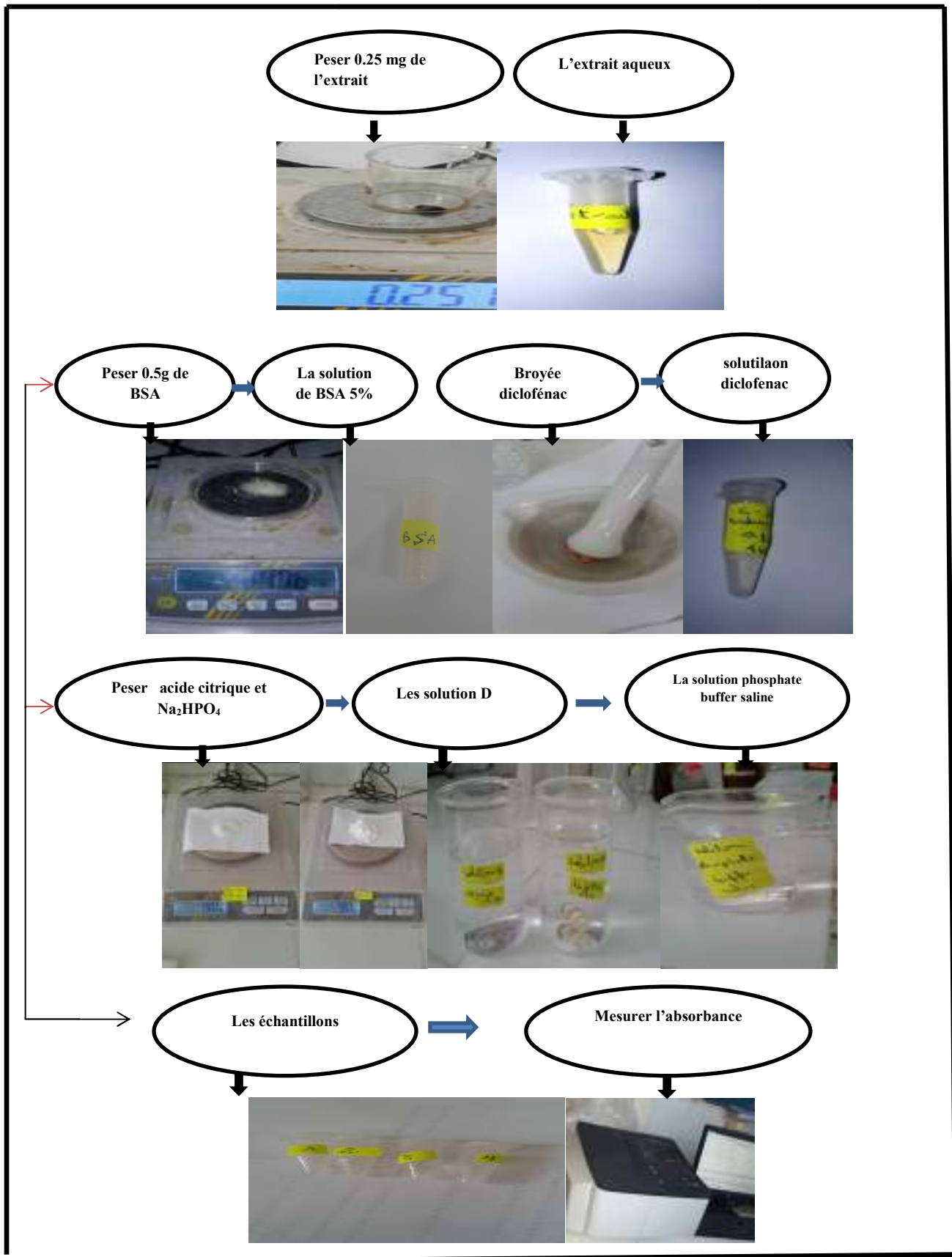


Figure 31: Protocole de l'activité anti-inflammatoire d'extrait méthanolique (Tiges).

Résultats et discussion

Ce travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti inflammatoire, antibactérienne de l'extrait méthanolique des tiges *d'ephedra alata* .

I-Rendement de l'extrait

Le tableau résume la quantité d'extrait brut obtenu après 3 macération de la matière végétale avec le mélange hydro-alcoolique (MeOH-H₂O 70 %).

Tableau 09: Le rendement de l'extrait méthanolique des tiges *d'ephedra alata* .

La plante	Le poids de la matière végétal (g)	Extrait	Poids de l'extrait (g)	Le rendement (%)
<i>Ephedra alata</i> (Tiges)	100	MeOH	21, 64	21,64

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé ou le fractionnement et de sa polarité (**Mohammedi, 2013**).

Les résultats du rendement de l'extrait méthanolique des Tiges de la plante *E.alata* sont comparés avec ceux de l'extrait méthanolique des fleurs pour la même plante de kenchela (les deux extraits sont préparés dans les mêmes conditions). Le calcul des rendements par rapport au poids de la matière végétale pour la plante *E .alata*, a permis d'avoir des valeurs de **21,64%** et de **37,6%** pour l'extrait méthanoliques des tiges et celui des fleurs respectivement. Les fleurs ont donnés un rendement meilleur que celui des tiges.

Selon **Kebili (2016)**, le rendement de l'extrait hydro-alcoolique de la partie aérienne de la même plante de la région de Ouargla est de **23 ,21%**. Le rendement d'extrait méthanolique obtenu par **Jerbi et al., (2016)** dans *l'Ephedra alata* de la Tunisie est de **(11,18%)**. Cette différence s'explique par la polarité de solvant d'extraction et la solubilité des composés dans ces solvants de plus, de la période de la récolte et des conditions enviremontales.

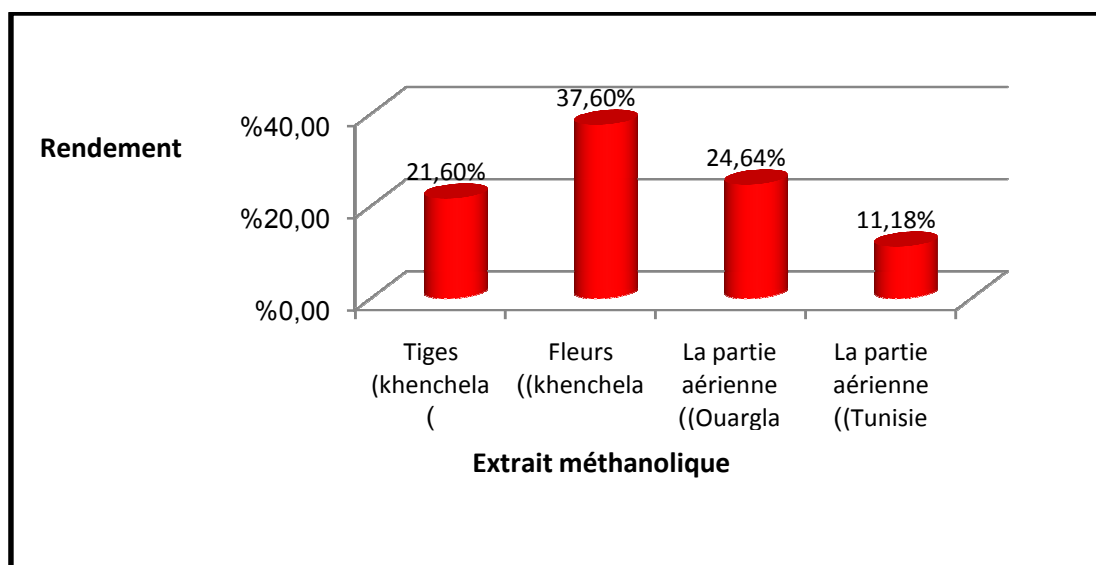


Figure 32 : Histogramme présente les rendements hydroalcooliques.

II-Screening phytochimique

Les tests phytochimique consistent à détecter les différentes familles des composés qui existent dans la partie aérienne des tiges d'*Ephedra alata*, par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau10 : Résultat des tests photochimiques de l'extrait Méthanoliques

Métabolites secondaire	Remarques	Résultats
Alcaloïdes	Apparition d'un précipité blanc	(+)(+)(+)
Flavonoïdes	Apparition d'une couleur rouge et jaune	(+)(+)(+)
Tri terpène	Formation d'une phase supérieure rouge-violacé	(+)(+)
Stéroïdes	Développement d'une coloration bleue	(-)
Composes phénoliques	L'apparition de la coloration bleu-verdâtre.	(+)(+)(+)
Saponines	Indice de mousse	(+)(+)
Tanins	Formation d'un précipité bleue	(+)(+)(+)
Anthraquinones	Apparition d'une coloration rouge	(+)(+)
Anthocyanines	Apparition d'une coloration orange	(-)
Coumarines	Apparition d'une fluorescence	(+)(+)

(-) Négative ; (+)Faiblement positif ; (++)Positif ;(+++)fortement positif.

L'étude phytochimique montre que l'extrait méthanolique des tiges est riche en alcaloïdes, flavonoïdes, composées phénoliques et tanins. Les triterpènes, les saponines, les coumarines et les anthraquinones sont présents en quantités modérées, tandis que les stéroïdes et les anthocyanines sont absents.

La sous espèce *E.alata alanda* est riche en métabolites secondaires déférents. **Kessal et Bouafia (2003)**, montré que il ya une différence significative dans les résultats des deux régions en présence de Stéroïls dans *E- alata -alanda* de la région de Sétif et son absence complète dans la même plante de la région d'Ouargla et sont marqué aussi absents de la plante de la région de Khenchela.

L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables (**Konkon et al., 2006**), Ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques. La différence de la composition chimique des mêmes plantes dans une autre région peut être expliquée par l'influence des facteurs sur la présence, l'absence et la répartition des différents principes actifs comme, le climat, la nature du sol, eau, altitude ...etc. (**Bouhrara, 2016**).

III-Dosage des flavonoïdes

Les résultats sont comparés avec l'extrait méthanolique des fleurs de la même plantes de la wilaya de khenchela.

L'estimation des flavonoïdes de l'extrait méthanolique tiges et fleurs de *E.alata* a été effectué par la méthode (**Topnu et al., 2007**) en utilisant le réactif nitrate d'aluminium. La quercétine est le standard le plus souvent employé dans cette méthode.

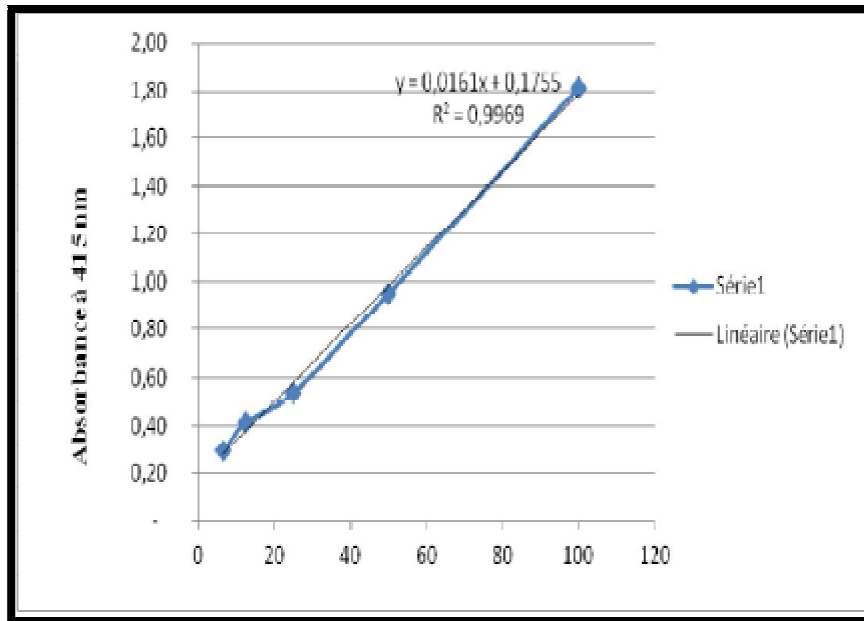


Figure 33: Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine et exprimé en milligramme équivalent de quercétine par milligramme du poids d'extrait (mg EQ/mg). La teneur des flavonoïdes totaux a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage d'équation (**Figure 33**), $DO = 0,0161$ [flavonoïdes] + $0,1755$ avec un coefficient de détermination R^2 égal à $0,9969$.

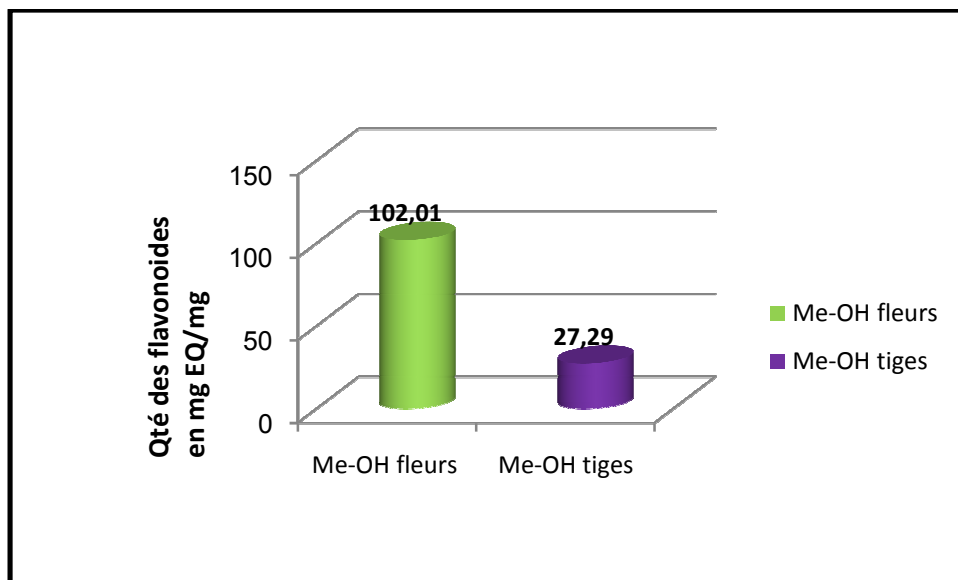


Figure 34 : Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/mg).

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode utilisée se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 415 nm, cette méthode révèle que l'extrait méthanolique des tiges a montré une teneur d'environ

(27,29±1,03)mg EQ/mg d'extrait qui est très faible que celui obtenu avec l'extrait Me-OH des fleurs de la même plantes (102,01±1,17) mg EQ/mg d'extrait.

IV- L'activité antioxydante

IV-1-Pouvoir de piégeage du radical libre DPPH.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de nos extraits *via* le test DPPH a conduit aux résultats illustrés par le tableau 13

Tableau 11 : L'activité anti-radicalaire des extraits *via* le test DPPH.

Extrait	% Inhibition in DPPH assay							
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	CI ₅₀ µg/mL
MeOH fleur	19,17±0,91	43,43±0,85	72,10±94	85,30±0,25	84,25±1,79	84,70±0,25	Saturation	16,44±0,31
MeOHTige	NA	NA	1,99±2,53	15,08±3,29	29,39±1,44	53,76±0,66	80,39±1,10	184,01±2,84
Concentration	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
BHA ^b	76,55±0,48	79,89±0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	6.14±0.41
BHT ^b	49,09±0,76	72,63±2,06	88,73±0,89	94,00±0,31	94,97±0,08	95,38±0,41	95,02±0,23	12,99±0,41
α-Tocopherol ^b	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	13,02±5,17

Le test DPPH a donné une valeur d'IC₅₀ (184,01±2,84) pour l'extrait Me-OH des tiges tandis que ceux du standard α-Tocopherol égale 13,02±5,17 et BHT égale 12,99±0,41 µg/ml ; cet extrait possède un pouvoir de piégeage du DPPH plus faible que ceux des standards, Par contre l'extrait Me-OH des fleurs de la même plante *E. alata* donné une valeur d'IC₅₀ (16,44±0,31) qui est plus proche que ceux des standards. Donc l'extrait Me-OH des fleurs possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus important que celui des tiges d'*E. alata*.

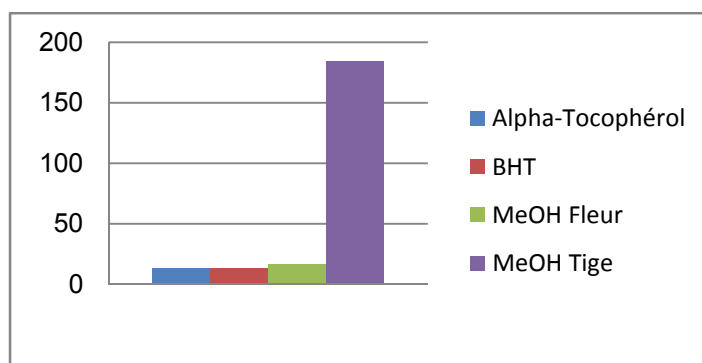


Figure 35 : Histogramme CI₅₀ des extraits et des standards.

IV-2-Test du radical ABTS

Tableau 12 : L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits *via* le test ABTS

Extraits	% Inhibition							CI ₅₀ µg/mL
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	
MeOH fleurs	43,87±0,59	70,88±1,00	90,18±3,83	93,66±0,51	93,66±0,14	93,75±0,81	93,80±0,14	6,74±0,27
MeOH Tiges	9,35±1,06	18,04±0,85	30,20±0,35	46,78±0,22	70,31±1,43	89,29±2,17	93,00±1,88	60,07±1,05
Concentration	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
BHT	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0,39	1.29±0.30
BHA	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

D'après les résultats du tableau on a trouvé une IC₅₀ de 60,07±1,05 avec l'extrait MeOH des tiges, cette valeur supérieur à celle des standards BHA (1,81±0,10 µg/ml) et BHT (1,29±0,30 µg/ml) ; donc moins active. Tandis que celle des fleurs la valeur d'IC₅₀ est de 6,74±0,27. L'extrait MeOH des fleurs est plus actif que celui des tiges.

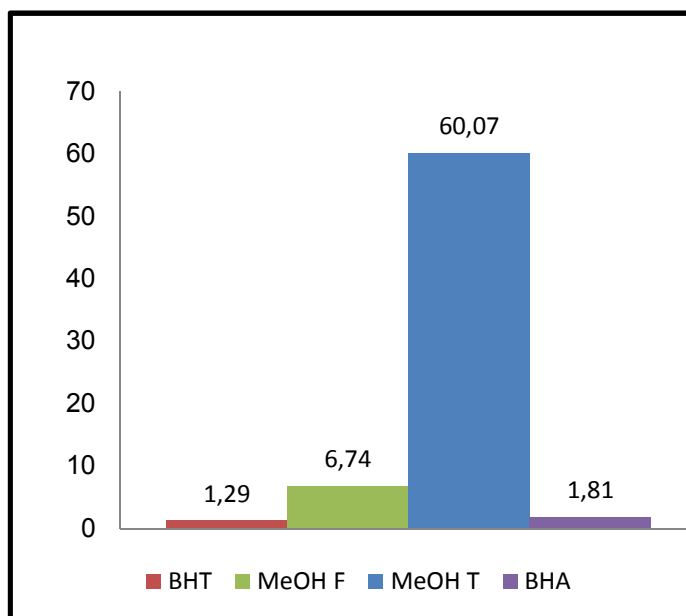


Figure 36 : Histogramme de deCl₅₀ des extraits des standards .

IV-3-Test avec CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

Extracts	Absorbances							
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	A _{0.50} (µg/mL)
MeOH fleur	0,25±0,0 4	0,43±0,0 1	0,69±0,0 2	1,24±0,0 5	2,06±0,0 7	2,78±0,3 9	3,12±0,1 5	16,43±0,42
MeOHTige	0,12±0.0 3	0,12±0.0 5	0,16±0.0 4	0,23±0.0 5	0,37±0.0 4	0,57±0.1 0	0,78±0.4 9	185,06±8,38
Concentration	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
BHA ^b	1,12±0,0 5	1,95±0,3 1	3,14±0,4 6	3,58±0,4 2	3,35±0,2 0	3,77±0,1 9	3,92±0,1 3	5,35±0,71
BHT ^b	1.41±0.0 3	2.22±0.0 5	2.42±0.0 2	2.50±0.0 1	2.56±0.0 5	2.86±0.0 7	3.38±0.1 3	8.97±3.94

Tableau 13: L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits *via* le test CUPRAC

BHA: Butylatedhydroxyanisole, EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

D'après les résultats du tableau on a trouvé une $A_{0.50}$ de $185,06 \pm 8,38$ de l'extrait MeOH des tiges, cette valeur supérieur à celles des standards BHT ($8,97 \pm 3,94$) et BHA ($5,35 \pm 0,71$) ; donc moins active. Tandis que celle des fleurs la valeur d' IC_{50} est de $16,74 \pm 0,42$.

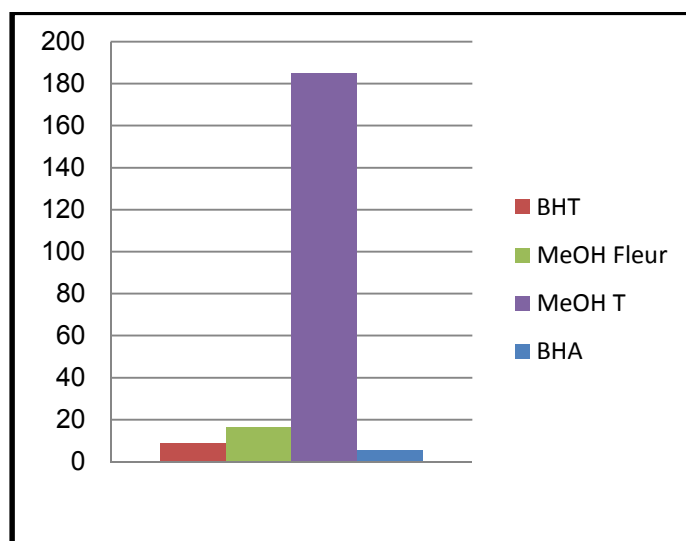


Figure 37 : Histogramme $A_{0.50}$ des extraits et des standards.

V- L'activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de l'extrait isolé des tiges de *Ephedra alata* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton. L'activité antimicrobienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur milieu MH (mm).

	Témoin Positif	Témoin Négatif	SM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
<i>Staphylococcus</i>	9	-	-	-	-	-
<i>Listeria</i>	8	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	18	-	9		8	-
<i>E.coli</i>	14	-	12	9	8	8

(-) non sensible

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactériens sont illustrés dans les figures suivantes :

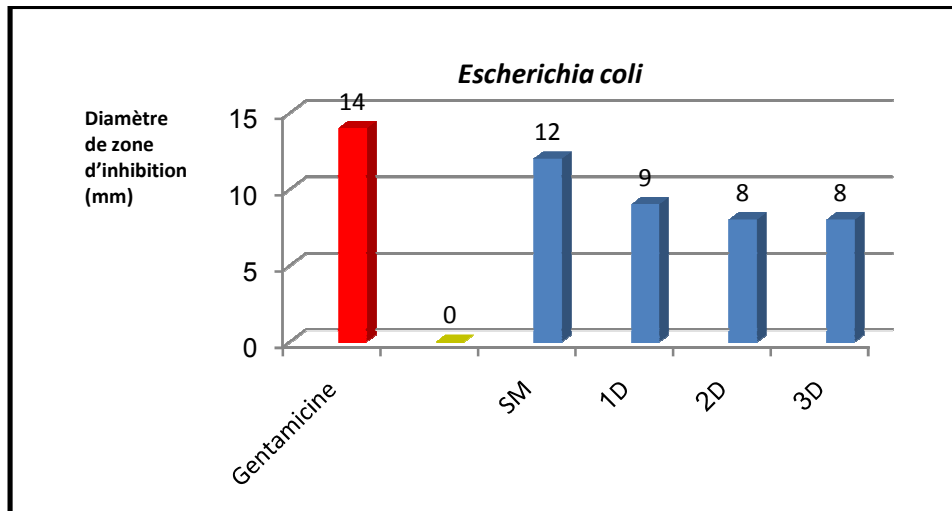


Figure 38: Histogrames de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de *Escherichia coli*.

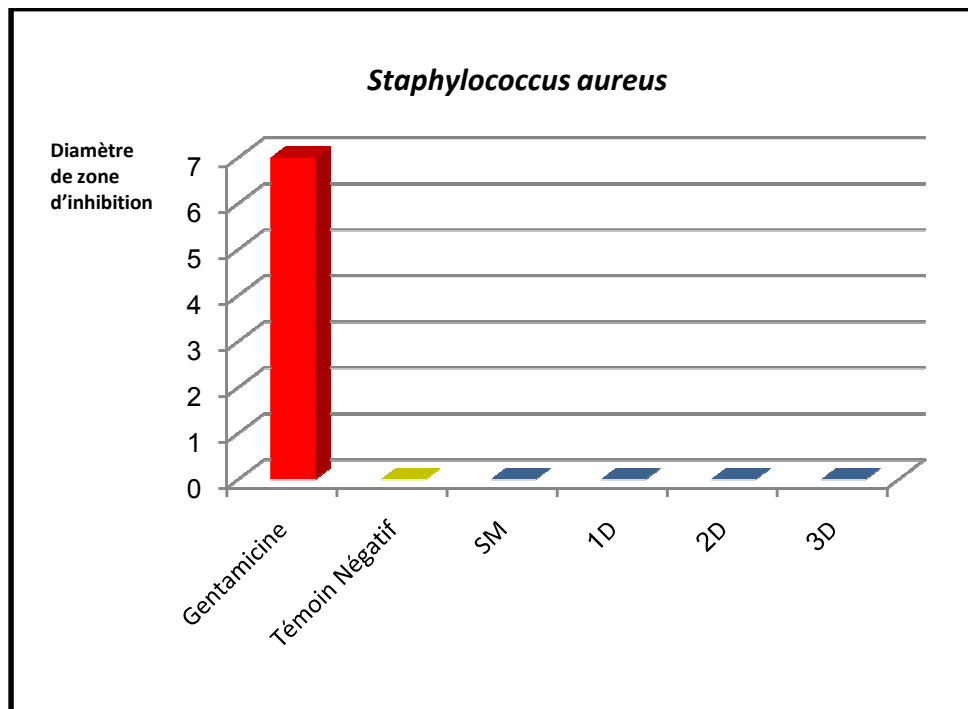


Figure 39 : Histogrames de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

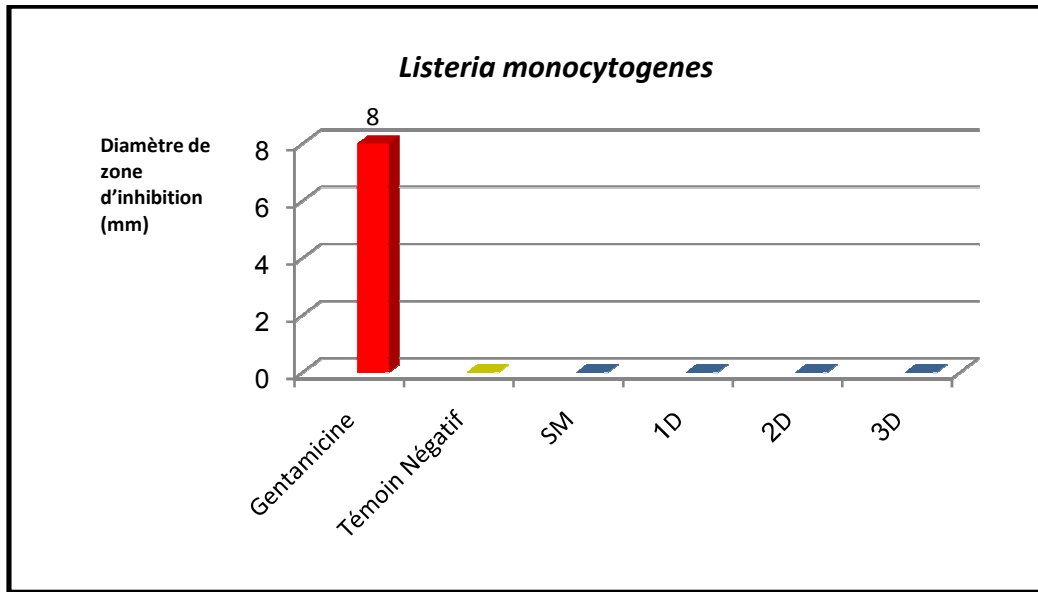


Figure 40 : Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de *Listeria monocytogenes*.

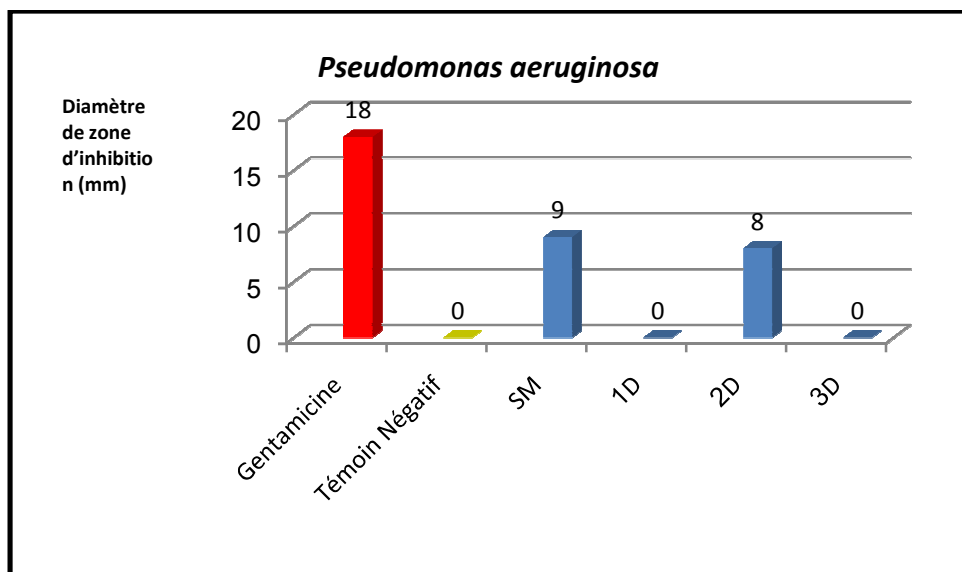


Figure 41: Histogrammes de diamètre de zone d'inhibition de l'extrait sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'analyse des données expérimentales montrent que comparativement aux contrôles, il y a une grande hétérogénéité dans les résultats. Les meilleures zones d'inhibition de l'extrait méthanolique d'*Ephedra alata* dans les bactéries de GRAM + sont pour *Escherichia coli* la meilleure zone et (12mm), et *Pseudomonas aeruginosa* (9mm) qui sont comparées avec les antibiotiques utilisés (gentamicine).

Par ailleurs, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* ont montré une résistance contre l'extrait méthanolique des tiges d'*E. alata*.

Les bactéries de gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) sont résistantes à l'extrait méthanolique de *Ephedra alata* par contre les bactéries de gram négatif sont sensibles.

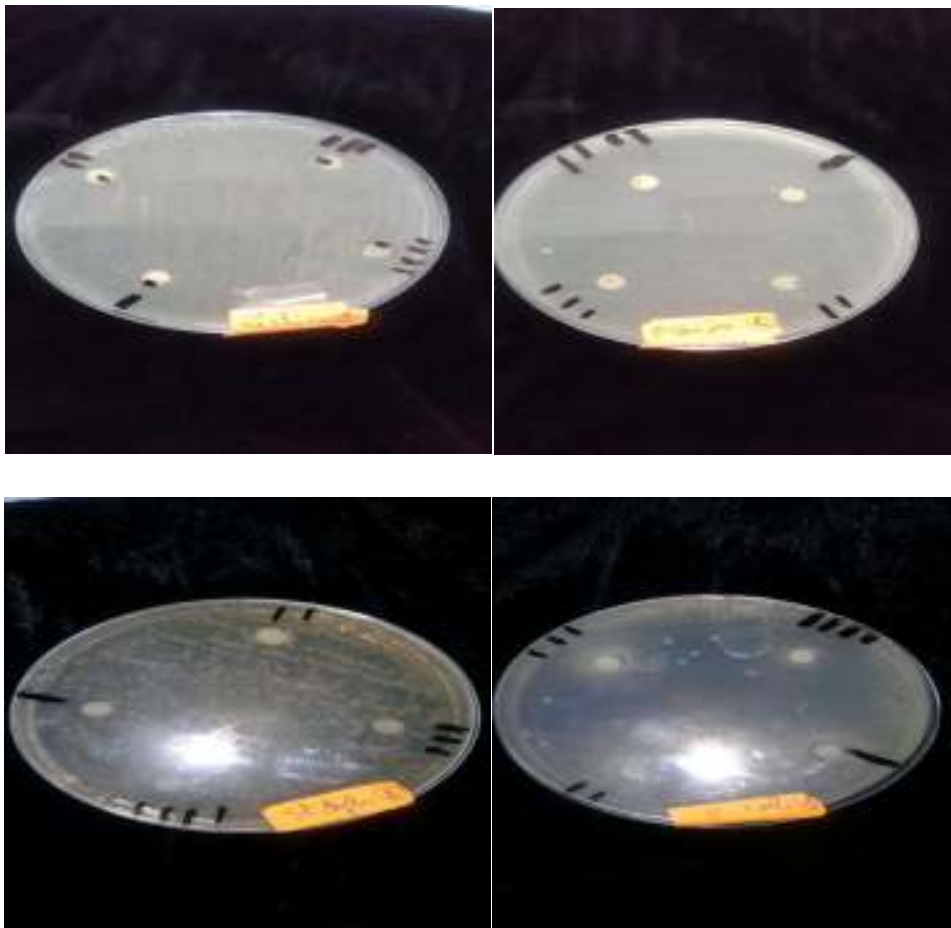


Figure 42 : Les résultats de l'activité antibactérienne.

VI- Activité anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation, l'activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait méthanolique des tiges de *Ephedra alata* consiste à évaluer le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de Sérum d'Albumine Bovin (BSA). Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées et les résultats sont comparés avec le diclofenac sodium (250ug/ml).

L'absorbance a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre UV –visible à 416 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{OD de test solution} - \text{OD de test control}}{\text{OD de test control}} \right] * 100$$

Le tableau montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait méthanolique des tiges d'*Ephedra alata* et le Diclofenac sodium qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA.

Tableau 15 : Les résultats de l'activité anti-inflammatoire.

	% inhibition de dénaturation des protéines
L'extrait méthanolique tiges <i>E.alata</i>	73
Diclofenac sodium	97,4

Les résultats des pourcentages d'inhibitions des extraits méthanoliques des fleurs et des tiges sont consignés dans le tableau suivant.

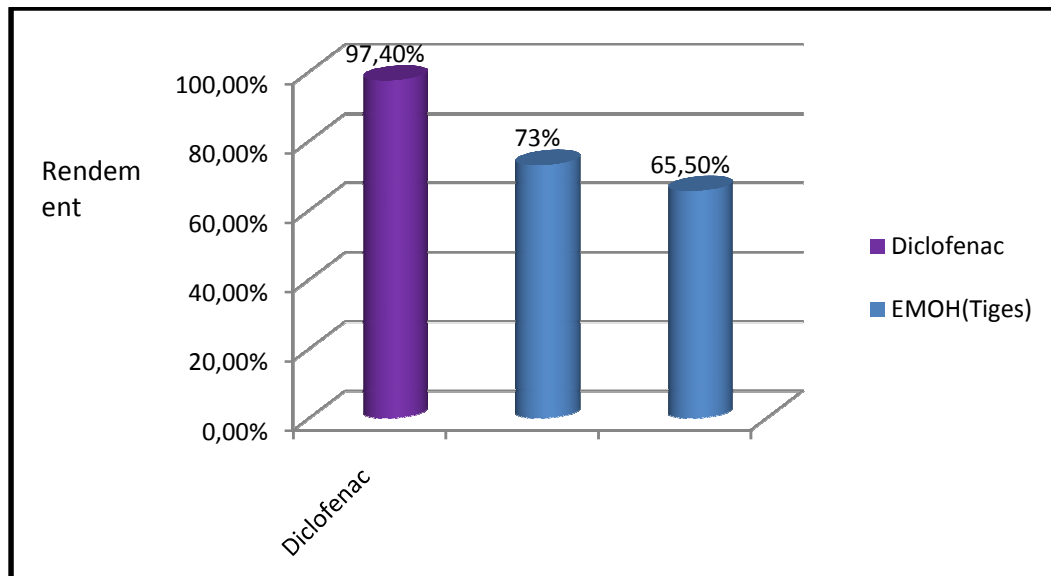


Figure 43: Histogramme de % inhibition de la dénaturation des protéines pour les deux extraits et diclofenac à 250ug/ml.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation est de 73% et 65,5% pour Me-OH des tiges et des fleurs respectivement. On constate que l' Me-OH des tiges est supérieur que celui des Me-OH fleurs avec une différence de 7% . Par contre celui du diclofenac sodium a exercé un pourcentage d'inhibition de 97,4% à la même concentration.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Begad et al.,2011**). La production d'auto-antigène dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintient la structure tridimensionnelle des protéines (**Sangeetha al.,2011**).

L'extrait de *Ephedra* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue (**Ling et al., 1995**).

D'après les résultats, on constate que les deux extraits sont capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. Cette inhibition peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins présents dans les deux extraits .



Conclusion et Prescriptives



Les métabolites secondaires des plantes médicinales occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments. A l'heure actuelle, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles par les plantes est encore une pratique bien vivante.

Dans le présent travail, notre plante a fait l'objet de quatre études, étude Phytochimique, activité antioxydante, activité antibactérienne et activité anti inflammatoire de l'extrait.

Le screening phytochimique a mis en évidence diverses classes de métabolites secondaires: alcaloïdes, polyphénols, tanins, saponosides, terpènes et les anthraquinones . Ainsi, le screening phytochimique est complété par la détermination de la teneur de flavonoïdes par différentes méthodes de l'extrait méthanolique qui ont révélés des teneurs de (27,29±1,03) mg EAG/mg

Nous avons étudié le pouvoir antioxydant par la capacité de piégeage du radical DPPH, ABTS, CUPRAC .En comparant les IC_{50} et $A_{0,50}$ de l'extrait testé par rapport aux standards, nous avons trouvé que

Pour l'extrait méthanolique : DPPH (IC_{50} = 184,01 μ g/ml), ABTS (IC_{50} = 60,07 μ g/ml) et CUPRAC ($A_{0,50}$ = 185,6 μ g/ml) ,les résultats obtenus montrent que l'extrait testé ont montré une activité antioxydant faible.

Selon les résultats obtenus dans notre travail, nous constatons que *E.alata* est Possède un teneurs moyenne des flavonoïde.

L'activité anti bactérienne e réaliser par la méthode de diffusion en milieu gélosé contre quatre souches bactériennes E-coli, S-aureus, P.aeruginosa, L.monocyte. Les résultats obtenus montrent une activité antibactérienne notée pour l'extrait méthanolique pour *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition (12mm ,9mm,8mm,8mm) respectivement et de *Pseudomonas aeruginosa* (9mm,8 mm) .

Alors le teste anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique *E.alata* possède une activité effet anti-inflammatoire de pourcentage 73%

Parmi les perspectives immédiates de cette étude est de :

- ❖ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif de médicament synthétique .
- ❖ Utiliser des techniques plus performantes telle que la HPLC et la GC-MS , ayant afin d'identifier les métabolites secondaires bioactives de nos plantes ainsi approfondir l'étude de l'activité biologique.

- ❖ L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante, antimicrobienne et anti inflammatoire de l'extrait de ce plante.



Références Bibliographiques



A

Abourashed E.A., El-Alfy A.T., Khan I.A. et Walker L., 2003- *Ephedra* in perspective—a current review. *Phytother. Res.*, Vol. 17, pp703-712

Abdel-Kader M.S., Kassem F.F., Abdallah R.M., 2003- Two Alkaloids from *Ephedra aphylla* growing in Egypt. *Natural Product Sciences*, Vol. 9; N° 2, pp. 1-4.

Achat S., 2013. Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse de doctorat : sciences alimentaires. Université A. Mira-Bejaia. p198.

Adarsh vm., ajay Kp., Kavitha d., Anurag Kb., 2011, Antidenaturation and antioxidant activities of annona cherimola in-vitro. *International Journal of pharma and Bio Sciences* 2011 ;2(2) .pp975-6299.

Adouane Selma., 2016. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès., Mémoire de magistère en sciences agronomiques, Univ Mohamed Khider – Biskra. p188 .

Al-Khalil S., Alkofahi A., El-Eisawi D., Al-Shibib A., 1998- Transitorine, a New Quinoline Alkaloid from *Ephedra transitoria*. *J. Nat. Prod.*, Vol. 61, pp.262-263

AL-Qarawi A.A., Abd_Allah E.F. et Abeer H., 2013- Effect of *Ephedra Alata* Decne. On lipids metabolism of *Aspergillus Flavus* Link. *Bangladesh J. Bot.* Vol. 42, N°1, pp 45-49.

AL-Qarawi A.A., Abd_Allah E.F. et Abeer H., 2011- *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, N°16, pp 2297-2303 .

Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T., Wakana D., Hyuga M., Hyuga S., Hanawa T. and Goda Y., 2013- Characterization of Phenolic Constituents from *Ephedra* Herb Extract. *Molecules*, Vol.18, pp5326-5334.

Andreasen M.F., Christensen L.P., Meyer A.S., et Hansen., 2000. Content of phenolic acids dehydrodimers in 17 rye (*Secale Cereale* L.) varieties, *J. Agric. Food Chem.* pp,2837-2000.

Aouadhi S. 2010. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes ,pp15-166.

Apak R., Guclu" K., Ozyurek M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocupronine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), pp 7970-7981.

Arshad H., Shadma W., Iffat Z., Sarfaraj H., 2010- Antibacterial Activity of the Leaves of *Coccinia indica* (W. and A) Wof India. *Advances in Biological Research*, Vol.4, N°5, pp241-248.

Atefeibu E.S.I ., 2002. Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'Acacia Nilotica Var Andesonii .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop deDaka . p33.

Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., & Khebri S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. *Lebanese Science Journal*, 11(1),pp 69-81.

Attou A., 2011- Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister." Produits naturels : Activités biologiques et synthèses". Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. p 93.

Awa N., 2003. étude de l'activité antidiabétique des extraits acétoniques, méthanoliques et Héxaniques de vernonia colorata (willd/ drake) composées chez des rats wistar. Thèse de Docteur en pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar 1/2

Axel G.; Seguin E.; Paris M. et Orecchiome A.M., 2001. Le préparateur en Pharmacie .Ed. Doin, Paris. p 273.

B

Badiaga M., 2012. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de docteur d'université , Mali.

Bagad YM .,Umarkar AR .,Tatia AU .,Surana SJ.,2011 . Investigation of anti inflammatory and analgesic activity of bridelia airyshawii (Euphorbiaceae) *J pharm Res* 2011 ;4(5) .pp1326-1332 .

Bahri F., 2014. Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles a caractères probiotiques a partir de selles d'enfants .thèse de doctorat . Université Constantine I, Constantine .p 147.

Baliere CH. 2016. les *Escherichia coli* potentiellement dans l'environnement thèse littoral :cas des stec et des Epec. Thèse de doctorat .Université de Bretagne occidentale, Brest .p180.

Barnes P. J.,1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecularmechanisms. *Clinical science*, 94(6), pp 557-572.

Bendif., 2017.Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae : *Ajuga iva*(L)Schreb, *Teucrium plium* L ,*Thymus munbyanus* subspcoloratus (boiss.et reut)greuter et burdet *rosmarinus criocalyx* jord et fourr.thèse de doctorat.l'école superieure de kouba Alger, p199.

Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use a stable Free Radical. *Nature*,4617(181), pp 1119-1200.

Boozer C.N., Nasser JA., Heymsfield S.B., Wang V., Chen G. et Solomon J.L., 2001- An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, Vol. 25; N°3, pp 316-324.

Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhar Z., Kilar F., Felinger A.,2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–massspectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: pp7972–7980.

Bouakaz I., 2006. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.

Bougandoura Nabila, 2011. Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraitsd'espèces végétales *Satureja calamintha ssp nepta* (nabta) et *Ajugaiva* L.(chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de magister. Université AbouBakrBelkaid Tlemcen. p 85.

Boughrara Boudjema.,2016. Inventaire et étude ethnobotanique et chimique desplantes à intérêt thérapeutiques et nutritif de parc nationale El-kala. Thèse de doctorat : phytochimie. Université Badji Mokhtar- Annaba .p 136.

Boulberrhana S., Nabti H., 2017.etude phytochimique et évaluations de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des deux plantes :*Artimisia compestris* L et *Ephedra alata* alenda staph.Thèse de doctorat .Université des frères Mentouri constantine .p 92.

Bravo L., 1998. Polyphenols : chemistry dietary sources; metabolism, and nutritionalsignificance. *Nutrition reviews*, 56(11): pp 317-333.

Bruneton J.,1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Cannas* A. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k.

Bruneton J.,1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, *Medicinal Plants*. Lavoisier Publishing, Paris pp367-370.

Burrowes J., 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI NorthAmerica flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp1) .pp718 -737.



Cano N.; Barnoud D.; Schneider S. M.; Vasson M. P.; Hasselmann M. et leverveX., 2006. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, p 255 .

Caveny S.,Charlet D.A., Freitqg H., Maier-Stolete M., et Starratt A.N., 2001.New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae).*American Journal of Botany*.Vol.88, N°7..pp1199–1208.

Chabi o., Keziz N., 2013.Effet in vitro de l'association de deux huiles essentielles de la Céfazoline et d'eucalyptol sur des bactéries .mémoire. université Abderrahmane Mira Béjaia,p66.

Chebili S., 2012. Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cystissus triflorus* l'Hérit et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydant.Mémoire de magister. Université de Boumer .p 104 .

Chung K-t et Wei C-I.,1998. Are tannins a double edged sword in biology and health?.*Trends in Food Science et Technology*, pp168-175.

Chung KT., Wong TY., Wei CI., Huang YW and Lin Y .,1998. Tannins and human health: aReview. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38(6), pp 421-64.

Cottiglia F., Loy G.,Garan D., Floris C., CasuM., PompeiR., Bonsignore, L. 2001. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedecine*, 8(4) .pp302-305.

Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N., 2010. Bioavailability of dietary flavonoidsand phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31 .pp 446–467.

Chebouat E., Dadamoussa B., Gharabli S., Gherraf N., Allaoui M., Cheriti A., Lahham A. et Zellagui A., 2014- Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. Der Pharmacia Lettre, Vol. 6, N°3, pp27-30.

Chen C.N., Weng M.S., Wu C., Lin J.k., 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanosoma cells. *Food Chemistry*, 1(2).pp 175-185.

Chen W.L., Tsai T.H., Yang C.C.H., Kuo T.B.J., 2010- Effects of *ephedra* on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 130, pp563–568 .

Cuvillon P., Viel E., 2002. Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë ? *Le Courrier de l'algologie (1)*, pp19-23.

Chemat F., 2011. Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs, Technique et Ingénierie, Ed Dunod.

D

Dahchar Z., 2017. Inventaire des culicidae de la région Ouest de la ville d'Annaba étude biologique systématique des espèces les plus abondantes lutte biologique anti larvaire par les extraits aqueux de quelques plantes médicinales et toxiques et le *Bacillus thuringiensis israelensis* H14 .thèse de Doctorat. université Badji Mokhtar Annaba ,p 286.

Davies J., 1994- Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*, Vol. 264, pp 375-382.

Derbel S., Touzard B., Triki MA. et Chaieb M., 2010- Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata ssp. alendato* fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora*, Vol. 205, pp 471–474 .

Diallo D., 2000., Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and Phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius (Aizoaceae)*, *Diospyros.*, Thèse de doctorat, Lausanne., pp148-176.

Dizadaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H., 2002. Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, pp 1102–1115.

Doerper, S 2008. Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L par une approche de génie métabolique. thèse de doctorat .laboratoire agronomie et environnement, p 199.

Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C., Dhaliwal K., 2012. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharm Ther.* pp 182-199.

Durrafourd. C, D'ervercourtie . L, and LAPRAZ J.C., 1990., Cahiers de phytothérapie clinique., 1.Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques., 2ème éd. Masson, Paris .

Dzidic S., Suskovic J. et Kos B.,2008- Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol*, Vol.46, N°1, pp11–21.

E

Evans W.C., 2009- Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).

Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferrero M. J. P., 2007. Selforganising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data . *Journal of brazilian chemical society.*, 18 (5) .pp 891-899.

Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly.,Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Elbidi A. ,2016. Contribution a l'étude phytochimique ,les activités biologiques (Antioxydants et antibactérienne) d'une plante médicinale Cleome arabica L. mémoire de master. Université Echahid hamma lakhder D'EL-OUED.p106.

F

Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension Des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.pp 108-115.

Facchini P.J., St-Pierre B., 2005. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic Enzymes . *Current Opinion in Plant Biology*.pp657–666.

Ferrari J., 2013. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat : Pharmacie. Université de Lausanne.p188.

Figueredo G., 2007. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, thèse présentée pour obtenir le grade de docteur d'université, université Blaise pascal.p15-17.

Ford Y.Y., Ratcliffe R. G., Robin R. J.,1996. In vivo NMR analysis of tropane alkaloid metabolism in transformed root and de-differentiated cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, Vol. 43, No. 1. pp115-120.

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



Gardès-Albert M., Dominique Bonnefont-Rousselot., Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D., 2003. Espèces réactives de l’oxygène: Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? *L’actualité chimique*. pp 91-96.

Ghanem S. et El-Magl .,2008., Antimicrobial Activity and Tentative Identification of Active Compounds from the Medicinal *Ephedra alata* Male Plant. *J T U Med Sc.*, Vol.3, N°1.p 7-15.

Ghedira K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle phytothérapeutique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4.p162-169.

Ghestem A., Segun E ., Paris M ., Orecchioni A-M., 2001.Le préparateur en pharmacie :Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. *Lavoisier Tec et Doc, Paris* .p 273.

Ghourri M., Zidane L., Douira A., 2013- Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.17.p 2388-2411.

Grezel P.; Cerletti C.; Guglielmini G.; Pignatelli P.; De Gaetano G. et Violi F.,2011. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J.of Nutr. Biochem.*, 22.p 201-211.

Govindarajan M., Sivakumar R., Rajeswary M., Yogalakshmi K., 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera:Culicidae). *Exp. Parasitol.* p 134

Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of “Rasayana” herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol.* pp 99-,165.

Goto S., Radak Z., 2013. Implication of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *J sport health Sci*, 2.p 75-80.

Graval S.P., 2010. Rôles des kinases IKK et IKK-related dans les maladies inflammatoires chroniques ; implications dans l’athérosclérose et la réponse hypoxique.thèse de doctorat: pharmacologie. Montréal : université de Montréal.

Guignard J.L.,1989.Abrégé de biochimie végétal.2ème édition. Ed. Masson.

Guignard J. L., Cosson L., Henry M., 1985. Abrégé de phyto-chimie. *Masson*, Paris. pp175-191.

Gambhire M ;Juvekar A ;Wankhede S ;2009.Evaluation of anti –inflammatory activity of methanol extract of *Barleria cristata* leaves by in vivo and in vitro methods .*The Internet Journal of Pharmacology* 7(1).pp1-4.

H

Hamdani D., 2012. Action des poudres et des huiles de quelques plantes aromatiques sur les paramètres biologiques de la bruche de Haricot *acanthoscelides obtectus* say. Coleoptera Bruchidae. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Mémoire en vue de l'obtention de magister en sciences biologiques.p 97.

Hartman T., 2007.,From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism., *Review. Phytochemistry* 68 .pp 2831–2846.

Haslam E., 1998-Practical polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and physiological Action. Ed. Cambridge University Press, *Cambridge.UK*.p 422.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry,metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13.pp572–584.

Havsteen, B.H.,2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* p96.

Headland S.E, Norling L.V., 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, pp1-12.

Hegazi G.A.E. et El-Lamey T.M., 2011- In vitro Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, Vol,1, N°8.pp158-163 .

Hichem CH ., 2012.Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane .thèse de doctorat .Université de Grenoble. p 291.

Hikino H., Konno C., Takata H., Tamada M., 1980- Antiinflammatory Principle of *Ephedra* Herbs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 28, N °. 10. pp 2900-2904

Hong J.R., Lin G.H., Lin C.G., Wang W.P., Lee C.C., Lin T.L., Wu J.L., 2002. Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. *Development*, 131(21).pp5417-5427.

Houmani M., Houmani Z., Skoula M., 2003. Intérêt de *Artemisia herba alba* Asso dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes. *Revue*, (151). pp 165-172.

Huang J. et Price R.A., 2003- Estimation of the Age of Extant *Ephedra* Using Chloroplast *rbcL* Sequence Data. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 20, N°3. pp435–440.

Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3. pp 276–285 .

Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P. 1998. Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.*, 49 (323) .pp 953- 965.

Hu S.G., Li L., He X.W., 2005. Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*. pp 31-37.

Hikino H., Takahashi M., et Konno C., 1982- Structure of ephedrannin a, a hypotensive principle of *Ephedra* roots. *Tetrahedron Letters*, Vol. 23, N°6. pp 673-676.

J

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E., Stevens P.F., 2012. Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris. p 383.

Jerbi A., Zehri S., Abdnnabi R., Gharsallah N., Kammoun M., 2016. Essential Oil Composition, Free-Radical-Scavenging and Antibacterial Effect from Stems *Ephedra alata* alenda in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*.

K

Kamra D.N., Agrwal N., Chaudhary L.C., 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series* .Vol.(1293).pp 156-163.

Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C., et al., 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLOS ONE*, 5. pp 953-959.

Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., 2005. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. p15.

Kebbab R., 2014. Etude de pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété chamlal : Evaluation de l'activité avant et après Deglycosylation. Mémoire de magister : Biochimie appliqué aux bio-industries. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. p 116.

Kebili Zohra., 2016. Contribution a l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Mémoire de magister : Biochimie et Analyse des Bioproduits. Université Kasdi Merbah-Ouargla.p 102.

Kessal A. et Bouafia O., 2003- Phytoscreening and antibactérial of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla.Mem. p. 66.

Khelfallah A., 2013. Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoirantioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. mémoire de magister : Biologie Appliquée. Université de Constantine 1.p 134.

Khenaka K., 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. pp19-24.

Konno C., Taguchi T., Tamada M. et Hikino H., 1979- Ephedroxane, anti-inflammatory principle of *Ephedra* herbs. *Phytochemistry*, Vol. 18. pp 697-698.

Krishna M., Upendra K.,2012. Enhancement of wound healing with roots of *Ficus racemosa* L. in albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2.pp 276-80.

Kessal A., et Bouafia O., 2003- Phytoscreening and antibactérial of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla.Mem. p 66.

Konkon N.G., Simaga D. et Adjoungova A.L., 2006- Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2006, Vol. 14. pp73-80.

L

Laib I., 2011. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *La vandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, université Mentouri Constantine. pp25- 27.

Lai M., 1984. Réévaluation des connaissances et représentation des parents d'enfants atteints de viroses saisonnières vis-à-vis de la prescription d'antibiotiques .thèse de doctorat. Université Paris Diderot, PARIS. pp 132.

Laure, F., 2005. Etude de la composition chimique et de la biodiversité du *Calophyllum urophyllum* de Polynésie française. Thèse de doctorat, Nice. p373.

Lee H.N., Surh Y. J., 2012. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol*, 84. pp 1340-1350.

Limberger R.P., Jacques ALB., Schmitt GC. et Arbo MD., 2013 - Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*. pp 1218- 1237.

Ling M., Piddlesden S. J., et Morgan B. P., 1995- A component of the medicinal herb *ephedra* blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. *Clinical & Experimental Immunology*, Vol. 102, N° 3. pp 582–588.

Luca V., Pierre B., 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Plant science Reviews*, Vol. 5, No. 4.

Lowy F. D., 2003- Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Science in Medicine*, Vol. 111. p.1265–1273.

Lagnika L., 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg)).

M

Majdalawieh A.F., Fayyad M.W., 2015. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *Int Immunopharmacol*. pp295-304.

Ma L., Liu Z., Zhou B., Yang L., & Liu, Z. 2000. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinesescience bulletin*, 45(22). pp 2052-2056.

Ma G., Bavadekar S.A., Davis Y.M., Lalchandani S.G. Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A., et Feller D.R., 2007- Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human

*a*₁- and *a*₂ Adrenergic Receptor Subtypes. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 322, N°1, pp 214- 221.

Malešev D. et Kuntić V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.*, 72 (10) .pp 921-939.

Mansour S., 2015. Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes medicinales: *Artemisia absinthium L, Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides* Etude in vivo. Thèse de doctorat : Biologie. Oran : Université des sciences et de la technologie Med boudiaf.

Matés J.M., Sánchez-Jiménez F., 1999. Antioxidants enzymes and their implications in Pathophysiologic processes. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 4. pp339–345.

Merghem R., 2009. Elément de biochimie végétale, 1ère édition. *Edition Bahaeddine.* pp149-158.

Miyazawa M., Minamino Y., et Kameoka H., 1997- Volatile Components of *Ephedra alata* Stapf. *Flavour And Fragrance Journal*, Vol. 12. pp15-17.

Mohammedi; 2013- Etude phytochimique et activités Biologique de quelques plantes médicinales de la region Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen. Algérie. p169.

Mohamed Soltan M. et Kamal Zaki A., 2009- Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 126. pp 102–107.

Mundaf., 2010. Identification de polyphéols , evaluation de leur Activite antioxydante et etude de leur proprietes biologiques.- Thèse de doctorat en chimie organique .Université Paul Verlaine-Metz .p55.

Molyneux P., 2004- The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, Vol, 26, N°2, pp211-219

N

Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, 33. pp 2-16.

Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* Vol.420. pp 846-852.

Nawwar M.A.M., El-Sissi H.I., Barakat H.H., 1984- Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, Vol. 23, N°. 12. pp 2937-2939.

Nawwar M. A. M., Barakat H. H., Buddrust J. et Linscheidt M., 1985- Alkaloidal, lignan and phenolic constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, Vol. 24, N°. 4. pp 818-819.

Noack M., Kolopp-Sarda MN., 2018. Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Fr Lab*, 489 (3). pp 28- 37.

Noguchi N., 2002. Novel insights into the molecular mechanisms of the antiatherosclerotic properties of antioxidants: the alternatives to radical scavenging. *Free Radic. Biol. Med.* 33. pp 1480–1489.



Ochocka R.J., Rajzer D., Kowalski ., LamparczykH. 1995. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. pp 197-202.

Ojala T., Rame S., Haansu P., Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuorela, P 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in finland. *Journal of Enthopharmacology*. pp299-305.

Okusa Ndjolo P., 2012- Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Thèse de doctorat." Sciences Pharmaceutiques". Université Libre De Bruxelles.p 26.

Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H., 2003- place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3. pp 47-51 .

Ozenda P., 1991- Flore et végétation du Sahara. *Centre National De La Recherche Scientifique*, Paris (3ème Ed.).p 662.



Park M.H., Kim D.H., Lee E.K., Kim N. D., Im D.S., Lee J., Yu B.P., Chung H.Y 2014. Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch Pharm Res.* 37. pp 1507-1514.

Paris M., Hurabielle M., 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1. *Masson, Paris*. pp256-284.

Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Pagliaro P. 2009. Cardio protection: A radical view Free radicals in pre and post conditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*. pp781–793.

Peronny S., 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI(Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .p151.

Peters C.M., O'Neill J.O. et Young J.B., 2005- Is there an association between ephedra and heart failure? a case series. *Journal of Cardiac Failure*,Vol. 11, N°1. pp 9-11.

Pham-Huy M., et Hébuterne X., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease andHealth. *International journal of Biochemical Science*, 4(2).pp 89-96.

Phinney K.W., Ihara T. etSander L.C., 2005. Determination of ephedrine alkaloidstereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal ofChromatography A*, Vol. 1077 . pp 90–97.

Pisoschi A.M., Pop A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97.p55-74.

Pibiri M., 2006- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne.p 161.

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

R

Raedschelders K., Ansley D.M., Chen D.D.Y., 2012. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133 .pp 230-255.

Raimi M. M., & Oyedapo, O. O., 2009. Bioactivity-guided evaluation of the root extract of *Plumbago zeylanica*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*.

Rakotonanahary M.,2012. thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, *université Joseph Fourier*. pp16- 28.

RispallN., NASH.R.& WEBB.K., 2005. Secondary metabolite profiling. *Lotus japonicus Handbook*,pp 341-348.

Rathinam V.A, Fitzgerald K.A., 2016. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, 165.pp792–800.

Repcak M., Imrich J., Fanekova M. 2001.Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. *Plant Physiol*. p158.

Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49.1pp 603–1616. .

Rhen T., & Cidlowski, J. A. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16).pp 1711-1723.

Risser A., Donovan D., Heintzman J., & Page T., 2009. NSAID prescribing precautions. *American family physician*, 80(12).pp1371-1378.

Robards K.A.; Paul D.; Prenzler A.; Greg Tucker B.; Prasan Swatsitang B. et William G., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidation processes in fruits. *Food chem.*, 66.ppp401-436.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. . *Free radical biology and medicine*, 26(9-10).pp1231-1237.

S

Shabana M.M., Mirhom Y.W., Genenah A.A., Aboutabl E.A. et Amer H.A., 1990- Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Arch Exp Veterinarmed.* Vol. 44, N°.3. pp389-394.

Sakagami H.; Hashimoto K.; Suzuki F.; Ogiwara T.; Satoh K.; Ito H.; Hatano T.; Takashi Y. et Fujisawa S., 2005. Molecular requirements of lignin carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66 (17) .pp 2108-2120.

Sangita C & priyank C., 2012. Evaluation of in-vitro ant-inflammatory. Vol.2 (suppl1) . pp178-180.

Sarkhel S., 2015. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria*. Toxicology Report, 2.ppp 1-3.

Schorderet M., 1992. Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. *OPU.* Alger. p 918.

Seifried H. E., Anderson DE., Fisher EI., Milner JA., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 18 .pp 567–579.

Shinde U. A., Phadke A. S., Nair A. M., Mungantiwar A. A., Dikshit V. J., & Saraf, M. N., 1999. Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70(3).pp251-257.

Smaga I., Niedzielska E., Gawlik M., Moniczewski A., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M., 2015. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Reports*, 67 .pp 569-580.

Soni M.G, Carabin I.G., Griffiths J.C., et Burdock G.A., 2004- Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicology Letters*, Vol. 150.pp 97–110.

Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii.; Zlabinger g.I., Neychev, H., 2007. Enhanced resistance to Salmonella enteric sero var typhimurium infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*. pp7-14.

Stevens A., Lowe J., 2009. Core Pathology. *Ed Mosby Elsevier*, China, pp50-54.

Sangita C., Priyanka C., Protapaditya D., Sanjib B., 2012. Evaluation of invitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein AsianPacific. *Journal of Tropical Biomedicine*. pp178-180.

T

Taguchi G., Fujikawa S., Yazawa T., Kodaira R., Hayashida N., Shimosaka M., Okazaki M., 2000. Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*. pp 153-161.

Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan d., Kavanagh K.,2007. Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*. pp 801-808.

Tlili Mohammed Laid, 2015. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister : biochimie et analyse de bioproduits. Université Kasdi Merbah – Ouargla. p 84.

Topnu G., Ay A., Bilici A., Sarikürkcü C., Öztürk M., Ulubelen A., 2007. A new flavones from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3) .pp 816-822.

V

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2009. Free radicals enhance metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1).pp1-40.

Vansant G.,2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Ed Institut Danone*.p 301.

W

Wang Q., Yang Y., Zhao X., Zhu B., Nan P., Zhao J., Wang L., Chen F.,Liu Z. et Zhong Y., 2006- Chemical variation in the essential oil of *Ephedra alata* from Northeastern China. *Food Chemistry*, Vol. 98. pp52–58.

Weill B, Batteux F, Dhainaut J 2003. Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris).pp 12-23.

Williams L., O'connar A., latore L., Dennis O & Ringer S., 2008.Anti -inflammatory. *West indian Med j.* Vlo.57.pp 327-331.

Winek., 2010. microbiologie.cours et question de révision. *dunod.*,p 159.

Wljehlm N., 1998.Botanique. générale., 10eme Ed., De boeck. Paris, *bruxelles.*,p 319.

Y

YARNELL E., 2006. Plant Chemistry in Veterinary Medicine: Medicinal Constituents and their mechanisms of action. *Veterinary Herbal Medicine*, p159.

Z

Zang X., Shang M., Xu F., Liang J., Wang X., Mikage M. et Cai S., 2013- A-Type Proanthocyanidins from the Stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and Their Antimicrobial Activities. *Molecules*, Vol.18, N°5. pp5172-5189.

Zerargui F., 2015. Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L.et caractérisation des substances bioactives .Thèse de doctorat : Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.p 126 .

Références électronique

- **Anonyme A** : www.annuaire-mairie.fr. (cons. Le 05 avril 2019)
- **Anonyme B** : www.google.dz/map. (cons. le 07avril 2019)



Annexe



Annexe

• **Test des alcaloïdes**

Réactif de Mayer :

Chlorure de mercure 1,36 g
Iodure de potassium..... 5 g
Eau distillée..... 100 ml

• **AlCl₃ 1%**

AlCl₃ 1

Eau distillée 100 ml

• **NaOH 10%**

NaOH 10g

Eau distillée 100 ml

• **FeCl₃ 1%**

FeCl₃ 2 g

Eau distillée 100 ml

• **Eau physiologique**

Chlorure de sodium 9g

L'eau distillée 1000 ml

Annexe B

Dosage totale du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)

Préparation des solutions :

- Pour 1 M potassium acétate (CH₃COOK) on dissolvé 9.80 gramme de (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution (S1).

- Pour 10% nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) on pèse 10g de ce produit dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S2).

Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin :

On prend 1 mg de la Quercetin et on le dissolvé dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0.2mg/ml Sm.

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercetin (25) 25 μ l Sm + 175 μ l MeOH

Quercetin (50) 50 μ l Sm + 150 μ l MeOH

Quercetin (75) 75 μ l Sm + 125 μ l MeOH

Quercetin (100) 100 μ l Sm + 100 μ l MeOH

Quercetin (125) 125 μ l Sm + 75 μ l MeOH

Quercetin (150) 150 μ l Sm + 50 μ l MeOH

Quercetin (175) 175 μ l Sm + 25 μ l MeOH

Quercetin (200) 200 μ l Sm + 0 μ l MeOH

50 μ l de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130 μ l [MeOH] +

10 μ l (S1) [CH₃COOK] + 10 μ l [Al(NO₃)₂, 9H₂O] + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

Master Académique Présenté par : Badis Afaf et Khemili Nora

Option : Biochimie appliqué

Soutenu le : 6-06-2019

Résumé:

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation d'une plante médicinale de la région de khenchela, *Ephed raalata alenda*, dotée d'une grande importance pharmacologique dans le monde et réputée par sa résistance à la sécheresse.

L'étude phytochimique a montré la présence de divers métabolites secondaires dans les tiges de la plante tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins, les saponosides et les terpènes.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a montré une forte activité l'extrait de la plante contre la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, et une faible activité inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.

L'évaluation du potentiel antioxydant de l'extrait par Trois méthodes différentes : le test de DPPH, le test ABTS et CUPRAC ont révélé une activité anti-radicalaire plus faible par rapport aux autres espèces de ce genre. La teneur des flavonoïdes est importante dans l'extrait méthanolique. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait est plus importante

Mots clés: *Ephedra alata alenda*, activité antibactérienne, DPPH, ABTS et CUPRAC, Flavonoïdes, anti-inflammatoire.

Président: Dr. BOUAKKZAMEL MAB . Univ. Abbès Laghrour Khenchela

Promoteur: Dr. HABIBATNI Sofian MAB . Univ. Abbès Laghrour Khenchela

Examineur Examineur : Dr. DJEMIL Randa MAB . Univ. Abbès Laghrour Khenchela

Lieu de travail : Laboratoire de l'université Abbès Laghrour – Khenchela-

CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie) – Constantine-

Années universitaires : 2018-2019