

Popular Democratic Republic of Algeria  
Ministry Of High Education and Scientific Research  
Abbes Laghrour University, Khenchela  
Faculty of Natural and Life Sciences  
Department Of Cellular and Molecular Biology

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة عباس لغرور خنشلة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا الخلوية و الجزيئية



## Mémoire MASTER ACADEMIQUE

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**Présenté par : Nezzar Houda, Guenis Yassamina**

**Thème**

**Caractérisation phytochimique et évaluation des  
activités biologiques des extraits de deux plantes de  
la région d'Aures '*Ephedra Alata* et *Ajuga iva*'**

**Devant le jury :**

<b>Présidente : Dr. KRIM Meriem</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Khenchela</b>
<b>Encadrant : Dr. BOUHALIT Samira</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Khenchela</b>
<b>Examinatrice : Dr. ARAB Yasmine</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Khenchela</b>

**Année universitaire 2023/2024**

# Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et pour m'avoir accordé la Volonté et le courage pour élaborer ce travail.

Je tiens à remercier vivement **M<sup>me</sup>Bouhalit Samira** maître de conférences classe A à université Abbés Laghrour-Khenchela, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, sa compréhension, sa compétence, la qualité de ses conseils et son aide durant tout le long de mon mémoire.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres de jury ; d'avoir accepté d'évaluer ce travail ; **Dr KRIM Meriem** d'être présidente du jury de soutenance, et **M<sup>me</sup> ARAB Yasmine** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mon profond remerciement aussi à l'équipe de laboratoire pédagogique de Biologie de l'université de Khenchela pour l'aide qu'ils m'ont donné et les efforts déployés pour faciliter mon travail.

Enfin, je remercie tous les enseignants durant ce long cycle de formation, et tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

Avant tout, je remercie Allah, le Tout-Puissant et le Majestueux, qui m'a guidé vers un avenir prometteur, incha'Allah, et m'a donné la volonté, la patience et le courage de terminer mes études universitaires et de réaliser ce travail qui est le fruit de nombreuses années.

Du fond du cœur, je dédie ce travail aux personnes précieuses qui illuminent ma vie. Des trésors inestimables que je chéris profondément.

À ma chère et héroïque **mère** : Avec toutes ces paroles remplies de tendresse et d'émotion, à ma mère, force inébranlable, mon amour éternel et ma reconnaissance pour les sacrifices que tu as faits pour accepter mon éducation et mon bien-être.

Je dédie ce mémoire à mon cher **père** : Que Dieu ait pitié de lui.

J'offre mon amour et ma gratitude à mon héros, mon cher frère, et à ma source constante d'inspiration, mon frère **Didou**, tu es mon soutien et mon compagnon dans cette vie. Je t'aime, mon deuxième père.

À ma chère sœur **Djamila** : J'ai trouvé en toi tout l'amour, le réconfort et le soutien possibles. Grâce à vous, j'ai trouvé le courage et la force de continuer.

A ma meilleure amie **Baraa** : grâce à toi pour tout

Ô l'ancre de ma vie, à mon modèle de vie et à ma deuxième mère, **le docteur Chamia**, je t'aime, je n'ai pas les mots pour exprimer combien je t'aime.

Et à son mari respecté, vous avez tout mon respect et mon appréciation, **Oncle Haroun**, que Dieu vous protège et guide vos pas.

À mes petits cœurs, mes frères : (**Israa, Abdel Djalil, Abdel Momen, Sirine, Aseel**).

À mon cher grand-père, que Dieu le protège et le garde : **Al-Taheer**.

À ma chère amie et compagne : **Rabab**.

À mes fleurs et princesses : **Jasmine, Maya**.

À ma compagne dans ce travail : **Yassamina**.

À mes amis : (**Lamia, Farah, Lamisse**) L'amitié entre amis dans le cœur. Merci.

À mes petits oiseaux : **Karim, Sifo, Muhammad, Adem, Youssef, Bouchra et Sirin**.

**HOUDA**

## *Dédicace*

Je remercie Dieu qui m'a ouvert la porte de la connaissance, m'a aidé à la franchir et m'a donné santé et courage.

Pour y arriver.

Je dédie mon diplôme et ma joie à la fleur que nous attribuons et parfumons mes jours, ma mère, la lumière de mes yeux, et mon père, la joie de mon cœur, qui m'a soutenu jour et nuit pendant mon voyage, et a contribué avec tout leur amour pour arriver là où je suis aujourd'hui. Que Dieu prolonge leur vie et leur accorde le bien.

En ce jour, je me souviens d'Issam, que Dieu ait pitié de lui. Je dédie mon travail à mes frères qui m'ont encouragé et m'ont donné confiance. Abeer, Faryal et Jalal. Je remercie et chéris mes amis et mes compagnons, Houda, Lamisse, Salima, Zahra, Majda, Manar et Samira, et tout le meilleur que je leur souhaite.

Je remercie également tous ceux qui m'ont soutenu, ne serait-ce qu'un mot, et je ne les ai pas écrits à tous mes professeurs de l'Université Abbas à cause de cela. L'arrogance de Khenchela.

À tous mes collègues de la promotion de Master en Biochimie Appliquée, et à tous ceux qui me connaissent, je dédie cet humble ouvrage.

Yassamina

## Résumé

---

---

### *Résumé*

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous avons mené une étude sur deux plantes très utilisées par la population locale pour leurs propriétés thérapeutiques l'*Ephedra alata alenda* et *Ajuga iva*. L'objectif de notre étude consiste à mettre en évidence la composition phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et anti-microbienne, des extraits aqueux et éthanoliques de ces deux plantes médicinales. L'analyse qualitative par screening phytochimique et chromatographie sur couche mince (CCM) montre leurs richesses en métabolites secondaires (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, terpanoïdes, saponosides...). L'estimation quantitative des flavonoïdes et des polyphénols totaux par méthodes colorimétriques a montré que les extraits de la plante sont riches en ces composés. Pour l'évaluation l'activité antioxydante en utilisant les tests *in vitro* (DPPH, ABTS) a montré que les extraits éthanoliques des feuilles d'*Ephédra alata* ont un effet antioxydant remarquable et plus puissant. Les tests sur l'activité anti-inflammatoires *in vitro* par la méthode d'inhibition de la dénaturation de SAB, indiquent que les extraits des deux plantes ont une activité anti-inflammatoire importante. Cependant, les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique testées par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé sur les extraits aqueux et éthanoliques des deux plantes à 100 mg/ml n'ont pas permis d'obtenir des effets contre la croissance des souches bactériennes de Gram+ (*Staphylococcus aureus*), 3 souches Gram- (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillose cereus*) et les champignons (*Aspergillus niger*, *Candidat albicans*). En effet cette étude a révélé que l'*Ephedra alata alenda* et *Ajuga iva* sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle, possèdent vraiment une capacité antioxydante et anti-inflammatoire.

**Les mots clés :** *Ephedra alata*, *Ajuga iva*, activité anti-oxydante, activité anti-inflammatoire, activité anti-bactérienne, anti-fongiques.

## Abstract

---

---

### *Abstract*

As part of the promotion of Algerian flora, we carried out a study on two plants widely used by the local population for their therapeutic properties, namely *Ephedra alata alenda* and *Ajuga iva*. The objective of our study is to highlight the phytochemical composition and the evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and anti-Microbial activity of the aqueous and ethanolic extracts of these two medicinal plants. Qualitative analysis by phytochemical screening and thin layer chromatography (TLC) shows their richness in secondary metabolites (alkaloids, tannins, flavonoids, terpanoids, saponosides, etc.) Quantitative estimation of flavonoids and total polyphenols by colorimetric methods showed that plant extracts are rich in these compounds. For the evaluation of antioxidant activity using in vitro tests (DPPH, ABTS) showed that the ethanolic extracts of *Ephedra alata* leaves have a remarkable and more powerful antioxidant effect. Tests on anti-inflammatory activity in vitro using the SAB denaturation inhibition method indicate that the extracts of both plants have significant anti-inflammatory activity. However, the results of antibacterial and antifungal activity tested by the disk diffusion method in gel medium on the aqueous and ethanolic extracts of both plants at 100 mg/ml did not provide effects against the growth of Gram<sup>+</sup> bacterial strains (*Staphylococcus aureus*) and 3 Gram<sup>-</sup> strains (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillose cereus*) and two fungi (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*). Indeed, this study revealed that *Ephedra alata alenda* et *Ajuga iva* are plants used in traditional medicine, truly possess antioxidant and anti-inflammatory capacity.

**Keywords:** *Ephedra alata*, *Ajuga iva*, antioxidant activity, anti inflammatory activity, antibacterial activity, antifungal activity.

كجزء من تقدير النباتات الجزائرية، أجرينا دراسة حول نباتين يستخدمهما السكان المحليون على نطاق واسع لخصائصهم العلاجية، وهما الأليندا والعجوة الإيفا. هدف دراستنا هو إبراز التركيب الفيتوكيميائي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والتهابات الأنسجة والبكتيرية للمستخلصات المائية والكحولية لهاتين النباتين الطبيتين. أظهر التحليل النوعي بواسطة الفحص الفيتوكيميائي والكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) غناهما بالمركبات الثانوية (القلويدات، التانينات، الفلافونويدات، التيربينويدات، الصابونينات، إلخ). أظهرت التقديرات الكمية للفلافونويدات والبوليفينولات الكلية بواسطة الطرق اللونية أن مستخلصات النبات غنية بهذه المركبات. بالنسبة لتقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبارات in vitro (DPPH، ABTS) أظهرت المستخلصات الكحولية لأوراق الإفيدرا الألبة تأثيرًا مضادًا للأكسدة ملحوظًا وأكثر قوة. أما اختبارات النشاط المضاد للالتهابات in vitro باستخدام طريقة تثبيط تحلل البروتين بواسطة SAB، فأشارت إلى أن المستخلصات لكل من النباتين لديها نشاط مضاد للالتهابات ملحوظ. ومع ذلك، لم تسمح نتائج اختبار النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات باستخدام طريقة انتشار الأقراص في وسط على المستخلصات المائية والكحولية للنباتين بتركيز 100 ملغ/مل، لم تسمح الدراسة بالحصول على تأثيرات ضد نمو سلالات البكتيريا الجرام إيجابي (*Staphylococcus aureus*) و 3 سلالات جرام سالب (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillose*) وفطرين (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*). في الواقع، كشفت هذه الدراسة أن *Ajuga iva* و *Ephedra alata*، وهما نباتات تستخدم في الطب التقليدي، تمتلك حقا قدرة مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات.

**الكلمات الرئيسية:** *Ajuga iva*، *Ephedra alata*، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للالتهابات، نشاط مضاد للبكتيريا، مضاد للفطريات.

## Liste des figures

---

---

### Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Photo de la plante <i>Ephédra alataalenda</i> .....	12
<b>Figure 2.</b> Histogramme des teneurs en polyphénols Ces valeurs représentent les moyennes des trois répétitions.....	41
<b>Figure 3.</b> Histogramme des teneurs en flavonoïdes. Ces valeurs représentent les moyennes des trois répétitions.....	42
<b>Figure 4.</b> Pourcentage d'inhibition d' <i>Ephedra alata</i> (tiges feuillées).....	44
<b>Figure 5.</b> Pourcentage d'inhibition d' <i>Ephedra alata</i> (grain).....	44
<b>Figure 6.</b> Pourcentage d'inhibition d' <i>Ajugaiiva</i> .....	44
<b>Figure 7.</b> Histogramme représentant les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits et standards obtenus par le test DPPH. ....	45
<b>Figure 8.</b> Courbe des pourcentages d'inhibition d'Ephédra alata (Tiges feuillés) .....	47
<b>Figure 9.</b> Courbe des pourcentages d'inhibition d' <i>Ephédra alata</i> (graines) .....	47
<b>Figure 10.</b> Courbe des pourcentages d'inhibition d' <i>Ajuga iva</i> ).....	48
<b>Figure 11.</b> Histogramme représentant les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits et standards obtenus par le test ABTS .....	49
<b>Figure 12.</b> Activité d'inhibition de la dénaturation des protéines de l'albumine sérique bovine des extraits d' <i>Ephedra alata</i> et d' <i>Ajuga iva</i> .....	50

## Liste des Photographie

---

---

### Liste des Photographie

<b>Photographie 1.</b> Photo d' <i>Ajuga iva</i> L. partie végétative et racine, et photo de fleurs. ....	17
<b>Photographie 2.</b> La partie aérienne d' <i>Ephedra alata</i> et d' <i>Ajuga iva</i> , séché et broyée .....	21
<b>Photographie 3.</b> La préparation d'extrait éthanolique .....	33
<b>Photographie 4.</b> Chromatographie sur couche mince des extraits éthanolique et aqueux des <i>Ephédra alata</i> , <i>Ajuga iva</i> révéler sous UV à 365nm et 254nm. ....	38

## Liste des tableaux

---

---

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification systématique de sous espèce <i>Ephédra alataalenda</i> .....	11
<b>Tableau 2.</b> Classification systématique de sous espèce <i>Ajuga iva</i> .....	16
<b>Tableau 3.</b> Liste des souches bactériennes utilisées .....	22
<b>Tableau 4.</b> Représente la couleur et l'aspect des extraits éthanoliques et aqueux .....	33
<b>Tableau 5.</b> Rendement d'extraction de plante <i>Ephédra alataalenda</i> et <i>Ajugaiva</i> .....	34
<b>Tableau 6.</b> Mise en évidence de la présence ou l'absence de certaines classes de métabolites secondaires dans l'espèce <i>E. Alata</i> et <i>Ajuga Iva</i> .....	35
<b>Tableau 7.</b> Résultats de la CCM pour les deux phases aqueuse et organique des feuilles et graines d'Ephédra et <i>Ajugaiva</i> avec coloration en $AlCl_3$ .....	38
<b>Tableau 8.</b> Dosage des poly phénols et des flavonoïdes des extraits éthanolique et aqueux d'Ephédra alata et d' <i>Ajugaiva</i> .....	40

## Liste des abréviations

---

---

### Liste des abréviations

- ABTS : Acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
- AG: Acide gallique.
- AlCl<sub>3</sub>: Trichlorure d'aluminium.
- BSA : Sérum bovine albumine.
- CCM : Chromatographique sur Couche Mince.
- DMSO : Diméthylsulfoxyde.
- DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle).
- E aq : extrait aqueux nm : nanomètre
- E eth : extrait éthanolique
- IC50 : Concentration inhibitrice 50
- NH<sub>4</sub>OH : Ammoniaque
- nm : nanomètre
- pH : Potentiel Hydrique
- R % : Rendement en %
- R : Rendement exprimé.
- Rf : Rapport frontal.
- UV : Ultraviolet
- $\mu$ g EAG / mg E : Equivalent microgramme acide gallique par mg d'extrait.
- $\mu$ g EQ / mg E : Equivalent microgramme de quercétine par mg d'extrait.
- % : Pourcentage d'inhibition
- (-) : négatif, Absence
- (+) : positif, Présence
- / : non testé
- °C : Degré Celsius

# *Table des matières*

# Table des matières

---

---

## Table des matières

**Remerciement**

**Dédicace**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Liste des figures**

**Liste des Photographie**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

Introduction Générale ..... 1

### ***Chapitre I : Stress oxydant***

I.1. Définition du stress oxydant..... 4

I.1.1. Les radicaux libres..... 4

I.1.2. Antioxydants..... 5

I.1.3. Pathologies liées au stress oxydatif ..... 5

### ***Chapitre II : Métabolites secondaires***

II.1. Définition de métabolites secondaires ..... 7

II.2. Classification ..... 7

II.2.1. Les composés phénoliques ..... 7

II.2.1.1. Phénols simples ..... 7

II.2.1.2. Polyphénols ..... 8

II.2.2. Les Terpénoïdes ..... 9

II.2.3. Les alcaloïdes ..... 9

### ***Chapitre III : Le genre Ephedra***

III.1. Le genre *Ephedra* ..... 11

## Table des matières

---

---

III.2. Description botanique de l'espèce <i>Ephédra alata</i> :.....	11
III.3. Composition chimique.....	12
III.4. Utilisation en médicinale.....	12
III.5. Pharmacologie.....	13
III.6. Toxicologie :.....	14
III.7. Activités biologiques de la plante :.....	14

### *Chapitre IV : Le genre *Ajuga**

IV.1. Généralité.....	16
IV.2. Description botanique.....	16
IV.3. Composition chimique d' <i>Ajuga iva</i> .....	17
IV.4. Utilisations d' ivette.....	17
IV.5. Toxicité.....	18
IV.6. Activités biologiques d' <i>Ajuga iva</i> .....	18

### *Matériel et méthodes*

V.1. Matériel.....	21
V.1.1. Matériel végétal.....	21
V.1.2. Matériel biologique les souches bactériennes.....	22
V.1.2.1. Les souches bactériennes testées.....	22
V.2. Méthodes :.....	22
V.2.1. Préparation des extraits.....	22
V.2.1.1. Préparation d'extrait aqueux par infusion.....	22
V.2.1.2. Préparation d'extrait aqueux par décoction.....	22
V.2.1.3. Préparation d'extrait éthanolique.....	23
V.2.2. Analyse qualitative.....	23
V.2.2.1. Etude phytochimique.....	23
V.2.2.2. Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince :.....	25
V.2.3. Analyse quantitative.....	27

## Table des matières

---

---

V.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux .....	27
V.2.3.2. Dosage des flavonoïdes .....	27
V.2.4. Dosage de l'activité antioxydant : .....	27
V.2.4.1. Teste du DPPH radical libre .....	27
V.2.4.2. Tests de l'ABTS.....	28
V.2.5. Activité anti-inflammatoire .....	29
V.2.6. L'activité anti-microbienne.....	30
<b><i>Résultats et discussion</i></b>	
VI.1. Détermination du rendement d'extraction : .....	33
VI.2. Screening photochimique des extraits.....	35
VI.3. Chromatographie analytique sur couche mince : .....	37
VI.4. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes : .....	40
VI.5. Activité antioxydante .....	43
VI.5.1. Évaluation de l'activité antioxydant de DPPH .....	43
VI.5.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS : .....	47
VI.6. L'activité anti –inflammatoire : .....	49
VI.7. L'activité anti-microbienne .....	51
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>54</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>57</b>
<b>Annexes</b>	

# *Introduction*

# Introduction

---

---

## Introduction Générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs, ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Boudjouref, 2011**).

Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est répandu dans certains pays du monde, notamment les pays en voie de développement, en raison de l'absence d'un système médical moderne, mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins 25 % de tous les médicaments modernes sont issus directement ou indirectement de plantes, grâce à l'application de technologies modernes de savoir traditionnel (**El hafian et al., 2014**).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation ou comme des anti-inflammatoires, et des anti-analgésiques (**Sarri et al., 2014**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et vise à étudier les activités biologiques antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-microbiennes des extraits de deux plantes médicinales *Ephédra alata* et *Ajugaiva*. Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'extraits à qualité médicale intéressante, pour ses effets bénéfiques dans le traitement de différentes maladies telles que le désordre gastro-intestinal, les troubles cardiovasculaires, l'hypertension et le diabète. Son rôle est dû généralement aux métabolites secondaires qu'elle contient, notamment les flavonoïdes (**Mohamed et al., 2010 ; Bouyahya et al., 2020**).

Cette étude sera subdivisée en trois parties :

- ✓ Une première est une synthèse bibliographique : Le premier chapitre est consacré à un rappel sur le stress oxydatif et radicaux libres. Nous avons ensuite abordé un deuxième chapitre sur les métabolites secondaires. Dans le troisième chapitre, est consacré à une synthèse sur les espèces végétales étudiées.
- ✓ La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental.

## Introduction

---

---

- ✓ La troisième partie de ce mémoire expose l'ensemble des résultats obtenus et la discussion.

Elle traite 3 parties :

- La première sert à l'étude des méthodes d'extraction, le screening phytochimique et la caractérisation des métabolites des extraits organiques et aqueux des deux plantes en utilisant la CCM.
- La deuxième sert à l'évaluation quantitative des taux de polyphénols et flavonoïdes totaux l'activité.
- La dernière sert à l'évaluation des activités biologiques *in vitro* consistant en l'évaluation de l'activité antioxydant, anti-inflammatoire, anti-bactérienne et anti-fongique des extraits aqueux et organiques issus des tiges feuilletées et des graines d'*Ephédra alata* et des feuilles de la plante *Ajuga iva*.

Enfin, nous présenterons les résultats obtenus qui seront suivis de leurs discussion et une conclusion générale qui englobe l'ensemble des résultats de nos travaux.

# *Chapitre I : Stress oxydant*

**I.1. Définition du stress oxydant**

Le stress oxydant est défini par l'incapacité de l'organisme de se défendre contre diverses espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ses derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (**Bensakhria, 2018**).

Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (**Barouki, 2006**).

**I.1.1. Les radicaux libres**

Un radical libre est une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés extrêmement instable, ce sont des espèces électrophiles de courte durée de vie (quelques nanosecondes), elles font partie des systèmes ubiquitaires ayant une réactivité chimique délétère à l'égard des biomolécules, cette réactivité est inversement proportionnelle au pouvoir oxydant ( $\text{OH}^\circ > \text{RO}^\circ > \text{HOO}^\circ > \text{ROO}^\circ$ ). Les radicaux peuvent réagir avec des composants cellulaires (ADN, lipides, protéines...) aboutissant à des lésions cellulaires irréversibles, mais dans des conditions physiologiques agissent comme des substances de signal importantes en plus de l'utilité dans la défense chez les bactéries (**Chahine, 2014 ; Jdidi, 2015**).

La génération de radicaux libres implique plusieurs voies typiques telles que la lumière (**Ohtsuki et al., 2015**), la chaleur (**Wang et al., 2017**), la sonication (**Mohapatra et al., 2017**), le rayonnement (**Zhang et al., 2014**), les réactions redox (**Buck et al., 2013**) et l'électrolyse (**Tang et al., 2019**). En chimie, les radicaux libres sont ceux bio intermédiaires liés à divers processus chimiques, dont la polymérisation radicalaire (**Magennis et al., 2014**), la catalyse (**Whittaker, 2003**) et la chimie atmosphérique (**Orlando et al., 2003**). Les ERO jouent le rôle de seconds messagers, régulant plusieurs processus physiologiques moléculaires cellulaires et tissulaires. Elles participent dans la défense antibactérienne, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la transduction de signaux cellulaires, le développement embryonnaire, la croissance... (**Gamet et Laurence, 2011**).

Le stress oxydatif a des conséquences biologiques très variables selon la dose et le type cellulaire. Le stress oxydant peut dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (**Curtin et al., 2002**). De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydatif : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression (**Favier, 2003**).

### **I.1.2. Antioxydants**

Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce dernier (**Pastre et Priymenko, 2007**). Afin d'empêcher la formation des radicaux libres et de limiter l'oxydation qui provoque les dommages oxydants dans les cellules, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense, à savoir : enzymatiques (Superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase.) et non enzymatique (glutathion (GSH), tocophérol, l'acide ascorbique...), les caroténoïdes et les flavonoïdes (**Valko et al., 2007**).

### **I.1.3. Pathologies liées au stress oxydatif**

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution (**Bashan et al., 2009 ; Vanessa et al., 2013**). Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. (**Sohal et al., 2002 ; Delattre et al., 2005**). Lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles, altérant ainsi le statut redox normal et conduisant à un stress oxydatif accru (**Rahman, 2007**). Parmi les pathologies liées au stress oxydant les maladies neurodégénératives ; Alzheimer (**Aruoma, 2003**) et Parkinson (**Pizza et al., 2013**), les maladies du foie ; fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire (**Shin et al., 2013**), les maladies cardiovasculaires ; Athérosclérose, hypertension (**De Marchi et al., 2013**), les maladies respiratoires ; bronchospasme aigu, emphysème, asthme (**Kusano et Ferrari, 2008**), les maladies de l'oeil: cataracte (**Chakraborty et al., 2007**), le diabète (**Mima, 2013**), le cancers (**Kaushal et kudva, 2013**) et l'obésité (**De Marchi et al., 2013**).

## ***Chapitre II : Métabolites secondaires***

## **II.1. Définition de métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (**Boudjouref, 2011**). Elles sont caractérisées généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (**Newman et Cragg, 2012**). Ces composés ne sont pas nécessaires à la vie de la plante et n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante mais ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (**Peeking et al., 1987 ;Guignard,1996**). Les métabolites secondaires se caractérisent par une énorme diversité chimique et représentent également une source importante de produits pharmaceutiques (**Bourgaud et al., 2001**).

## **II.2. Classification**

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (**Hartmann, 2007**). Ces molécules permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. D'après leur biosynthèse, la structure, leur solubilité, elles peuvent être divisés en trois classes : polyphénols, terpénoïdes et alcaloïdes (**Hennebelle et al., 2004**).

### **II.2.1. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux regroupe un vaste ensemble plus de 8000 structures phénoliques ont été signalées et elles sont largement dispersées dans tout le royaume des plantes (**Strack, 1997**). Et qui partagent d'au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc (**Lefebure, 1999**). Les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate (**Mayer, 2004**). Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et secs (**Boizot et Charpentier, 2006**). Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes :

#### **II.2.1.1. Phénols simples**

Ce sont des substances phytochimiques avec des effets périodique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Les mieux caractérisés pharmacologiquement, sont l'acide caféique et l'acide férulique qui montrent l'effet anticancéreux au niveau des poumons chez les

souris, alors que l'acide gallique agit par le même effet en prévenant le déclenchement du cancer œsophagien chez les rats (**Laraoui, 2007**). Les coumarines est formée des composés phénoliques dérivés de la coumarine simple et ses dérivés ont des actions phyto biologiques, bactériostatiques et antifongiques. Ils ont un effet anti- œdémateux (**Hoult et Paya, 1996**).

### **II.2.1.2. Polyphénols**

#### **A. Les Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux presque toujours hydrosolubles larges (**Bruneton, 2009**). Ils présentent plus de 5000 structures décrites (**Marouf et Reynaud, 2007**). Ces composés partagent un squelette de base phényl-benzopyroneen 15 atomes de carbone (C6 – C3 – C6) de 3 cycles aromatiques (A, B, C). Selon la position relative des deux cyclesaromatiques C6 (les cycles A et B), il existe deux familles d'isomères naturels : les isoflavonoïdes et les néoflavonoïdes (**Patil et Masand, 2018**).

Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines; flavonoles;isoflavonoles; flavones; isoflavones; flavanes; isoflavanes; flavanols; isoflavanols;lavanones; isoflavanones; auronnes (**Edenharder et Grünhage, 2003**).

Les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-ulcérogène, antibactériennes, antivirales, antimutagènes et anticancérigènes ainsi qu'à sacapacité à moduler la fonction enzymatique cellulaire clé. Ils ont également des actionspositives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer (**Havsteen, 2002 ; Panche et al., 2016**).

#### **B. Tannins**

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles de masse moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (**Kamra et al., 2006**).qui présentant à coté de réactions classique des phénols la propriété deprécipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Zimmer et Cordesse, 1996**), eton également une aptitude à transformer les peaux fraîches en cuir imputrescibles (**Jacqueline, 1978**).On les trouve dans presque toutes les parties de la plante, l'écorce, le bois, les feuilles et les fruitesgraines dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules dites périphériques c'est-à-dire situées essentiellement au niveau des épidermes, et sont donc facilement libérés (**Zimmer et Cordesse, 1996**). En général, ils sont divisés selon la structure

chimique, le poids moléculaire, la solubilité dans l'eau en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bernays, 1989**).

### **II.2.2. Les Terpénoïdes**

Les terpénoïdes constituent une classe importante de plus de 10000 composés qui déterminent également l'activité pharmacologique des plantes médicinales (**Zian, 2016**). Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte, leur formule brute construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène de formule  $(C_5H_x)_n$  dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone...etc.). Les terpènes sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques (**Bruneton, 1999**). Ils ont la particularité de dégager de fortes odeurs et considérés comme les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont utilisés dans certains domaines comme la cosmétique (parfum) et la médecine pour traiter les maladies de la respiration (**Valnet, 2003**). Ils possèdent d'autres propriétés comme antiseptiques, digestives, antispasmodique, sédatives, irritantes, cicatrisantes...etc (**Bakkali et al., 2007**).

### **II.2.3. Les alcaloïdes**

Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle, azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doté, à faible dose possèdent des propriétés pharmacologiques marquées (**Bruneton, 1996**) et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central (dépresseurs « morphine, scopolamine » ou stimulants « caféine, strychnine »), du système nerveux autonome (sympathomimétiques « éphédrine », parasymphomimétique « pilocarpine » et du système cardiovasculaire) (**Gazengel et Orecchioni, 2013**). On notera aussi l'existence d'anti-tumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007**).

## ***Chapitre III : Le genre Ephedra***

### III.1. Le genre *Ephedra*

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephédra* inclue environ 40 espèces. Ce sont de petits arbustes vivaces presque toujours dioïques, qui peuvent atteindre 3 mètres de haut, trèsramifiés, aux tiges articulées, à feuilles persistantes, fortement aromatique, avec un goût amer (**Ghafoor et al., 2007**). Les espèces de ce genre sont distribuées dans les régions semi-arides et désertiques et se développent habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtes secs de montagnes (**Qingbiao, 2006 ; Limberger et al., 2013**) et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Égypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (**Hegazi et El-Lamey, 2011**). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord et du Sud (**Ozenda, 1991**). La classification systématique de sous espèce *Ephédra alataalenda* selon **Ozenda (1991)** est :

**Tableau 1.** Classification systématique de sous espèce *Ephédra alataalenda* (**Ozenda, 1991**)

<b>Classification</b>	<i>Ephedraalata</i>
<b>Embranchement</b>	Spermatophytes
<b>Sous-embranchement</b>	Gymnospermes
<b>Classe</b>	Gnetopsida
<b>Ordres</b>	Ephedrales
<b>Famille</b>	Ephedraceae
<b>Genre</b>	<i>Ephedra</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ephedra alata</i>
<b>Sous-Espèce</b>	<i>Ephedra alata alenda</i>

### III.2. Description botanique de l'espèce *Ephédra alata* :

C'est un arbuste de 1 à 3 mètres 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 noeuds, 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 (**Ozenda, 1991; Abourashed et al., 2003; Limberger et al., 2013**).

Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant. Elle est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes, La floraison en hiver et au printemps (Ozenda, 1991; Derbel *et al.*, 2010; Jaradat *et al.*, 2015). Elle se caractérise par une forte odeur de pin et un goût astringent (Abourashed *et al.*, 2003).



**Figure 1.** Photo de la plante *Ephedra alata* (Ozenda, 1991)

### III.3. Composition chimique

Les espèces d'Ephédra sont des sources naturelles de nombreux phytoconstituants incluant des alcaloïdes, des tanins (principalement les proanthocyanidines), des saponines des acides phénoliques, des flavonoïdes (la vicenine II, la leucine III, le kaempferol 3- rhamnoside, la quercétine 3 - rhamnoside et l'herbacétine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés de l'Ephédra alata), et des huiles essentielles (Hegazi et ElLamey, 2011).

Leurs propriétés biologiques sont attribuées en grande partie aux alcaloïdes de types éphédrine et ses dérivés (figure 03), proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (Caveney *et al.*, 2001). Notons que la (-) éphédrine et l'(+ ) pseudoéphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80 % de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (Soni *et al.*, 2004 ; Phinney *et al.*, 2005).

### III.4. Utilisation en médicinale

Les espèces du genre *Ephedra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *E. alata* était traditionnellement utilisée en médecine traditionnelle russe pour traiter les troubles respiratoires et rhumatismes, et dans la tradition chinoise contre la toux, le

rhume, les frissons, l'asthme, les allergies et les œdèmes (Bell et Bachman, 2011 ; Al-Snafi, 2017). *Ephedra alata* a été couramment utilisé dans la médecine traditionnelle en Egypte et la plupart des pays arabes. *Ephedra alata* a été utilisé pour le traitement de l'asthme, du foin la fièvre et le rhume (Ghanem et El-Magly, 2008). *Ephedra alata* pousse largement en Palestine. Elle est utilisée en médecine traditionnelle locale pour les mêmes fins qu'en médecine traditionnelle chinoise. Cette plante montre également des activités antimicrobiennes et anticancéreuses (Al-Rimawi et al. 2017).

La poudre d'*E. alata* est utilisée comme un traitement contre le diabète au Maroc (Ghourri et al., 2013), alors que les Algériens et les Tunisiens l'utilisent pour traiter l'asthme, les allergies, la faiblesse générale, les maux de tête, les frissons, la fièvre, le diabète, la congestion nasale et l'hypotension, et principalement l'utilisent comme traitement anticancéreux et pour diminuer les effets secondaires de la chimiothérapie (Ould EL hadj et al, 2003 ; Jaradat et al., 2016). Les parties utilisées dans la médecine traditionnelle sont les feuilles, les rameaux et les tiges séchées (Ould El Hadj et al., 2013).

### III.5. Pharmacologie

Le principal ingrédient actif sont les alcaloïdes de type éphédrine, tels que l'éphédrine, la pseudo éphédrine, la noréphédrine (Amakura et al. 2013), norpseudo éphédrine, méthyléphédrine et méthyl pseudoéphédrine (Ibragicet Sofić, 2015). L'éphédrine est un sympathomimétique indirecte, très proche de l'adrénaline, elle provoque la libération des catécholamines endogènes des fibres sympathique post-ganglionnaire. Elle stimule l'automatisme cardiaque et exerce une activité inotrope positive, mais l'éphédrine dure environ dix fois plus longtemps (Bruneton, 2009). L'effet principal de la stimulation des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$  incluse l'augmentation de la fréquence cardiaque et la contractilité. Elle favorise également la vasoconstriction périphérique due à la fraction pseudo-éphédrine, la broncho-dilatation, ce qui explique son utilisation traditionnelle comme décongestionnant nasal et antiasthmatique, ainsi que la stimulation du SNC (Abourashed et al., 2003 ; Phinney et al., 2005). Cependant, les effets hypertenseurs et vasoconstricteurs liés à l'éphédrine, sont moins rapides et moins puissants, mais plus durables et plus stables dans les conditions du métabolisme contrairement à l'adrénaline (Chopra et al., 1960).

### III.6. Toxicologie

Selon l'évaluation de la Food and Drug Administration (FDA) en 2004, les compléments alimentaires contenant des alcaloïdes d'*Ephedra* représentaient un risque sanitaire remarquable, compte tenu des conditions d'utilisation. Par conséquent, la FDA a interdit partout les médicaments contenant de l'éphédrine (**Additives and Food, 2013**).

Les effets secondaires connus d'*Ephedra* comprennent l'insomnie, une légère élévation de la pression artérielle, une augmentation du pouls, de l'anxiété, une sécheresse de la bouche et des maux de tête. *L'Ephedra* ainsi à de multiples effets indésirables, en particulier à fortes doses. L'éphédrine a été utilisée comme alternative à "l'ecstasy", une drogue illégale de la rue (**Chevallier, 1996 ; Blumenthal et al., 1998**). Cliniquement, il peut en résulter une arythmie, des atteintes myocardiques, des accidents vasculaires cérébraux (**Zaacks et al., 1999**). Les nausées, les tremblements, la tachycardie (battement de coeur rapide) et la rétention urinaire. Suite à une dose élevée, les patients présentent des signes de toxicité neurologique et cardiovasculaire. Le stockage de noradrénaline (à cause de l'éphédrine) peut entraîner une hypertension grave. Cette interaction peut être fatale (**Blumenthal et King, 1995**).

### III.7. Activités biologiques de la plante

La plante a montré un large éventail d'activités pharmacologiques, notamment antimicrobiennes contre des bactéries pathogènes GRAM<sup>+</sup> et GRAM<sup>-</sup> (**Chebouat et al., 2014**), antioxydants (**Jaradat et al., 2015 ; Al-Rimawi et al., 2017**), anticancéreuses, antidiabétiques (**Konno et al., 1985 ; Shabana, 1990**), cardiovasculaires (**Ebadi 2007; Abula et al., 2004**), nerveuses, respiratoires, immunologiques, anti-inflammatoires, antipyrétique, analgésique et de nombreux autres effets pharmacologiques (**Al-Snafi, 2017**).

*Ephedra* a été appliquée pour améliorer les performances, la suppression de l'appétit et la Perte de poids (**Barnes et al. 2007**). L'effet stimulant de l'éphédrine provoque une augmentation du taux métabolique basal ce qui contribue à la perte de poids (**Shekelle et al. 2003**)

## ***Chapitre IV : Le genre Ajuga***

## IV.1. Généralité

Le nom *Ajuga* vient du mot latin "Jugum" : joug. Avec le suffixe "a", sans joug, du fait que la corolle est dépourvue de lèvre supérieure. Iva, est un ancien nom féminin latin qui est utilisé pour la première fois pour cette plante (**Ghedira et al., 1991**).

*Ajuga Iva* (L.) Schreber. fait partie de la famille des Lamiaceae qui comporte 266 genres et 301 espèces (**Israïli et Lyoussi, 2009**). La plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (**Judd et al., 2002**). Le genre *Ajuga* est généralement utilisée comme remède antidiabétique (**El Hilaly et al., 2004**). La nomenclature et taxonomie de la plante selon Ghedira et al, (1991) et Halimi (2004):

**Tableau 2.** Classification systématique de sous espèce *Ajuga iva* (**Ghedira et al., 1991**)

Classification	<i>Ajuga iva</i>
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta (Angiospermae)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Ordre	Tubiflorae
Famille	Lamiaceae / Labiatae
Genre	<i>Ajuga</i>
Espèce	<i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb.

Localement, au Maroc et en Algérie, elle est connue comme « Chondgoura » et « Toutoulba » au Nord- Sahara oriental (**Taleb-Senouci et al., 2009**). Taftelba en Berber ; Ivette, Petit if, Bugle en Français ; Hero bivy, Musky bugle en Anglais (**Halimi et al., 2004**).

## IV.2. Description botanique

*Ajuga Iva* est une petite plante annuelle herbacée, avec une hauteur de 5 à 20 cm caractérisée par un goût amer et une odeur de musc base ligneuse, tiges étalées- diffuses, rameuses, très feuillues à feuilles linéaires ou longuement trifides, a une longueur de 20 mm, denses et couvertes de duvets enroulées aux bords, entières ou un peu dentées au sommet. La floraison de la plante se fait entre Avril à Octobre. Les fleurs sont violettes, roses ou jaunes, de 15 mm de longueur, 2-4 par verticille à l'aisselle des feuilles, la lèvre supérieure

de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus, les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est même couleur de la fleur, généralement en violet. Calice velu-laineux, à dents triangulaires, lancéolées plus courtes que le tube se présente avec des poils (Girre, 2001).



**Photographie 1.** Photo d'*Ajuga iva* L. partie végétative et racine, et photo de fleurs.

### IV.3. Composition chimique d'*Ajuga iva*

Les études phytochimiques sur *A. iva* ont révélé la présence de plusieurs flavonoïdes, tanins, terpènes, stéroïdes, caféine (caféique chlorogénique) et les constituants de l'huile essentielle et d'autre principe comme l'ajugarine (El Hilaly *et al.*, 2004 ; Beloued, 2012). L'ivette contient les trois majeurs ecdystéroïdes (makisterone A, 20-hydroxyecdysone et cyasterone), en plus du 24,28-dehydromakisterone A et les deux nouveaux phytoecdystéroïdes (22-oxocyasterone et 24,25-dehydroprecyasterone) (Bendif, 2017).

Ben-Jannet *et al.*, (1999) ont isolés les ivaïdes A, B et C d'*Ajuga Iva*. Les cicatrisants (externes), les diterpénoides (clérodane), les iridoïdes et saponosides acides sont aussi des composés chimiques que les chercheurs ont trouvés dans l'*Ajuga Iva*. Bennaghmouch *et al.*, (2001), ont isolé à partir de l'espèce *Ajuga Iva* sept flavoniques aglycones (Quercétine, lutéoline, chrysoériol, 5,5'- dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone, 5,7- dihydroxy 4',5'diméthoxyflavone, apigénine, naringénine).

### IV.4. Utilisations d'ivette

Les espèces d'*Ajuga* sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde entier contre certaines maladies telles que la goutte, le rhumatisme, le paludisme, l'asthme et pour traiter le cancer, le diabète (Bendif 2017), l'hypertension, les gastralgies, la stérilité féminine, les hémorroïdes (Bennaghmouch *et al.*, 2002), les troubles gastro-intestinaux,

l'entérite, la fièvre, la sinusite et les maux de tête (Allali *et al.*, 2008 ; Boumerfeg 2010) d'oreille et de dents (mâcher une feuille fraîche), la bronchite, la phthisie, les troubles mentaux, les maladies de la peau, l'eczéma, les morsures d'animaux (rage), le tonique, la diarrhée (Bendif 2017), l'ulcère gastrique, la dysurie, les articulations douloureuses des membres (Baghiani *et al.*, 2011) et pour calmer les douleurs (Bennaghmouch *et al.*, 2002).

Elle est aussi utilisée comme : dépuratif, antiarthritique, leishmanicide (Bendif 2017), anthelminthique et en tant qu'agent diurétique (El Hilaly and Lyoussi, 2002), antiseptique (Madani *et al.*, 2014), antimutogène, vasorelaxant et cicatrisant (Chabane *et al.*, 2013), antifièvre (Wessner *et al.*, 1992), antipyrétique et vulnérable (Venskutonis *et al.*, 2017).

#### IV.5. Toxicité

La consommation de l'ivette par des personnes normales n'aboutit pas à la réduction de leurs glycémies, alors qu'elle a un effet hypoglycémiant chez les personnes diabétiques (El Hilaly *et al.*, 2004). Les DL<sub>50</sub> montrent que les flavonoïdes d'*Ajuga iva* ne sont pas toxiques du fait de leurs valeurs élevées (3600 mg/kg pour les souris et 4800 mg/kg pour les rats) (Bennaghmouch *et al.*, 2001).

Par voie orale, la DL<sub>50</sub> est supérieure à 14 g/kg PC tandis que celle de la voie intrapéritonéale est d'environ 3.6g/kg PC. Quant au traitement chronique (jusqu'à 600 mg/Kg PC) n'occasionne aucun effet néfaste sur les paramètres biochimiques et hématologiques.

#### IV.6. Activités biologiques d'*Ajuga iva*

*Ajuga iva* semble être une plante précieuse et pourrait être utilisée pour l'inhibition du piégeage des radicaux libres et peuvent stabiliser la peroxydation des lipides (Baghiani *et al.*, 2011). Les iridoïdes peuvent jouer un rôle important dans la suppression du stress oxydatif causé par le cholestérol alimentaire (Bouderbala *et al.*, 2010).

*Ajuga iva* peut être considérée comme un agent anti-diabétique et hypolipidémique et chez l'homme (El-hilaly et Lyoussi, 2002). Des recherches récentes ont démontré que les hétérosides flavoniques en sont responsables (Chabane *et al.*, 2013). L'administration orale unique et répétée de l'extrait d'*Ajuga* a entraîné une diminution des taux de cholestérol plasmatique (Baghiani *et al.*, 2011) et des phospholipides (Taleb-Senouci *et al.*, 2008). Les extraits d'*ajuga* possèdent des propriétés vasodilatatrices et est donc considéré comme agent anti-hypertensif (El-Hilaly *et al.*, 2004).

L'activité antibactérienne des extraits d'Ajuga a été démontrée (**Bouyahya, 2016**). Les phytoecdystéroïdes sont considérés comme contribuant à la dissuasion des prédateurs invertébrés (**Dinan and Lafont, 2006 ; Aly *et al.*, 2011**).

## *Matériel et méthodes*

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude des composés végétaux et leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires et antibactériens de deux plantes médicinales « *Ephedra alata* » et « *Ajuga reptans* ». La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de biologie, Université Abbas Lagrou-Khenchela.

## V.1. Matériel

### V.1.1. Matériel végétal

La plante *Ajuga reptans* utilisée dans ce travail a été récoltée dans la région d'Ain Mimoun wilaya de Khenchela en Février 2024. La plante (feuilles) est bien nettoyée du sol et séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière pendant 20 jours.

L'espèce *Ephedra* a été récoltée dans la région de Tébessa en Février 2024. La partie aérienne (tiges feuillées, graines) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 20 jours.

Enfin, les parties des deux plantes sèches ont été pulvérisées au broyeur pour obtenir une poudre fine qui sont soigneusement conservées dans un bocal en verre à l'abri de la lumière pour éviter toute détérioration des échantillons jusqu'à son utilisation.



**Photographie 2.** La partie aérienne d'*Ephedra alata* et d'*Ajuga reptans*, séché et broyée

## V.1.2. Matériel biologique les souches bactériennes

### V.1.2.1. Les souches bactériennes testées

Les souches bactériennes retenues pour le présent travail proviennent du centre de recherche scientifique kenchela. Il s'agit d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Leurs caractéristiques sont regroupées le tableau 3.

**Tableau 3.**Liste des souches microbienne utilisées

Souches testes	Gram	Référence
<i>Bacillus Cereus</i>	Bactéries Gram positif	ATCC 11778
<i>Staphylococcus</i>		ATCC 25923
<i>Escherichia Coli</i>	Bactéries Gram négatif	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
<i>Aspergillus niger</i>	Champignons	25A936
<i>Candidat al</i>		ATCC 10231

## V.2.Méthodes

### V.2.1. Préparation des extraits

#### V.2.1.1. Préparation d'extrait aqueux par infusion

La préparation de cet extrait consiste à macérer 40g de la partie aérienne de la poudre végétale dans 400 ml d'eau chaude, le macérât est homogénéisé pendant 30 min. Après filtration, le filtrat est évaporé à l'aide d'une étuve à 50°.

#### V.2.1.2. Préparation d'extrait aqueux par décoction

Elle est basée sur la préparation d'une décoction, en introduisant 40g de la poudre végétale dans 400 ml d'eau distillée. Le tout est chauffé jusqu'à l'ébullition pendant 1h et réduction du volume initiale à 1/10ème. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à 50°C dans une étuve (Boubacar Souley, 2005).

**V.2.1.3. Préparation d'extrait éthanolique**

La préparation d'extrait éthanolique est réalisée par épuisement à froid de 50gde la poudre végétale dans 500 ml d'une solution hydro-alcoolique d'éthanol/eau distillée (8:2 V/V) pendant 24h x 3 avec agitation continue à température ambiante. L'homogénat est filtré à l'aide d'un papier Wattman. Le filtrat obtenu est évaporé l'aide d'une rota vapeur à 45°C et l'extrait sec obtenu est ensuite stocké à une température de +4°C

**➤ Calcul des rendements en extraits secs :**

Le rendement indique la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Nous pouvons déterminer le rendement des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant:

- **R (%) = P1/ P2 x 100**
- **P1:** Poids de l'extrait après l'évaporation du solvant
- **P2:** Poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction

**V.2.2. Analyse qualitative****V.2.2.1. Etude phytochimique**

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existant dans les extraits de la plante, pour mettre en évidence leur présence ou absence. Ces tests sont basés sur des réactions qui donne des résultats (une coloration, ou précipité ou autre) par des réactifs spécifiques à chaque phytoconstituant. Les familles concernées par ces tests dans ce travail sont : les polyphenols, les flavonoides, les tanins, les saponines, et lessucres réducteurs, les coumarines, les alcaloïdes, composés composés phénoliques, les terpenoides.

**✓ Les alcaloids**

Dans deux tubes à essai, 1 ml d'extrait est placé dans chaque tube. Ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif de Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité jaune-brun et brun noir, respectivement, indique la présence de ces alcaloïdes (**Amana, 2007**)

**✓ Les tanins**

Dans un tube à essai, on place 1 ml de chaque extrait, puis quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à (FeCl<sub>3</sub> à 2%) sont ajoutées dans le tube.

L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence de tanins catéchiqes, et une

Coloration bleue verdâtre indique la présence simultanée des types de tanins (**Soulama et al., 2014**).

✓ **Les flavonoïdes**

2 ml de l'extrait sont placés dans un tube à essai puis quelques gouttes de (AlCl<sub>3</sub> à 1%) y sont ajoutées. L'apparition de couleur jaune indique la présence de flavonoïdes (**Edeaga et al., 2005**).

✓ **Les terpénoïdes**

1 ml de chloroforme est ajouté à 2,5 ml de chacun de l'extrait. Après homogénéisation, 1,5 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté au mélange. La formation d'une couleur rouge-brun à l'interface indique la présence des composés (**Aziman et al., 2012**).

✓ **Les quinones libres**

Dans un tube à essai, introduire 2ml d'extrait et ajouter 0.1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). Le développement d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet en présence des quinones libres (**Oloyede et Aina, 2005**).

✓ **Les composés phénoliques**

0,5 ml de FeCl<sub>3</sub> est ajouté à 3 ml de chacun de l'extrait. La formation d'une couleur bleu verdâtre indique la présence de composés phénoliques (**Rosine et Momo, 2009**)

✓ **Flavonoïdes**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes (**Trease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998**).

✓ **Les anthocyanes**

La détection des anthocyanes est effectuée en introduisant 2 ml d'infusé à 5% dans un tube à essai, et l'ajout de 2 ml HCl (2N) avec quelques gouttes d'ammoniac.

Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, indique la présence d'anthocyanes (**Debray et al., 1971**).

**✓ Test de mousse pour le saponoside**

1 ml d'extrait est ajouté à 3 ml d'eau distillée. Après 2 minutes d'agitation, la formation d'une mousse stable de plus de 1 cm de hauteur indique la présence de saponine (**Yadav et Agarwala, 2011**).

**✓ Les anthraquinones**

2,5 ml de solution de NH<sub>4</sub>OH sont ajoutés à 5 ml de l'extrait immédiatement après agitation. La présence des anthraquinones est indiquée par une couleur violette (**Okerulu et Aina, 2001**).

**✓ Les coumarines**

L'identification est faite par macération de 5 g de poudre végétale dans 20 ml d'éther pendant 24h. La filtration, l'évaporation du filtrat, et l'ajout de 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH à 25% sont suivis d'observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm (**Rizk, 1982**).

**✓ Les amines**

L'extrait est déposé sur papier filtre à l'étuve 80 °C puis pulvérisé avec quelques gouttes de ninhydrine puis séché à l'étuve à 110 °C pendant 5 min. Des taches violettes ou jaunes sur le papier indiquent la présence des amines (**Oloyede, 2005**).

**✓ Les Mucilages**

La détection des mucilages est effectuée en introduisant 1 ml d'infusé à 5% dans un tube à essai, et l'ajout de 5 ml d'éthanol pendant quelques minutes. Il apparaît un précipité qui témoigne leur présence (**Études rwandaises, 1977**).

**✓ L'Amidon**

On ajoute quelques gouttes de légole à 1 ml d'infusé 5%, une coloration bleu foncé confirme la présence de l'amidon (**Kanoun, 2011**).

**✓ Les sucres réducteurs**

Dans un tube à essai, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1 ml réactif B) à 1 ml d'extrait et incubé l'ensemble 20 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**Cai et al., 2011**).

**V.2.2.2. Criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince**

Afin d'avoir une idée sur la composition chimique de nos extraits, nous avons effectué une analyse par chromatographie sur couche mince des extraits éthanoliques, aqueux obtenus à

partie de l'extraction de deux parties de l'espèce *Ephedraet* (feuilles et graines) et la partie aérienne de l'espèce *Ajuga iva*.

Des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support en plastique pour la séparation des différentes fractions.

Six systèmes de solvants organiques à polarités différentes ont été essayés

- **Système 1** : Toluène/ acide acétique/ Méthanol (5/3/1) (v/v/v).
- **Système 2** : Chloroforme/ Méthanol / Eau (6.5/1.5/2) (v/v/v)
- **Système 3** : Acétone/Eau (1/1) (v/v).
- **Système 4** : n-Butanol / Acide acétique glacial/ Eau (4/1/5) (v/v/v).
- **Système 5** : Chloroforme/ acétone/ Acétate d'éthyle (16/8/3) (v/v/v).
- **Système 6** : Acétate d'éthyle/ acide formique/ Acétate acétique / Eau (25/3/3/7) (v/v)

A l'aide d'une micropipette (10 µl) les échantillons à séparer qui sont préalablement solubilisés dans le méthanol (50 mg/ml) sont déposés sur la plaque d'une façon perpendiculaire et linéairement. Plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit peuvent être effectués.

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve recouverte et préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié. L'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

Après le développement du chromatogramme, et lorsque le front du solvant d'élution atteint 0.5 de la ligne supérieure, la plaque est retirée, séchée et examinée sous lampe UV à 254 et 365 nm dans une chambre noire (**Marston et Hostettmann, 2006**).

La fluorescence sous UV, la coloration après révélation et le facteur de rétention (Rf), sont des caractéristiques propres pour chaque spot obtenu à la fin de migration et révélation.

Le facteur de rétention (Rf) est calculé via l'équation :

- **Rf = d/D**
- Dont : **d**: Distance parcourue par le constituant.
- **D**: Distance parcourue par le solvant.

**V.2.3. Analyse quantitative****V.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de *Djeridane et al. (2006)* utilisant le réactif de FolinCiocalteu. Le principe de la méthode repose sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif.

Un volume de 100 µl pour chaque extrait est introduits dans des tubes à essai, 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois est additionnée, Les tubes sont agités et conservés à la température ambiante. 400 µl de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7.5 % est ajouté. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'expérience est répétée 3 fois (*Wong et al., 2006*).

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations (0.05 à 0,5 mg/ml) d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec)

**V.2.3.2. Dosage des flavonoïdes**

Le principe de la méthode repose sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif incolore, le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). 500 µl de chaque extrait est mélangé avec 500µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) (2%), après 1 heure d'incubation à la température ambiante, la lecture est faite à 430 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'expérience est répétée deux fois.

La concentration des flavonoïdes a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage réalise par un standard étalon la quercétine a différentes concentrations (0,8 à 0,0015 mg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon, et exprimée en mg d'équivalent de Quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec) (Annexe 3) (*Djeridane et al., 2006*).

**V.2.4. Dosage de l'activité antioxydant****V.2.4.1. Teste du DPPH radical libre**

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité sous

forme radicalaire et de sa simplicité de l'analyse, au contact d'une substance donneuse de proton le DPPH (2,2 diphényle-1- Picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényle-1-Picrylhydrazine de couleur jaune . Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**Bozin et al., 2008**).

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait (0.05 - 0.075 –0.0125- 0.02 mg/ml) est ajouté à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l) fraîchement préparée et le mélange est vortexé. Le témoin positif ; acide ascorbique est préparé dans les mêmes conditions.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Suga et al., 2005**).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (%), calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$\text{PI (\%)} = (\text{A témoin} - \text{A extrait} / \text{A témoin}) \times 100$$

Indices:

- **PI (%)** : pourcentage d'inhibition.
- **A témoin** : absorbance du témoin négatif.
- **A extrait** : absorbance de l'extrait

➤ **Calcul des IC<sub>50</sub>**

IC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50), permet de déterminer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, une faible valeur de IC<sub>50</sub> correspondant à une grande efficacité de l'extrait. Elle est calculée graphiquement à partir des graphes tracés « pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations » de nos extraits en utilisant le logiciel de Microsoft Excel (**Bertoncelj et al., 2007 ; Marxen et al., 2007 ; Scherer et Godoy, 2009 ; Fabri et al., 2009**).

#### V.2.4.2. Tests de l'ABTS

L'activité antiradicalaire a été également évaluée par le test de décoloration du radical cation ABTS +• selon la technique utilisée par Khan et al. (2012). L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 nM. La solution du radical cation ABTS+• a été obtenue

en incubant pendant 12 à 16 h à l'obscurité et à la température ambiante un mélange à volumes égaux de la solution mère d'ABTS avec une solution de persulfate de potassium à 2,45 nM.

La solution ABTS<sup>•+</sup> a été diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de  $0,700 \pm 0,02$  à 734 nm avant l'utilisation.

Ensuite, 1,5 ml de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> a été mélangé avec 50 µl d'extrait ou de la référence (acide ascorbique) à différentes concentrations (350-250-125-75-50µg/ml). Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à la température ambiante.

Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé et les résultats exprimés en  $CI_{50}$ .

### **V.2.5. Activité anti-inflammatoire**

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro consiste à préparer quatre solutions. Elle a été effectuée sur les extraits des deux plantes *Ajuga reptans* et *Ephedra* selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Sangita et Priyanka, 2012**).

- La solution d'essai (Ts) (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 5 % et 0,05 ml des extraits de la plante avec les concentrations 250,500 et 1000µg/ml.
- La solution control test (Tc) (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.
- La solution contrôle produit (pc) (0,5 ml) composée de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml des extraits de la plante avec les concentrations 250,500 et 1000µg/ml.
- La solution standard test (ss) (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec les concentrations 250,500 et 1000µg/ml.

Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder l'échantillons à 57°C pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline « tampon » (pH 6,3 ajustée par une solution d'HCl (1N)) 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 calculé comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{ATs - Apc}{ATc} \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le diclofénac sodium.

- ATs : absorbance de la solution d'essai,
- Apc : absorbance La solution contrôle produit,
- ATc : absorbance de La solution control test.

#### V.2.6. L'activité anti-microbienne

Les différents extraits aqueux, hydro-éthanoliques de la plante *Ajuga reptans* ont été testés sur différentes souches de microorganismes (quatre bactéries et deux champignons), en vue de déterminer leur efficacité. L'activité anti-microbienne extraits ont été déterminée par la méthode de diffusion sur le milieu gélosé cité par **Treki et al. (2009)**.

100 mg de chaque extrait sec a été pesé et mis dans un eppendorf contenant 1 ml de **DMSO** en utilisant le vortex, afin obtenir une solution mère homogène pour faire les dilutions.

- **Repiquage de souches testées**

Dans des conditions stériles, à partir des boîtes de conservation, nous avons pris 2 à 5 colonies isolées et représentatives de la souche testée à l'aide d'un écouvillon stérile, et nous avons étalé par la méthode des stries serrés sur des boîtes de pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches microbiennes utilisées (le milieu **PDA** pour les champignons et gélose nutritive pour les bactéries), puis avons incubés à 37°C pendant 24 heures les bactéries et de 48h à 72h la levure, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées et représentatives (**Bouchouka, 2016**).

- **Préparation des suspensions microbiennes (l'inoculum)**

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, nous avons pris de 1 à 2 colonies, bien isolées et parfaitement identiques, à l'aide d'une anse de platine, puis cette dernière est mise dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile 0.9% Na Cl, bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland.

- **Ensemencement**

A l'aide des écouvillons stériles pénétrés chacun d'eux dans les différentes suspensions

Bactérienne /levure (l'inoculum), nous avonsensemencé des boîtes de Mueller Hinton de puis les incubés à 37°C.

- **Dépôt des disques**

Des disques de papier-filtre (Wattman) stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec chaque extrait à raison de 10µl, avec des disques imprégnés de DMSO utilisés comme témoins négatif, à l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés aseptiquement à la surface du milieuensemencé. Deux boites sont utilisées pour chaque souche. Les boites sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture des résultats**

Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour de disque correspondant à l'absence de la croissance. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (**Chbaniet *al.*, 2011**). Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi *et al.*, 2006 ; Etoboet *al.*, 2017**).

Selon **Duraffourd, (1990)**, la sensibilité des germes a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour les diamètres moins de 7 mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de plus de 20 mm.

- **Analyse statistique des résultats**

Toutes les déterminations sont menées en triple. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type.

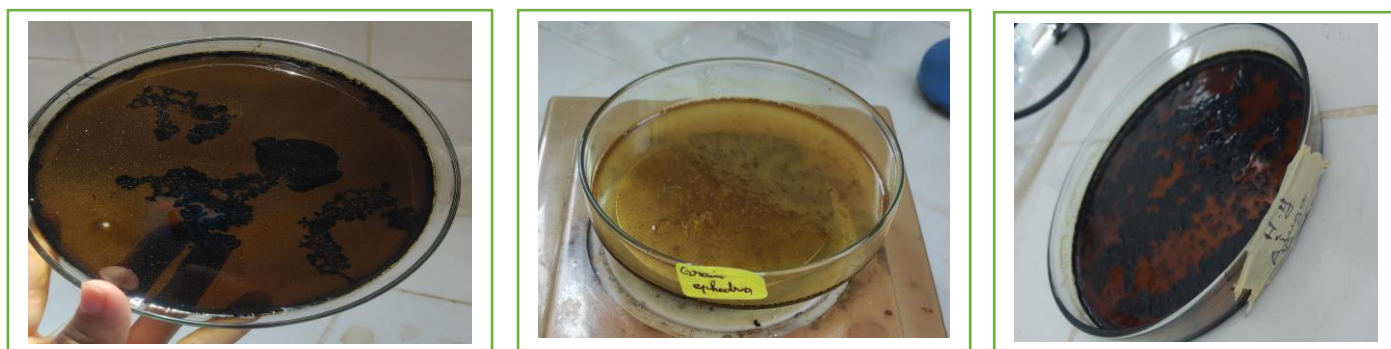
## *Résultats et discussion*

VI.1. Détermination du rendement d'extraction

Une extraction solide-liquide par l'eau et l'éthanol a été préparée pour l'évaluation des activités biologiques. Trois types d'extraction ont été réalisés : l'extraction par macération pendant 24 h par l'éthanol, l'extraction par infusion et l'extraction par décoction. Les extraits d'*Ephedra alata* et d'*Ajugai va* varient en couleur et en apparence et les rendements obtenus sont présentés dans les tableaux N° 3 et 4.

Tableau 4. Représente la couleur et l'aspect des extraits éthanoliques et aqueux

L'extrait		<i>Ephédra alata</i> (Tiges feuillées)	<i>Ephédra alata</i> (Graines)	<i>Ajugai va</i>
Aqueux	Couleur	Marron clair	Jaune clair	Marron clair
	Aspect	Solide	Solide	Solide
Hydro-Ethanolique	Couleur	Marron foncé	Jaune foncé	Marron foncé
	Aspect	Collant et pâteux	Solide	Collant et pâteux



Photographie 3. La préparation d'extrait éthanolique

Tableau 5. Rendement d'extraction de plante *Ephedra alata* et *Ajuga iva*

La plante	L'extrait	Poids de matériel végétal (g)	Poids d'extrait (g)	Le rendement (%)
<i>Ephedra alata</i> (feuilles)	Hydro-éthanolique	50g	5.06g	10.12%
	Aqueux infusé	40g	7.16g	17.9%
	Aqueux décocté	40g	2.30g	5.75%
<i>Ephedra alata</i> (graines)	Hydro-éthanolique	50g	4.96g	9.92%
	Aqueux infusé	40g	6.11g	15.275%
	Aqueux décocté	40g	2.08g	5.2%
<i>Ajuga iva</i> (feuilles)	Hydro-éthanolique	50g	5.01g	10.02%
	Aqueux infusé	40g	6.13g	15.325%
	Aqueux décocté	40g	2.65g	6.625%

D'après les résultats d'extraction obtenus, nous avons observé que les extraits aqueux par infusion des tiges feuillées et des graines d'*Ephedra* et les feuilles d'*Ajuga* donnent les meilleurs rendements (17.9%, et 15.275% et 15.325% respectivement) par rapport aux autres extractions par le solvant organiques ou le plus faible dans l'extraction par décoction pour les tiges feuillées et des graines d'*Ephedra* et les feuilles d'*Ajuga*.

Les rendements d'extraction enregistrés dans notre étude sont entre (5.2 % et 17.9 %), ils sont légèrement supérieurs par rapport aux celles marqués par **Tabi et Salhi (2023)**, qui enregistre des rendements entre (3,8% et 7%) pour les extraits aqueux décoctés et infusés.

Ces rendements peuvent varier selon plusieurs critères, en fonction de l'espèce végétale utilisée, la région et la période de récolte et les conditions de séchage (**Keskes et al., 2014**).

L'extraction est influencée par la méthode choisie et aussi selon la polarité de solvant et la solubilité des composés phénoliques contenant dans ce solvant (**Daoudi et al., 2015**).

D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure (**Yashaswini et al., 2019**).

Les différents extraits d'*Ajuga* montrent que l'extrait aqueux par infusion donne le rendement d'extraction le plus élevé (15,32%) par rapport aux extraits aqueux par décoction et éthanolique (10,02% et 6,62%) respectivement.

Les rendements que nous avons obtenus sont moins importants que ceux retrouvés par **Bougandoura (2011)** qui a démontré que le taux des extraits des phases organiques et

aqueuses d'*Ajugaiva* est de 6,43% et 25% respectivement. Ceci peut être dû aux différentes conditions d'extraction.

**Bendif (2017)** a montré que les extraits aqueux ont donné les meilleurs rendements (entre 21,70 et 24,95 % selon la région) que ceux de l'éthanol (2,56 et 3,77% selon la région).

L'effet des solvants sur le rendement d'extraction a été signalé dans de nombreuses études (**Hayouni et al., 2007 ; Ben El Hadj Ali et al., 2014**). **Clara et al. (2010)** ont montré que la polarité du solvant a une grande importance, ainsi, la variation des rendements des divers extraits peuvent être attribués aux polarités des différents composés (**Khelifi et al., 2011**).

## VI.2. Screening photochimique des extraits

Les tests phytochimiques permettent de détecter seulement l'absence ou la présence de telle ou telle famille chimique. Les résultats obtenus montrent que les deux plantes étudiées sont plus ou moins riches en métabolites secondaires.

**Tableau 6.** Mise en évidence de la présence ou l'absence de certaines classes de métabolites secondaires dans l'espèce *E. Alata* et *Ajuga Iva*

Les métabolites secondaires	Plantes					
	<i>Ephédra alata</i> (Tiges fleuillées)		<i>Ephédra alata</i> (graines)		<i>Ajuga iva</i>	
<b>Les alcaloïdes</b>	*Mayer : jaune-brun *Wagner : brune terme	+++	*jaune *brune terme	++	*Marron claire * brune terme	+
<b>Tanins</b>	Bleue verdâtre	+++	Bleue verdâtre claire	++	Changement couleur	++
<b>Flavonoïdes</b>	Une coloration jaune	++	Une coloration jaune clair	+	Changement couleur	+
<b>Terpanoïdes</b>	La formation d'une coloration brun rouge	+++	Brun rouge Rouge brun	+++	La formation d'une coloration	+++
<b>Quinones libres</b>	Rouge	+++	Rouge	++	Rouge	++

<b>Composés phénoliques</b>	Une coloration bleu verdâtre	+++	Bleue verdâtre	++	Une coloration verte	+++
<b>Anthocyanes</b>	Marron foncé	+	Changement couleur	+	Marron foncé	+++
<b>Saponosides</b>	Formation d'une mousse plus	+++	L'apparition d'une mousse	+++	Formation d'un mousse plus 2cm	++
<b>Anthraquinones</b>	Changement couleur	+++	Changement couleur	++	Ne pas change couleur	-
<b>Coumarines</b>	Pas de fluorescence	-	Présence de fluorescence	++	Pas Présence de fluorescence	-
<b>Amines</b>	Absence de l'amine	-	Présence de fluorescence	+	L'apparition d'unel'amine	+
<b>Mucilages</b>	Riche a mucilages	+++	Présence de matières gélatineuses	++	Absence de matières gélatineuses	-
<b>Amidon</b>	Ne pas changement coloration	-	Absence de l'amidon	-	Absence de l'amidon	-
<b>Sucres réducteurs</b>	Rouge brique	++	Change la coloration	+++	Rouge brique	++

(+++): Fortement positif; (++) : Moyennement positif; (+) : Faiblement positif; (-): Négatif

Les tests phytochimiques *d'E. alata* réalisés a montré la présence des polyphénols et surtout les alcaloïdes, tanins, terpanoïdes, saponosides, Anthraquinones, mucilages et quinones libres. Cependant il y a une différence de l'intensité, on a remarqué une intensité modérée des flavonoïdes, des anthocyanes et des composés réducteurs. Avec absence des coumarines et l'amidon.

Une quantité moins importante de ces métabolites a été signalée dans la partie des graines *d'E. alata* avec t présence des amines.

Pour l'espèce *d'Ajuga iva*, les tests préliminaires ont indiqué la présence des terpénoïdes, anthocyanes et des phénols aussi les tanins, flavonoïdes alcaloïdes, quinones,

saponines, sucres réducteurs et les amines sont présents. Alors que les coumarines, les mucilages et les anthraquinones sont absents (Tableau 8).

En effet ces tests préliminaires manquent souvent de spécificité, il est nécessaire de confirmer ces résultats par une étude phytochimique approfondie

Notre travail a mis en évidence sept sur douze des principes actifs testés dans les tiges feuillées et les graines de la plante *Ephedra alata*. Ces résultats sont conformes à ceux de **Kessal et Bouafia (2003)** et **Kabili (2016)** effectués sur l'évolution de quelques activités biologiques des extraits d'*Ephedra alata* de la région d'Ouargla où ils mettent en évidence des polyphénols, des tanninscatéchiques et des anthocyanes.

Il est de même pour les résultats des travaux de **Bourmita et al., (2013)** qui ont mis en évidence la présence des alcaloïdes. La présence d'un grand nombre de principes actifs laisse suggérer que *E. alata* possède des propriétés pharmacologiques non négligeables.

Le screening phytochimique montre qu'*A. iva* contient les polyphénols, les tanins les terpanoïdes, les saponosides, Les quinones et les flavonoïdes avec une moyennement positive quantité.

**El Hilaly et al. (2004), Rouibi et al. (2012), Makni et al. (2013) et Ayari et al. (2013)** ont rapportés la présence des mêmes groupes chimiques au niveau de la partie aérienne d'*A. iva*, à savoir : les tanins, les flavonoïdes, les stérols, les stéroïdes, les huiles volatiles et les saponosides, ce qui est comparable à nos résultats.

Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques, en particulier l'*ajugarine* (**Halimi, 2004**).

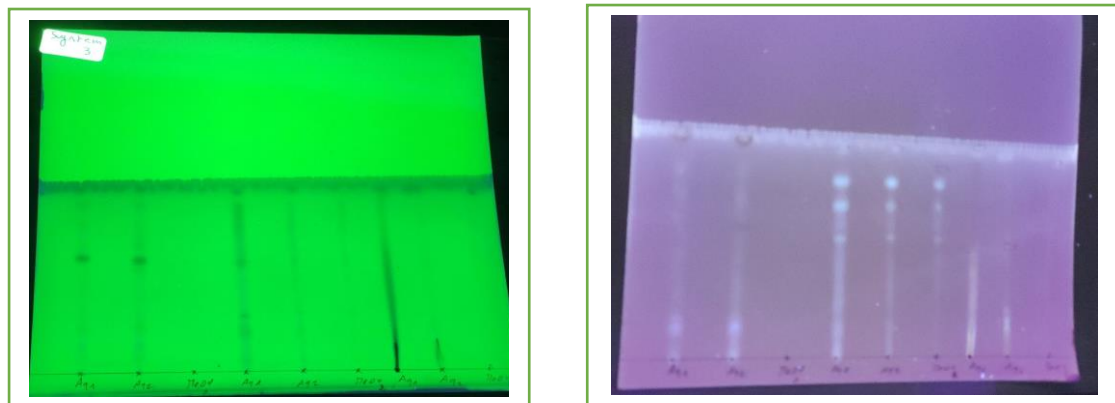
### VI.3. Chromatographie analytique sur couche mince

Plusieurs systèmes de solvants (Six phases mobiles) ont été testés. Le système : Butanol/Acide acétique/Eau (6/2/2) (**Botosoa, 2010**), a été choisi car il a donné la meilleure migration des tâches.

Ce système nous a permis d'avoir une séparation des flavonoïdes des extraits aqueux et éthanolique. La visualisation de ces tâches a été effectuée à l'œil nu et avec un réactif spécifique de coloration :  $AlCl_3$  à 2%, et sous la lampe UV à deux longueurs d'onde 253 nm

puis 365 nm. Cette dernière a donné des résultats plus précis que les deux premières visualisations.

La photographie suivante présente les différentes taches visualisées avec l'œil nu et l'UV (253 et 365) sans et en présence d' $\text{AlCl}_3$ .



**Photographie 4.** Chromatographie sur couche mince des extraits éthanolique et aqueux des *Ephédra alata*, *Ajuga iva* révélés sous UV à 365nm et 254nm.

La plupart des spots présentent la même coloration violette sauf pour la quercétine (jaune) et des Rf différents. Ces taches ont été visualisés sous lampe UV à la longueur d'onde 365 nm. Le tableau ci-dessous résume les différentes données obtenues à partir du profil de ccm. Une tentative d'identification des flavonoïdes correspondants à chaque spot a été réalisée en comparant les Rf obtenus à ceux cités dans la bibliographie et dans lesquelles la méthode d'extraction et les conditions de ccm sont identiques à celles utilisées lors de la présente étude.

**Tableau 7.** Résultats de la CCM pour les deux phases aqueuse et organique des feuilles et graines d'*Ephédra* et *Ajugaiva* avec coloration en  $\text{AlCl}_3$

	Standard et Extrait	RF	Spot coloré sous UV à 365 nm	Spot coloré sous UV à 254nm
	<i>Ethanolique</i>	/	/	Sombre
<i>Ephédra alata</i>	<i>Infusé</i>	- 0.13 - 0.17 - 0.55 - 0.68 - 0.77 - 0.84 - 0.96	Bleu vif     Des points bleus	Des points bleu foncé     Vert

		- 0.13 - 0.56 - 0.73 - 0.84 - 0.95	Bleue	/
<i>Ajuga iva</i>	<i>Ethanolique</i>	/	/	Sombre
	<i>Infusé</i>	0.99	Jaune /bleu pale	Bleu fluorescent
	<i>Décocté</i>	- 0.53 - 0.97	Bleu vif	Jaune pale
<i>Graines</i>	<i>Ethanolique</i>	- 0.5 - 0.71 - 0.81 - 0.89	Bleu fluorescent	Sombre
	<i>Infusé</i>	- 0.54 - 0.69 - 0.8 - 0.95	Bleu fluorescent	Bleu fluorescent
	<i>Décocté</i>	- 0.24 - 0.55 - 0.7 - 0.81 - 0.92	Bleu vif	Bleu fluorescent

Ces résultats indiquent que les deux plantes sont relativement riches en composés flavonoïdiques, notamment *Ephédra alata*, ce qui est en accord avec des études déjà publiées (Bennaghmouch *et al.*, 2002, Ben Ammar *et al.*, 2007). Les phases aqueuses des feuilles et des graines d'*Ephédra alata* renferment le nombre le plus élevé en composés flavonoïdiques (entre 7 et 5 spots pour) comparées aux phases organiques des deux parties de la plante et au plante *Ajuga iva* (Wagner et Bladt, 1996 ; Al-khateeb *et al.*, 2014).

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis. Elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de notre extrait (fluorescence, coloration et facteurs de rétention).

#### VI.4. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

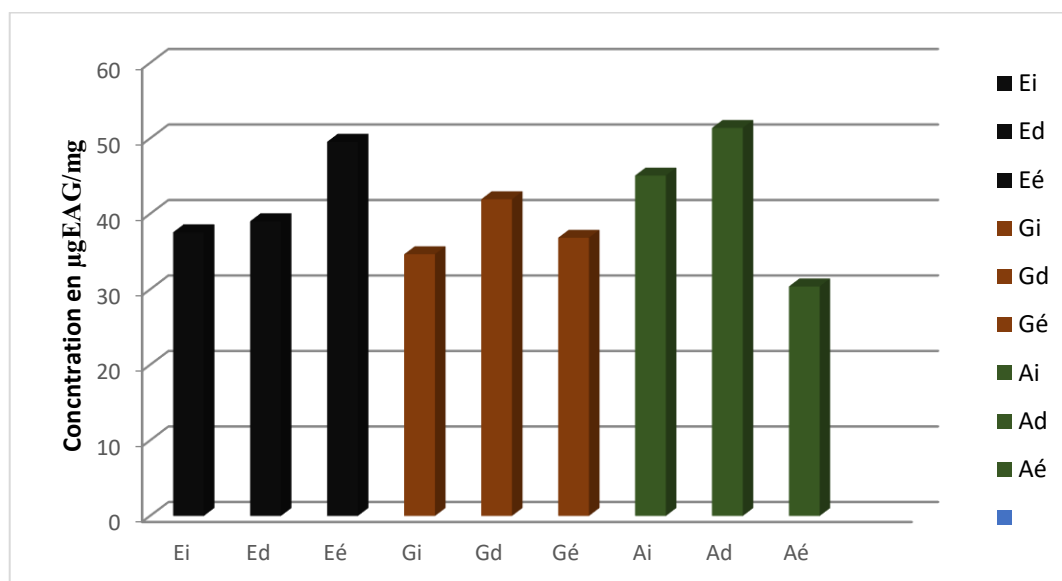
La teneur en polyphénols totaux, des extraits et d'*Ephédra alata* et d'*Ajuga* a été quantifiée en utilisant la L'estimation des teneurs en polyphénols totaux (PPT) et en flavonoïdes (Fv) a été réalisée par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium, respectivement. Les teneurs obtenus sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique EAG/Gmatière végétale sèche pour PPT et en mg équivalent de Quercitine EQ/g matière végétale sèche, en utilisant des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnages de l'acide gallique (PPT) et de la quercétine (Fv), respectivement (**Annexe**)

Les résultats de la quantification des poly phénols et des flavonoïdes sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 8.** Dosage des poly phénols et des flavonoïdes des extraits éthanolique et aqueux d'*Ephédra alata* et d'*Ajugaiva*

Extrait des plantes		Poly phénols	Flavonoïdes
<i>Ephédra alata</i> (Tiges feuillées)	Ephédra infusé	37.57± 0.767	37.44± 0.831
	Ephédra décocté	39.03 ± 0.464	35.18 ± 0.365
	Ephédra éthanolique	49.56± 0.498	52.66 ± 0.452
Graines <i>Ephédra alata</i>	Graines infusé	34.66 ± 0.097	15.21 ± 0.692
	Graines décocté	41.94 ± 0.988	26.64 ± 0.452
	Graines éthanolique	36.84 ± 0.183	36.52 ± 0.475
<i>Ajuga iva</i>	<i>Ajuga iva</i> infusé	45.08 ± 0.864	34.01 ± 0.741
	<i>Ajuga iva</i> décocté	51.39 ± 0.955	25.75 ± 0.362
	<i>Ajuga iva</i> éthanolique	30.39 ± 0.427	39.33 ± 0.956

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique adaptée de Singleton & Ross (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

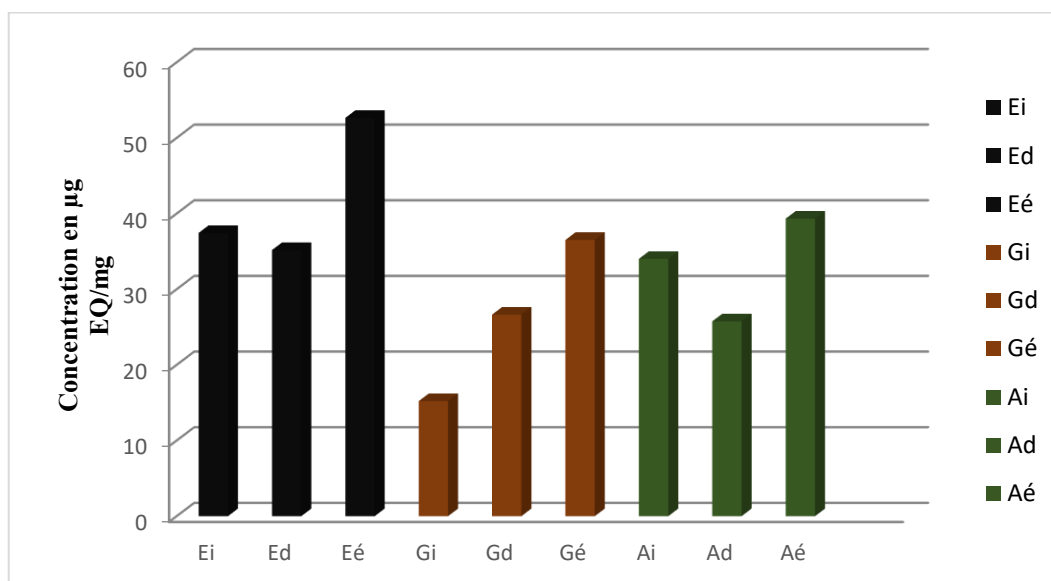


**Figure 2.** Histogramme des teneurs en polyphénols Ces valeurs représentent les moyennes des trois répétitions

Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont illustrés par la figure 1 où la teneur la plus élevée est obtenue par la décoction de la plante d'*Ajuga*:  $51.39 \pm 10.95$  mg EAG/g d'extrait, suivi par l'infusion :  $45.08 \pm 0.86$  mg EAG/g d'extrait. Alors que l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*Ephedra alata* présente ( $49.56 \pm 0.4$  mg EAG/ g d'extrait).

**Messadia (2017)** a trouvé aussi que la teneur la plus élevée est obtenue par la décoction d'*Ephedra* :  $58.37 \pm 2.31$  mg EAG/g MS suivies par l'infusion:  $28.95 \pm 1.67$  mg EAG/g MS. Des valeurs élevées ont été enregistré par **Al-Rimawi et al. (2017)** de  $101.2 \pm 0.9$  mg EAG/g pour l'extrait éthanolique EtOH (80%), et En comparant nos résultats de la plante d'*Ajuga* à ceux des travaux antérieurs, en les trouve meilleur que ceux de Bediaf (2017), pour les extraits aqueux qui présentent des teneurs relativement très faible entre 25,18 et 15,60 mg EAG /g Extrait, selon les régions, comparant aux extraits éthanoliques qui ont des teneurs assez élevées entre 63,45 et 45,69 mg EAG/g Ex selon les régions d'étude.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par une méthode spectre photométrique, dont la quercitrine considérée comme contrôle positif a permis de réaliser une droite d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits des feuilles de myrte qui est exprimée en mg équivalent de quercitrine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g).



**Figure 3.** Histogramme des teneurs en flavonoïdes. Ces valeurs représentent les moyennes des trois répétitions.

D'après l'histogramme illustré ci-dessus, nous avons observé des teneurs en flavonoïdes dans les extraits éthanolique d'*éphédra alata* dans les deux parties des tiges feuilletés et graines et dans la planted'*Ajugaiva*, elles représentent des valeurs de  $52.66 \pm 0.45$  mg EQ/g,  $36.52 \pm 0.47$  mg EQ/g et  $39.33 \pm 0.956$  mg EQ/g respectivement. Les teneurs les plus basses ont été obtenues avec l'infusé aqueux des graines d'*Ephedra* à  $15.21 \pm 0.69$ mg EQ/g, L'étude faite par **Belmimoun (2015)** a montré que l'extrait aqueux des feuilles a une teneur en FVT égale à  $7,256 \pm 0,57$  mg EQ/g qui n'est pas similaire à notre résultat ( $25.7 \pm 0.089$  mg EQ/g). Pour l'extrait éthanolique, les travaux faits par **Kanoun (2011)** et **Belmimoun (2015)** ont montrés des teneurs en FVT de l'ordre ( $6,56 \pm 0,57$  et  $22,423 \pm 0,12$  mg EQ/g), qui sont inférieures à celle de notre étude ( $37.3 \pm 0.173$  mg EQ/g).

Par contre, la teneur en flavonoïdes pour l'extrait aqueux d'*Ajugaiva* obtenue dans notre étude a été largement supérieur à celle enregistré par **Bougandoura (2011)** ( $0,629$  mg EQ/g extrait) et **Beddazekri et Ghemam (2017)** ( $7,37$ mg EQ/g extrait).

Des résultats semblables sont trouvés par **Ibragic et Sofic (2015)**, ont montré que l'extrait méthanolique des rameaux feuillés d'*Ephedra alata* d'Allemagne a révélé des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes élevées que la nôtre, elles sont d'ordre de  $53.3$  mg EAG/g MS et  $2.8$  mg EQ/MS respectivement. Aussi par **Jaradat et al., (2015)** sur les extraits méthanoliques de Palestine qui présente une teneur en polyphénols et en flavonoïdes d'ordre

de 47.62 mg EAG/g MS et 54.66 mg EAC/g MS respectivement, ces valeurs sont proches de nos résultats.

Alors que **Nasar *et al.*, (2019)** ont trouvé des valeurs supérieures de  $117.01 \pm 0.78$   $\mu\text{g}$  EAG/mg pour les polyphénols et  $20.7 \pm 0.21$   $\mu\text{g}$  QE/mg pour les flavonoids dans l'extract aqueux d'*Ephédra alata*.

Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux des travaux intérieurs, car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, des courbes d'étalonnage (cathéchine, quercétine) et les parties des plantes étudiées, réduisent la fiabilité de la comparaison entre les études.

### **VI.5. Activité antioxydante**

L'évaluation de pouvoir antioxydant de nos extraits a été déterminé par deux méthodes : le piégeage de radical libre DPPH et l'ABTS.

#### **VI.5.1. Évaluation de l'activité antioxydant de DPPH**

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des différents extraits des deux plantes afin de préjuger et localiser la fraction possédant le plus fort pouvoir antioxydant.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes à partir desquelles nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition (PI%) obtenus en fonction des concentrations utilisées, ainsi la valeur de la concentration inhibitrice ( $IC_{50}$ ) de chaque extrait. Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits sont représentés dans les graphes ci- après

Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits éthanolique et aqueux.

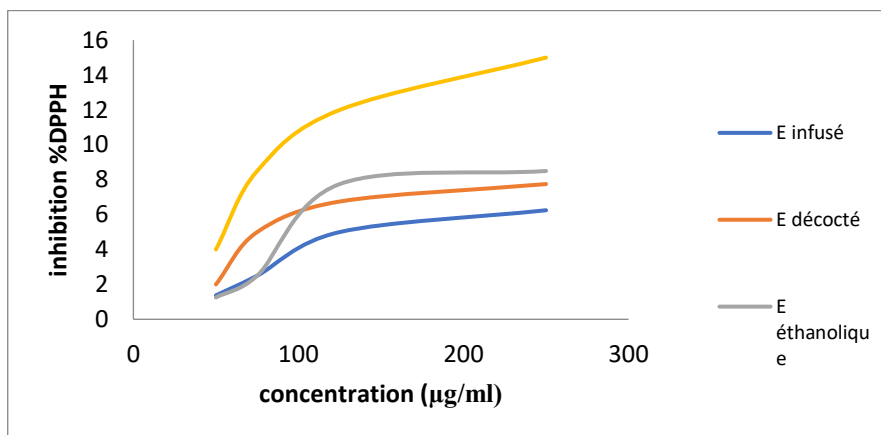


Figure 4. Pourcentage d'inhibition d'*Ephedra alata* (tiges feuillées)

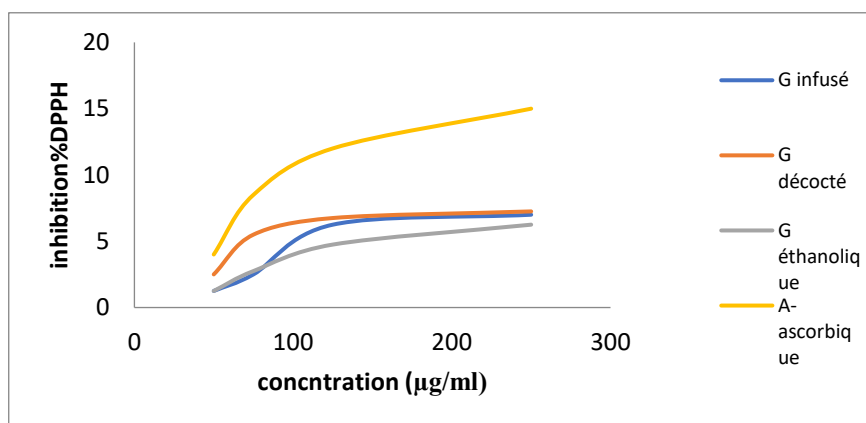


Figure 5. Pourcentage d'inhibition d'*Ephedra alata* (grain)

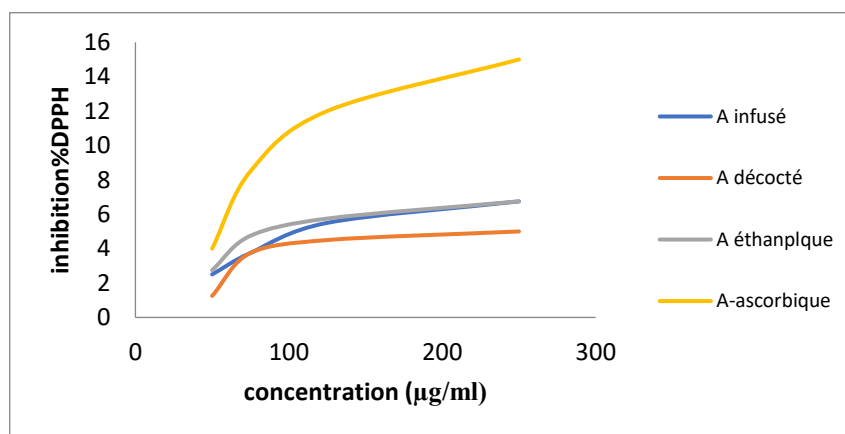


Figure 6. Pourcentage d'inhibition d'*Ajugaiva*

Les résultats du pouvoir antiradicalaire obtenus pour différentes concentrations des extraits *ajugaiva* déterminés sur le DPPH montrent que le pourcentage de réduction augmente en fonction de la concentration des extraits. Ainsi, on constate que l'extrait

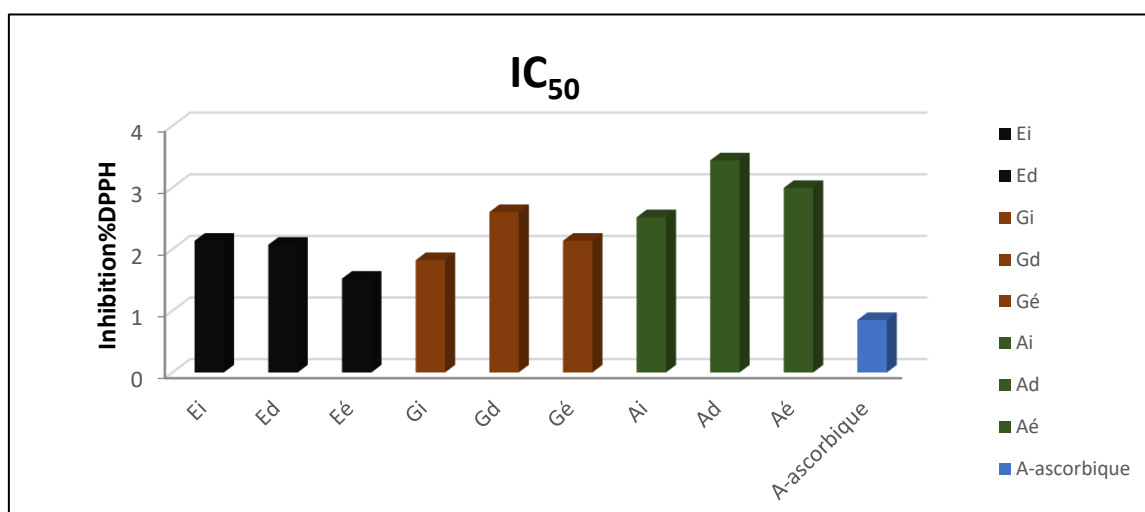
éthanoliques des tiges feuillées d'*Ephedra* possède une activité anti-radicalaire supérieure aux extraits aqueux décocté et infusé.

### ➤ Calcul des IC<sub>50</sub>

La concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre à 50%. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al.*, 2001). Les IC<sub>50</sub> de chacun des différents extraits ont été déterminées. A partir des courbes des taux d'inhibition (figure).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique (Eé) de tiges feuillées d'*Ephedra* présente un effet antioxydant plus important vis à vis du radical DPPH. En effet, La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC<sub>50</sub> µ) est de 1,52 mg/ml. Pour les extraits aqueux par infusion des graines d'*Ephedra* Gi et d'*Ajuga* Ai, ont révélé la meilleure propriété de piégeage du radical DPPH, avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 1.81 mg/ml et 2.51 mg/ml, respectivement, plus importante que les extraits éthanoliques et les décoctés des graines d'*Ephedra* Gi et d'*Ajuga* iva.

La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique(0.85mg/ml), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de l'ensemble des deux extraits testés est moins importante que celui de l'acide ascorbique.



**Figure 7.** Histogramme représentant les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits et standards obtenus par le test DPPH.

La présente étude démontre que l'effet scavenger de l'extrait brute est dose dépendant, ce qui suggère que cette activité est liée à la quantité des polyphénols présente dans l'extrait. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs chercheurs (**Agbor et al., 2007; Hodzic et al., 2009**). Les composés phénoliques sont des antioxydants à propriétés redox qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet, et aussi le rendement et l'activité antioxydante des extraits naturels dépendent du solvant utilisé pour l'extraction.

Les résultats de **Mighri et al., (2019)**, ont révélé dans l'extrait méthanolique d'Ephédra de la région de Sabria-faouar (kebili, Tunisia), une valeur de  $CI_{50}$  égale à 0.33 mg/ml, une capacité supérieure à celle de nos résultats avec l'extrait éthanolique.

L'étude réalisée sur la même espèce d'Ephédra de la région de Cisjordanie (Palestine), par **Kmail et al., (2017)** a montré une  $CI_{50}$  d'ordre 440  $\mu\text{g/ml}$ . **Jaradat et al., (2015)**, ont révélé dans un extrait méthanolique préparé par macération, une  $CI_{50}$  est de l'ordre 16.03  $\mu\text{g/ml}$  contre le standard Trolox utilisé comme contrôle positif ( $CI_{50} = 3.6 \mu\text{g/ml}$ ).

La différence de résultats est due au protocole utilisé, ce qui rend la comparaison difficile.

Les résultats montrent que la valeur d' $IC_{50}$  que nous avons obtenus est inférieure par rapport aux études réalisées par **Hariri et Ouis (2016)** qui a trouvé 512  $\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait méthanolique d'*A. ivade* Mascara, et celui de **Medjeldi et al., (2018)**  $IC_{50}$  de  $0,43 \pm 0,03 \text{ mg / mL}$  et en proche de **Khodja et al. (2014)**,  $IC_{50}$  égale à 1,168 mg/ml, extraits méthanoliques d'*A. iva* récoltée à Béjaïa donc *A. iva* possède un pouvoir antioxydant puissant. Ce qui indique l'efficacité de nos extraits.

Des études phyto-chimiques sur *A. iva* ont révélé la présence de plusieurs flavonoïdes, Composés polyphénoliques, tanins, terpènes et stéroïdes (**Houghton et Raman, 1998**). Elle contient aussi des ecdysones, iridoïdes, et d'autres substances comme l'ajuga rine (**Halimi, 2004**). Plusieurs de ces composés sont connus pour posséder une puissante activité antioxydant. Certains de ces constituants ont déjà été isolés de cette plante (**Ben Jannet et al., 1999**). Par conséquent, l'activité antioxydant observée peut être due à la présence simultanée de ces constituants.

D'après les résultats de l'activité antioxydant de l'extrait éthanolique d'*Ajuga iva*, on déduit que les antioxydants contenus dans les extraits, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes (El Hilaly *et al.*, 2004 ; Halimi, 2004). Étaient capables de piéger les radicaux libres et de réduire les oxydants.

### VI.5.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS :

L'addition d'un antioxydant à une solution de radical cation ABTS•+ decouleur bleu/vert entraîne sa réduction et la décoloration de la solution. Cette activité est évaluée en mesurant l'absorbance à 734 nm et en déterminant la concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) de différents extraits en comparaison avec le standard (Acide ascorbique).

Les résultats sont les suivantes :

Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits éthanolique et aqueux.

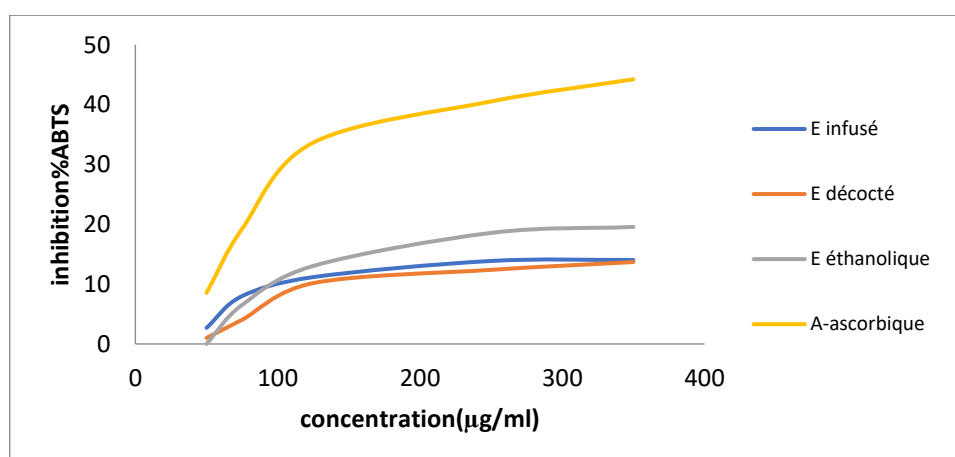


Figure 8. Courbe des pourcentages d'inhibition d'*Ephédra alata* (Tiges feuillées)

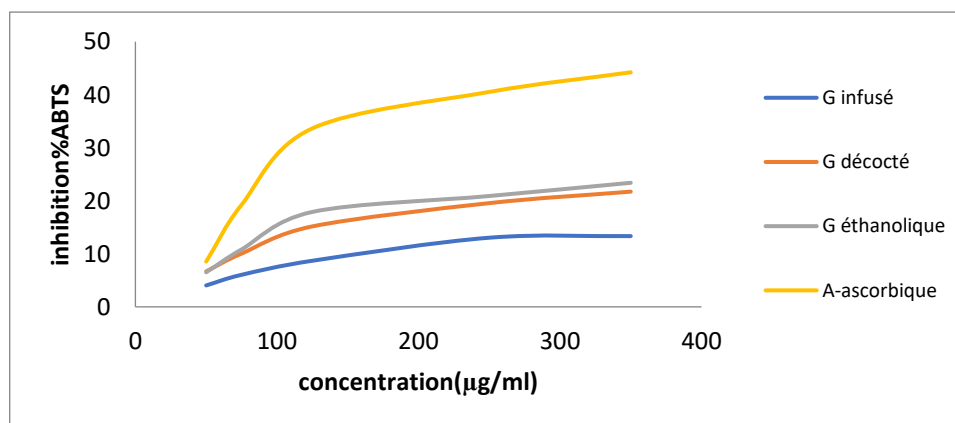


Figure 9. Courbe des pourcentages d'inhibition d'*Ephédra alata* (graines)

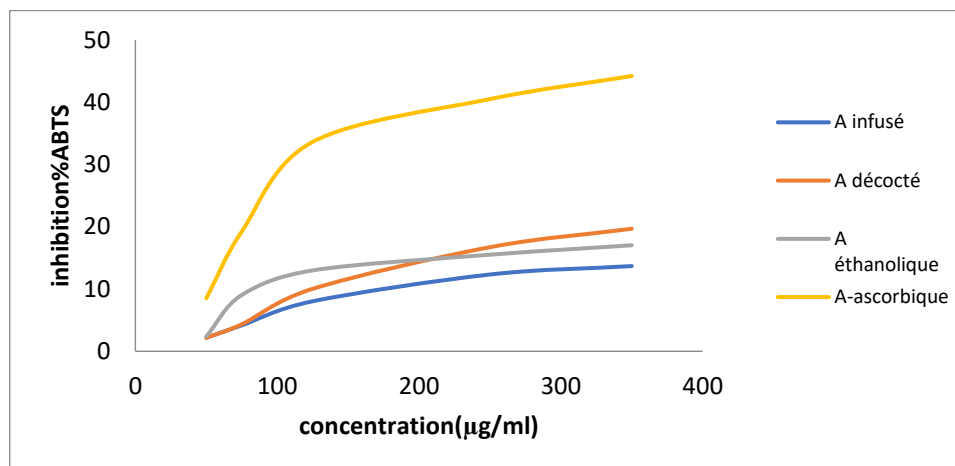


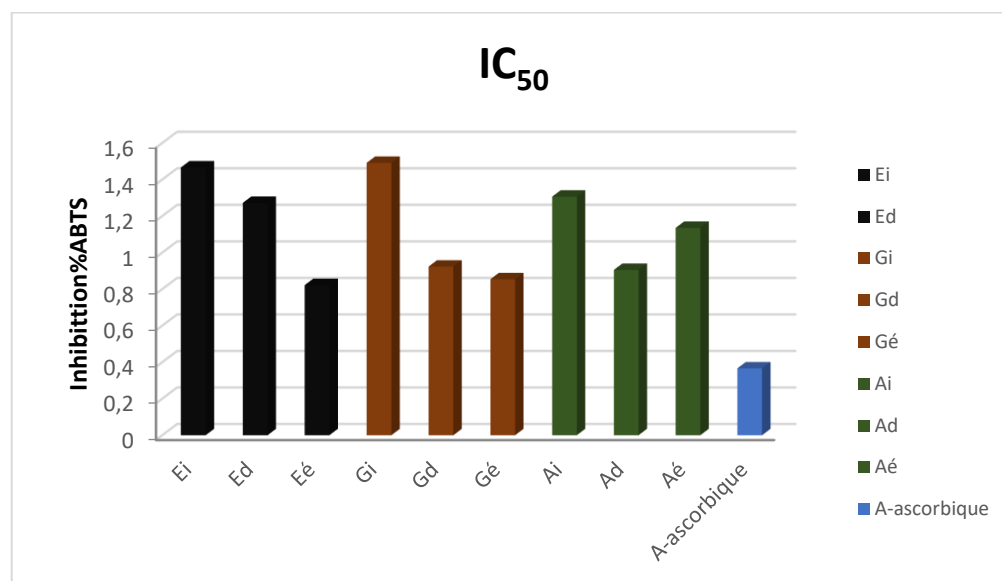
Figure 10. Courbe des pourcentages d'inhibition d' *Ajuga iva*)

#### ➤ Calcul des $IC_{50}$

La concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50}$ ) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre à 50%. Plus la valeur d' $IC_{50}$  est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique des feuilles d'*Ephedra* Ei, représente la meilleure capacité de piégeage des radicaux libres  $ABTS^+$  en comparaison avec les deux autres extraits aqueux par infusion ou décoction qui apparaissent à de faibles valeurs. En effet, La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical  $ABTS^+$  ( $IC_{50}$ ) est de 0.82mg/ml, et 0.85mg/ml, respectivement pour les extraits éthanoliques Ei des feuilles et des graines de l'*Ephedra*. Nos résultats indiquent que l'extrait décocté d'*Ajuga* est le plus élevé par présente d'une activité de piégeage du radical libre  $ABTS$ , par rapport à l'extrait éthanolique et l'extrait par infusion.

Les  $CI_{50}$  des extraits et de standard ont montré que le standard possède un potentiel de piégeage du radical  $ABTS^+$  le plus important qui est estimé par une  $CI_{50}$  (0.36 mg/ml).



**Figure 11.** Histogramme représentant les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits et standards obtenus par le test ABTS

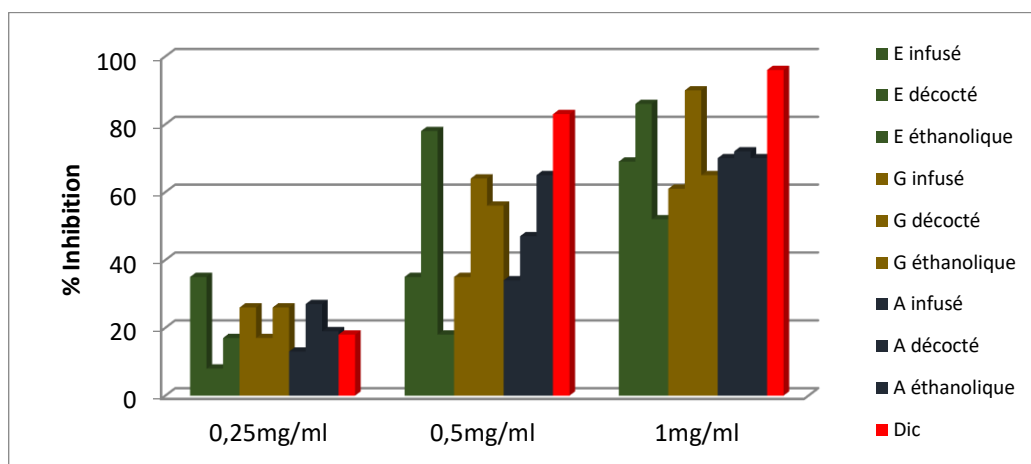
Des travaux précédents de **Chelli et Zenad (2018)** effectués sur *Ephédra alata* de l'Algérie ont révélés que l'extrait éthanolique de la partie aérienne a rapporté une valeur de CI<sub>50</sub> de 49.74 µg/ml faible contre une IC<sub>50</sub> BHT 1.81 µg/ml

Nos résultats montrent une efficacité plus faible par rapport à l'étude (**Senhaji et al. 2020**) l'extrait méthanolique d'*Ajugaiva* représente la capacité antioxydante de 27.33 µg TE/g extrait. Il présente le taux le plus élevé (62.19 ± 0.45 mg TE/g extrait) en comparaison à l'extrait aqueux (49.72 ± 0.24 mg TE/g extrait) (**Fettach et al., 2019**).

Selon **Vangalapati et ses collaborateurs, (2014)**, plusieurs composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les procyanidines présentent une activité anti-radicalaire dose-dépendante. Les caroténoïdes sont utilisés comme des agents antioxydants supplémentaires et les terpénoïdes jouent également un rôle important dans la défense contre les radicaux libres (**Govindarajan et al., 2005**).

#### VI.6.L'activité anti –inflammatoire

Les graphiques montrent les résultats de l'activité anti-inflammatoire *In vitro* des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles et des graines d'*éphédra*, et les feuilles *Ajuga*, qui sont représentés dans l'évaluation des taux d'inhibition de la dénaturation Protéine bovine sérique albumine (BSA) à différentes concentrations. Les absorbances sont mesurées à 416 nm. Les tests ont été réalisés en triplet.



**Figure 12.** Activité d'inhibition de la dénaturation des protéines de l'albumine sérique bovine des extraits d'*Ephedra alata* et d'*Ajuga iva*

Les résultats de la présente étude ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques de graines et de feuilles d'*Ephedra alata* et d'*Ajuga iva* présentent un effet anti-inflammatoire important.

D'après les résultats, il semble qu'il y a une relation proportionnelle entre l'augmentation de la concentration et le pourcentage de la dénaturation de BSA par le diclofénac et par les deux extraits aqueux et éthanoliques des plantes étudiée.

Nos résultats montrent que le pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA pour les extraits était inférieur à celui du diclofénac pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 1 mg/ml le diclofénac a relevé un pourcentage d'inhibition maximale de la dénaturation du BSA de 96%.

Selon **Benarba et al., (2021)**, indiquent que l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* avait le pourcentage d'inhibition le plus élevé à 50 µg/ml ( $99,22 \pm 0,022$  %) encore plus élevé que le diclofénac sodique standard ( $97,65 \% \pm 0,440$ ), tandis que l'extrait méthanolique avait une activité d'inhibition de  $89,74 \% \pm 0,60$  à la même concentration.

Alors que les résultats de cet test selon **Sheikh et al., (2016)** ont montré que inhibition de la dénaturation de l'albumine s'est avéré dans l'extrait de feuilles au méthanol.

Tandis que les résultats de **Atatra et Bouhdiche (2018)** ont montré que Méthode de dénaturation du sérum bovin à une concentration de 1500 µg/ml l'extrait aqueux d'*Ephedra* inhibe très significativement la dénaturation de SAB avec un taux de 79.97%.

Pour la plante d'*Ajugaiva*, d'après **Benamiraat et al., (2021)**, l'IC<sub>50</sub> obtenu pour le diclofénac, utilisé comme molécule de référence, est largement inférieur à celle de l'extrait aqueux de l'*Ajugaiva* (35,29 ± 2,99 µg /ml contre 630,14 ± 5,19 µg /ml respectivement).

D'après ces résultats, on peut conclure que les extraits aqueux d'*Ephédra alata* et d'*Ajugaiva* possèdent une activité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation des protéines. Les deux plantes sont donc capables d'inhiber la production d'auto-antigènes protéiques induisant une réponse immunitaire et participant ainsi à l'entretien de l'inflammation ce qui a pour incidence de nombreuses maladies inflammatoires notamment la polyarthrite rhumatoïde (**Sharma, 2011 ; Habibur et al., 2015**).

#### VI.7. L'activité anti-microbienne

Tous les extraits éthanoliques et aqueux par infusion et décoction des deux plantes étudiées, sont non actifs contre toutes les souches bactériennes étudiées (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*). Les champignons (*A. niger* et *C. albicans*) manifestent comme des souches résistantes à la concentration 100 mg/ml des extraits étudiés.

Des études sur l'*E. alata* prélevée de la région de Ouargla montrent que le meilleur pouvoir d'inhibition a été contre *S. aureus* comparativement à *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Chebouat et al., 2014**). (**Bussmanna et al 2008**) utilisent l'extrait éthanolique d'*E. americana* du nord du Pérou a donné des zones d'inhibition de 22mm, 8mm et des MIC de 32 et 64 mg/ml contre la croissance de *S. aureus* et *E. coli* respectivement.

Selon **Kessal et Bouafia (2003)**, l'extrait méthanolique de la plante entière de l'*E. alata* de la région de Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 9.63 mm, 7.31 mm et 15.32 mm pour *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement. Les extraits AcOEt et DCM des fleurs et des feuilles toujours de l'*E. alata* de la région de Ouargla, ont montré que le meilleur pouvoir d'inhibition a été obtenu sur *S. aureus* comparativement à *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Chebouat et al., 2014**).

**Bouguettaya et Dehamnia (2019)** a indiqué que l'extrait aqueux de l'*Ephedra alata* présente un effet inhibiteur sur les deux champignons testés *A. niger* et *C. albicans* avec des diamètres de 12 mm à la concentration de 100 mg/ml.

Selon **Makni et al., (2013)**, les extraits méthanoliques d'*A. ivade* la Tunisie ont présenté des activités antibactériennes et antifongiques prometteuses que les extraits aqueux, ou, les zones d'inhibition de l'extrait méthanolique entre 05 mm à 27 mm pour les germes (*B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*) à une concentration de 30 mg/ml, et arrivant à 10mm contre *A. niger* dans 'extrait méthanolique.

D'autres données montrent que l'extrait d'*A.iva* d'Algérie est potentiellement une bonne source d'agents antimicrobiens et démontre l'importance de ces plantes dans la médecine (**Bouabdelli et al., 2012**). Une étude ethnopharmacologique a révélé que la plante *Ajuga* a des importantes activités antibactériennes, ces activités sont liées à leur contenu en composés actifs, tels que *l'ajuga*, *pyrine A*, la bractéonine A, la lupuline C et les iridoïdes qui ont une large gamme d'activité biologique et pharmacologique (**Zerroug et al., 2011**).

En effet, la membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries GRAM négatif semble constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (**Nikaido, 1994**).

Par conséquent, l'activité biologique d'une plante naturelle est en relation directe et en corrélation avec sa composition chimique. Il est assez difficile d'attribuer l'effet antimicrobien à un seul essai en vue de la pénurie de milieu de culture dans laboratoire.

# *Conclusion*

## Conclusion

---

---

### Conclusion générale

Les plantes médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale. Dans l'industrie pharmaceutique, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Dans ce contexte, L'objectif de notre travail était d'évaluer les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire antibactériennes et antifongique *In vitro* de différents extraits de deux plantes *Ephédra alata alenda* (tiges feuillées et graines) et *Ajuja iva*.

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires suivante : les alcaloïdes, tanins, terpanoïdes, saponosides, Anthraquinones, mucilages et quinones dans la partie arienne de *Ephédra alataalenda* et des terpénoïdes, anthocyanes et phénols aussi les tanins, flavonoïdes alcaloïdes, quinones, saponines, sucres réducteurs et les amines sont présents dans *l'Ajuja iva*. Ces métabolites secondaires ont une grande valeur importante vis-à-vis le stress environnemental ou le stress oxydatif.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux dans les extraits analysés montre que tous les extraits sont riches en ces composés. Le taux le plus élevé est enregistré dans l'extrait décocté d'*Ajuja iva* (51.39 mg EAG/g) suivie par l'extrait éthanolique d'*Ephédra alata* (49.56 mg EAG/g) qui a enregistré un taux de 52.66 mg EQ/g des flavonoïdes.

Le pouvoir antioxydant des extraits aqueux et éthanoliques d'*Ephédra alataalenda* (feuilles et graines) et d'*Ajuja iva* a été évalué *in vitro* par deux méthodes complémentaires ; DPPH, ABTS  $\cdot^+$ , cette évaluation a montré que les deux plantes étudiées présentent des propriétés antioxydantes remarquables, plus importante dans les extraits des feuilles d'*Ephédra* par rapport aux autres extraits. Les Capacités antioxydantes révélées *in vitro* peuvent être liées directement à la richesse de cette partie de plante en polyphénols et flavonoïdes Les résultats ont révélé que aussi que les extraits polaires sont les extraits les plus actifs.

Pour l'activité anti-inflammatoire des différents extraits des deux plantes, des résultats considérables de 96% et 83% pour le test d'inhibition de la dénaturation de la protéine l'albumine bovine SAB, présenter par l'extrait aqueux par décoction des graines d'*Ephédra* et l'infusé des feuilles de la même plante. Les extraits d'*Ajuja* a montré aussi un effet important dans le test d'inhibition de la dénaturation des protéines SAB.

## Conclusion

---

---

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur six germes à savoir : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. typhimurium*, *A. niger*, *C. albicans* par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits aqueux et éthanoliques des deux parties d'Ephédra et d'Ajuga n'avaient pas une activité antibactérienne contre les quatre bactéries étudiées dans la concentration de 100 mg/ml, elles n'ont pas aussi affecté la croissance de *A. niger*, *C. albicans*.

A travers les résultats obtenus de cette étude, nous pouvons conclure que l'*Ephédra alata* et l'*Ajuga Iva* possèdent une variabilité de la composition chimique importante pour traiter les différentes maladies, elles pourraient être utilisées dans le domaine pharmaceutique et médical.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Il serait donc intéressant de mener une enquête détaillée sur les extraits démontrant d'autres activités, d'identifier et caractériser les espèces chimiques ou les composés responsables des activités biologiques *in vitro* : et *in vivo*.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- **ABULA, T., S. RAO, A. MENGISTU, S. WORKU (2004).** Dawit. Pharmacology- Lecture notes for Health Science Students. Ethiopia Public Health Training Initiative, The Carter Center.
- **ADDITIVES, E. P. O. F. AND N. S. A. T. (2013)** FOOD Scientific Opinion on safety evaluation of Ephedra species for use in food. EFSA Journal, 2013, 11(11), 3467.
- **Al-khateeb E., Al-Ani H., Al-Kadi K., Al-Obaidi E.D.F., Shalan N., Al-Rawi N., (2014).** Investigation of the Alkaloids of Two Ephedra Spp. Wildly Grown in Iraq. Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences.Vol.7. N°3, PP. 191-198.
- **Al-Rimawi F., Abu-Lafi S., Abbadi J., Alamarneh A., Sawahreh R.A., Odeh I. (2017).** Analysis of Phenolic and Flavonoids of Wild *Ephedra Alata*. Plant Extracts by Lc/Pda and Lc/Ms and Their Antioxidant Activity. *African journal of traditional complementary and alternative medicines*, 14(2), 130– 141.
- **Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A., Sawahreh, R.A., Odeh I.,(2017).** Analysis Of Phenolic And Flavonoids Of Wild *Ephedra Alata*. Plant ExtractsBy Lc/Pda And Lc/Ms And Their Antioxidant Activity. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 14(2), 130–141p.
- **Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A. A., et al. (2017).** Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 130-141.
- **AL-RIMAWI, F., S. ABU-LAFI, J. ABBADI, A. A. ALAMARNEH (2017).** Analysis of phenolic and flavonoids of wild Ephedra alata plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 130-141.
- **Al-Sanafi AE., 2017.** Therapeutic importance of *Ephedra alata* and *Ephedrafolita-A* review. *Indo Am. J. P. Sci*; 4(02), 399-406p.
- **Aly, R., Ravid, U., Abu-Nassar, J., Botnick, I., Lebedev, G., Gal, S., ... & Ghanim, M. (2011).** Biological activity of natural phytoecdysteroids from *Ajuga iva* against the

sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* and the perseae mite *Oligonychus perseae*. *Pest management science*, 67(12), 1493-1498.

- **Amakura, Y., M. Yoshimura, S. Yamakami, T. Yoshida (2013)** Characterization of phenolic constituents from *Ephedra* herb extract. *Molecules*, 2013, 18(5), 5326-5334.
- **Amel, B. O. U. D. J. E. L. A. L. (2013)**. Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie. *Ajuga iva, Artemisia herba alba*.
- **Aruoma O.I. (2003)**. Methodological considerations for characterizing potential Antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mutation Research*, 9(20): 523 - 524
- **Atatra, A., & Bouhdiche, L. (2018)**. Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale : *Ephedra alata alenda*. Université 8 Mai Guelma.
- **Ayari B., Leila R., Sana Z., Hnia C. and Ahmed M. (2013)**. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Ajuga iva* L. essential oils, *Revue F. S. B XI*. 203.
- **Aziman, N., Abdullah, N., Noor, Z., Zulkifli, K., & Kamarudin, W. (2012)**. Phytochemical constituents and in vitro bioactivity of ethanolic aromatic herb extracts. *Sains Malaysiana*, 41(11), 1437-1444.
- **Baghiani, A., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Ameni, D., Djermouni, M., Khelifi-Touhami, F., ... & Arrar, L. (2011)**. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga iva* L. Extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 21-30.
- **Barnes, J., L. Anderson and D. Phillipson (2007)**. Sage. Herbal medicines
- **Barouki R.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*. 2006; 22(3): 266- 272.
- **Bashan, N., Kovan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A. (2009)**. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews*. 89(1), 27-71.
- **Baydar, H., Özkan, G., Erbaş, S and D. Altındal, D. (2009)**. Yield, Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts and Essential Oils of Sage and Rosemary Depending on Seasonal Variations. I st IC on Culinary Herbs, pp: 383-390.

- **Bell A., Bachman S.,(2011).***Ephedra alata*. The IUCN Red List of Threatened Species.T201688A9165505, The IUCN Red List Partnership.7p.
- **Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlef I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhourri W., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. (2007).** Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Ann. Microbiol.*; 57: 453-460
- **Bendif H ; (2017).** Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajuga iva* (L.) Schreb., *Teucrium polium*L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES P : 28 ; 29 ,1
- **Bendif, H., Lazali, M., Harir, M., Miara, M. D., Boudjeniba, M., & Venskutonis, P. R. (2017).** Biological screening of *Ajuga iva* extracts obtained by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction. *J. Med. Bot, 1*, 33.
- **Bennaghmouch, L., Hajjaji, N., & Gmira, N. (2002).** Flavonoïdes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb (Labiée). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 22(1), 25-30.
- **Bensakhria A. (2018).** toxicologie Générale : Le stress oxydatif. Chapitre IX, p 70-86.
- **Blumenthal, M., et King, P. (1995).** Ma-huang : Ancient herb, modern medicine, regulatory dilemma. *Herbalgram* 34, 22–26, 43, 56 –57.
- **Blumenthal, M., W. BUSSE, A. GOLDBERG, J. GRUENWALD (1998).**..The complete german commission E. Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicine. Austin, TX: American Botanical Council,
- **Botsoa J. A. (2010).** Purification et caractérisation chimique et biologique partielles des principes actifs des extraits de feuilles de *Pechia madagascariensis* (apocynaceae). Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies (DEA) Université d'Antananarivo. Mémoire en ligne. p 13.
- **Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2010).** Iridoid extracts from *Ajuga iva* increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet. *Nutrition research*, 30(5), 358-365.

- **Boudjouref M,(2011).**Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait d'Artemisia Campestris L.thèse de magister en biochimie .Université ferhat Abbes, Sétif. Algérie. p99.
- **Bougandoura N, (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales Satureja calaminthas sp nepta (nabta) et Ajugaiva L.(chendgoura) de l'ouest d'Algérie, Thèse de magister en Biologie, Université Abou BakrBelkaid-Tlemcen, 97p.
- **Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E.2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Review Plant Science 161 : 839–851.
- **BOURMITA Y., BELBOUKHARI N., CHERITI A et OULD EL HADJ M.D., (2013).** Recherche préliminaire des sources végétales sahariennes à alcaloïdes pour usage bioinsecticides. Algerian journal of arid environment, 3 (1) : 98-102.
- **Bouyahya, A., El Omari, N., Elmenyiy, N., Guaouguaou, F. E., Balahbib, A., El-Shazly, M., & Chamkhi, I. (2020).** Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *Ajuga iva* (L.) schreb. *Journal of Ethnopharmacology*, 258, 112875.
- **Buck,T.A., Paletta,T.J., Khindurangala,A.S., Beck, L.C., Winter,H.A.,(2013).** A Noncovalently reversible paramagnetic switch in water, *J. Am. Chem. Soc.* 135 :10594-10597.
- **Cai, L., Shi, F., & Gao, X. (2011).** Preliminary phytochemical analysis of *Acantho panax trifoliatus* (L.) Merr. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 4059-4064.
- **Caveney, S., Charlet, D. A., Freitag, H., Maier-Stolte, M., et al. (2001).** New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). *American Journal of Botany*, 88(7), 1199-1208.
- **Chabane, D., Saidi, F., Rouibi, A., & Azine, K. (2013).** Activité hypoglycémique de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* L. schreber chez les rats diabétiques induite par l'alloxane. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(1), 120-127.
- **Chahine N , 2014 .** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique. Thèse de doctorat, université de reims champagneardenne ,231p.

- **Chakraborty I., Sanjoy Kunti S., Bandyopadhyay M., Dasgupta A., Chattopadhyay G. D., Chakraborty S. (2007).** Evaluation of serum zinc level and plasma sod activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2): 109-113.
- **Chebouat, E., Dadamoussa, B., Gharabli, S., Gherraf, N., et al. (2014).** Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. *Der Pharmacia Lettre*, 6(3), 27-30.
- **Chelli, M. R., & Zenad, H. (2018).** Évaluation in vitro de l'activité antioxydante des trois espèces végétales dans la région des Aurès. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- **Chopra I C, Abral B K, Handa K L (1960)** Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique Ed.UNESCO, p 48
- **Curtin JF, Donovan M, Cotter TG.** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* .2002; 265: 49-72.
- **Daoudi, A., Bammou, M., Zarkani, S., Slimani, I., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2015).** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'aguelmouss province de khénifra (Maroc). *Phytothérapie*, 1-9. doi: 10.1007/s10298-015-0953-z.
- **De Marchi E., Baldassari F., Bononi A., Wieckowski M., Pinton P. (2013).** Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66shc and protein Kinase C. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013: 1-11.
- **Debray, M., Jacquemin, H., & Razafindrambo, R. (2011)** Phytochemical Screening of *Pentadesma butyracea* Sabine (Clusiaceae) Acclimated in Benin by GC/MS. *Travaux et Documents de l'Orstom, Paris, France*, (213), 8.
- **Dehkordi, N. V., Kachouie, M. A., Pirbalouti, A. G., Malekpoor, F., et al. (2015).** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Ephedra procera fisch. et mey.* *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 72, 341-345.
- **Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales
- **Derbel, S., Touzard, B., Triki, M. A., & Chaieb, M. (2010).** Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the

laboratory and the field. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(7), 471-474.

- **Diafat, A., Araar, L., Derradji, Y., & Bouaziz, F. (2016).** Acute and chronic toxicity of the methanolic extract of *Ajuga iva* in rodents. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **9(2)**, 9-16.
- **Dinan, L. (2009).** The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they?. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 72(3), 126-141.
- **Ebadi, M. (2007).** *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. Florida: Taylor & Francis.
- **Edeaga, H., Okwu, D., & Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 685-688.
- **El Hafian, M., Benlamdini, N., Elyacoubi, H., Zidane, L., & Rochdi, A. (2014).** Étude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la préfecture d'Agadir-Ida –Outanane, Maroc. *Journal of Applied Biosciences*, 81, 7198.
- **El Hilaly J., Lyoussi B., Wibo M and Morel N. (2004).** Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*.93 : 69-74.
- **Favier (2006).** Recherche Google [Internet]. [cité 18 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=favier+2006&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>  
[https://www.researchgate.net/figure/Mecanismes-daction-des-antioxydants-Kalam-et-al-2012\\_fig4\\_279914823](https://www.researchgate.net/figure/Mecanismes-daction-des-antioxydants-Kalam-et-al-2012_fig4_279914823) [accessed 14 Feb, 2024]
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*. 108-115.
- **Fettach, S., et al. (2019).** Phenolic content, acute toxicity of *Ajuga iva* extracts and assessment of their antioxidant and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects. *South African Journal of Botany*, 125, 381-385.
- **Friguet B. (2003).** Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique*, 103-107

- **Gamet-Payraastre Laurence (2011).** Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides. Original Research Article Cahiers de Nutrition et de Diététique. Volume 46, Issue 2 : 82-85.
- **Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory KH.** Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research.* 2007; 41: 251-259.
- **Ghanem S., El-Magly U.I.A., (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, pp. 7-15.
- **Ghasemi, M., Azarnia, M., Jamali, M., Mirabolghasemi, G., et al. (2014).** Protective effects of *Ephedra pachyclada* extract on mouse models of carbon tetrachloride-induced chronic and acute liver failure. *Tissue and Cell,* 46(1), 78-85.
- **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, pp. 2388-2411.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 2007. 62 : 10 : 628-638.
- **Halimi A. (2004).** Les plantes médicinales en Algérie. 1ère édition. BERTI Editions. Alger. Pp 156- 157
- **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* p68, 2831–2846.
- **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, pp.158-163.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* p1, 3-6.
- **Israili Z.H et Lyoussi B., 2009:** Ethnopharmacology of the plants of genus Ajuga. *Pak J Pharm Sci;* 22: 425-462.

- **Jaradat Nidal, Fatima Hussien, Anas Al Ali. 2015.** Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation of total flavonoids, total phenols and antioxidant activity of *Ephedra alata* Decne. *J. Mater. Environ. Sci*, 6(6), 1771-1778.
- **Jaradat, N., Hussien, F., & Al Ali, A. (2015).** Preliminary phytochemical screening, quantitative estimation of total flavonoids, total phenols and antioxidant activity of *Ephedra alata* Decne. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(6), 1771-1778.
- **Jdidi I ,2015.** Etude phytochimique et activités biologiques des extraits et des huiles essentielles de foeniculum vulgare mill. Diplôme National d'Ingénieur en Agronomie et Biotechnologie Végétale. Institut national agronomique de Tunisie. Univ de Carthage., p (6-7).
- **Kamra D.N; Agrwal N; Chaudhary L.C;2006.** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. International Congress Series.Vol.(1293): 156-163.
- **Kanoun, K. (2020)** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) (Mémoire de magistère en Biologie, Université de Tlemcen).
- **Kaushal N., Kudva A.K. (2013).** Oxidative stress and inflammation: "the lesser of two evils" in carcinogenesis. *Journal of Postdoctoral Research* 1(2): 89-101.
- **Kebili Z., (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata*, *Launaea resinifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université des bioproduits. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 102p
- **Keskes, H., Mnafigui, K., Hamden, K., Damak, M., El Feki, A., & Allouche, N. (2014).** In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant properties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S649-S655.
- **Kessal A. et Bouafia O., (2003).** Phytoscreening and antibacterial of the plants *Ephedra alata*, *Launaea resinifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Mem. p. 66.
- **Kusano C., Ferrari B. (2008).** Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and Molecular Biology*, 7(1): 1-1

- **Limberger R.P., Jacques ALB, Schmitt GC. et Arbo MD., (2013 ).** Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*, pp. 1218- 1237.
- **Madani, Z. S., Haddadi, A., Mesgarani, A., Seyedmajidi, M., Mostafazadeh, A., Bijani, A., & Ashraphpour, M. (2014).** Histopathologic responses of the dental pulp to calcium-enriched mixture (CEM) and mineral trioxide aggregate (MTA) in diabetic and non-diabetic rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(4), 263.
- **Magennis, P.E., Fernandez-Trillo,F., Sui,C., Spain,G.S., Bradshaw,J.D., Churchley,D., Mantovani,G., Winzer,K., Alexander,C., (2014).**Bacteria-instructed synthesis of polymers for self-selective microbial binding and labelling, *Nat. Mater.* 748-755.
- **Makni M., Haddar A., Kriaa W. and Zeghal N. (2013).** Antioxidant, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Activities of *Ajuga iva* Leaf Extracts. *International Journal of Food Properties*,16, 756-765.
- **Martínez-Cayuela M., (1995)-** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, Vol. 77, pp: 147-161. *médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en biologie*
- **Mima A. (2013).** Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: New Insights on Its Inhibition as New Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*, 1-8.
- **Mohammedi, Z. (2013).** Étude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie (Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen).
- **Mohapatra, H., Kleiman,M., Esser-Kahn,P.A., (2017).** Mechanically controlled radical polymerization initiated by ultrasound, *Nat. Chem.* 1-5.
- **Nasar, M. Q., Khalil, A. T., Ali, M., Shah, M., et al. (2019).** Phytochemical analysis, *Ephedra procera* CA Mey.-mediated green synthesis of silver nanoparticles, their cytotoxic and antimicrobial potentials. *Medicina*, 55(7), 369.
- **Newman DJ; Cragg GM; 2012-**Natural products As Sources of New Drugs over the 30Years from 1981 to 2010. *J. Nat.Prod.*Vol. (75) : 311-335.

- **Ohtsuki, A., Lei, L., Tanishima, M., Goto, A., Kaji, H. (2015).** Photocontrolled organocatalyzed living radical polymerization feasible over a wide range of wavelengths, *J. Am. Chem. Soc.* 5610-5617
- **Okerulu, I., Aina, J. (2001).** The Phytochemical analysis and antibacterial screening of extracts of *Tetracarpium Conophorum*. *Journal of Chemistry Society of Nigeria* 26(1) :53-5.
- **Oloyede, O. (2005).** Chemical profile of unripe pulp of *Caricapapaya*. *Pakistan. Journal of Nutrition* ; 4(6)379-81.
- **Orlando, J.J., Tyndall, S.G., Wallington, J.T., (2003).** The atmospheric chemistry of alkoxy radicals, *Chem. Rev.* 4657-4690.
- **Ozenda P., 1991-** Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3<sup>ème</sup> Ed.). 662 p
- **Pastre J, Priymenko N.** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd Vét.* 2007; 158 (4): 180-189
- **Phinney K.W., Ihara T. et Sander L.C., (2005) -** Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077, pp. 90–97
- **Pizza V., Iorio E., Capasso A. (2013).** Parkinson's disease and oxidative stress: evaluation by BAP and d-ROMs tests. *Pharmacologyonline* 1: 34-38
- **Rahman, K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging.* 2(2), 219.
- **Rosine, C , Momo, D.(2020).** Évaluation de l'activité anti dermatophytique des extraits auméthanol et fractions d'*Acalyphammahirtum* (melastomatacees). Université de Dschang– Master en biochimie clinique et pharmacologie.
- **Rouibi A., Chabane D., Saidi F and Azine K. (2012).** Étude comparative de l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* L. et de l'ibuprofène chez les souris. *Afrique Science.* 8(2): 131-137

- Shekelle, P. G., Hardy, M. L., Morton, S. C., Maglione, M., et al. (2003). Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA*, 289(12), 1537-1545.
- **Shin M., Yang H., Ki H.**(2013). Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
- **Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 2002; 33(5): 575-586.
- Spécialité : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèses. Université Abou Bekr-Belkaid, Tlemcen. 23.
- **Taleb-Senouci, D., Krouf, D., Ghomari, H., Lacaille-Dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2008).** Effect of an aqueous extract of *Ajuga iva* on glycaemia, reverse cholesterol transport and atherogenic ratios in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(OCE5), E194.
- **Tang, B., Li,L.W., Chang, Y., Yuan,B., Wu, Y., Zhang, T.M., Xu,F.J., Li,J., Zhang,X., ( 2019).**A supramolecular radical dimer: high-efficiency NIR-II photothermal conversion and therapy, *Angew. Chem.* 15672-15677
- **Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. 2008.** Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3) : 1089-1099.
- **V.L. Singleton, J.R. Rossi. (1965),** "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphothungstic acid" *Am. J. Enol. Vitic* , Vol. (16), page : 144.
- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J., (2007)-** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol. 39, pp. 44-84.
- **Vanessa Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., Folli, F. (2013).** Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical design.*19(32), 5695-5703
- **WAGNER, H. et BLADT, S. (1996).** Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas (2nd Ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp : 258-261
- **Wang, Q.X., Gao, F., Zhang, Z.X. (2017).** Initiator-loaded gold nanocages as a light-induced free-radical generator for cancer therapy, *Angew. Chem., Int. Ed.* 1-6.

- **Wessner M., Champion B., Girault J.P., Kaouadji N., Saidi B., Laffont R. (1992):** Cystoids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry*; 31: 3785-3788.
- **Whittaker, W.J., (2003).** Free radical catalysis by galactose oxidase, *Chem. Rev.* 2347-2364.
- **Yashaswini, Sh., John, F and Jim, S. (2019).** Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 8(3) : 3139-3148
- **Zaacks, S., Klein, L., Tan, C. D, Rodriguez, E. R & Leikin, J. B. (1999).** Hypersensitivity myocarditis associated with Ephedra use. *Journal of Clinical Toxicology.* 37: 485–
- **Zhang, C., Zhao, K., Bu,W., Ni, D., Liu, Y., Feng, J. Shi,J.,(2014).** Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence, *Angew. Chem., Int. Ed.* 1770-1774.

# *Annexes*

## Annexes

### Annexes

#### Annexe n°1 : Réactifs de caractérisation

- **Bouchardate** : 2g de l'iode bisubliné (I<sub>2</sub>) +2 g de KI ajusté a100de l'eau distillée
- **Tampon phosphate** : On dissout 2g dechlorure de sodium (Na Cl), 0,05g de Chlorure depotassium (K Cl), 0,36 gd'hydrogénophosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,06 g dedihydrogénophosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dans 200 ml d'eau distillée. Le pH a étéajusté à 6,3 en utilisant de l'HCl (1 N) et mélange le volume à 100 ml avec l'eau distillée.

- **Liqueur de Fehling**

- **Solution A** : 35 g Cu 4+ 500 ml Eau distillée + 5 ml H<sub>2</sub> 4. Laisse refroidir et compléter à unlitre avec l eau distillée.

- **Solution B** : 150 g Sel de Seignette + 500 ml Eau distillée. Refroidir et ajouter 300 ml delessive non carbonaté et compléter à un litre avec l eau distillée.

#### Annexe n°2 :

- **Préparation des extraits :**

- **Préparation d'extrait éthanolique :**



**Figure** : préparation de l'extrait éthanolique (Macération 24h ; Filtration ; Evaporation au Rotavapeur (45°C) ; extrait éthanolique).

## Annexes

### Préparation d'extrait aqueux par décoction :

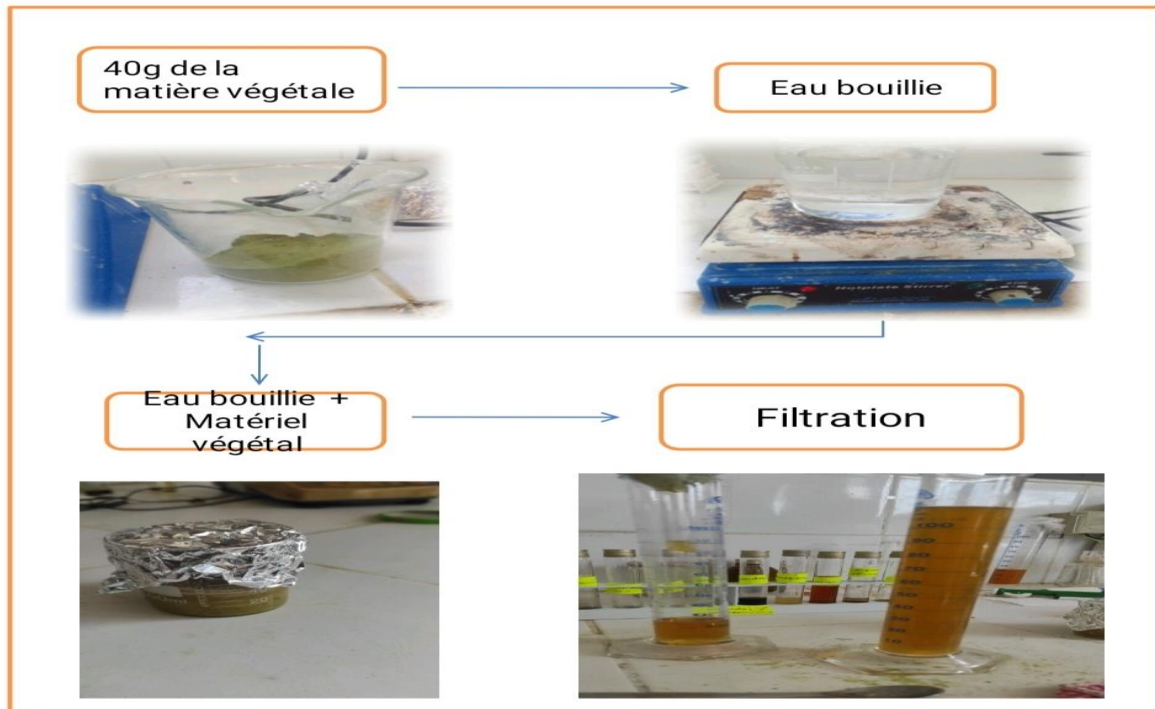


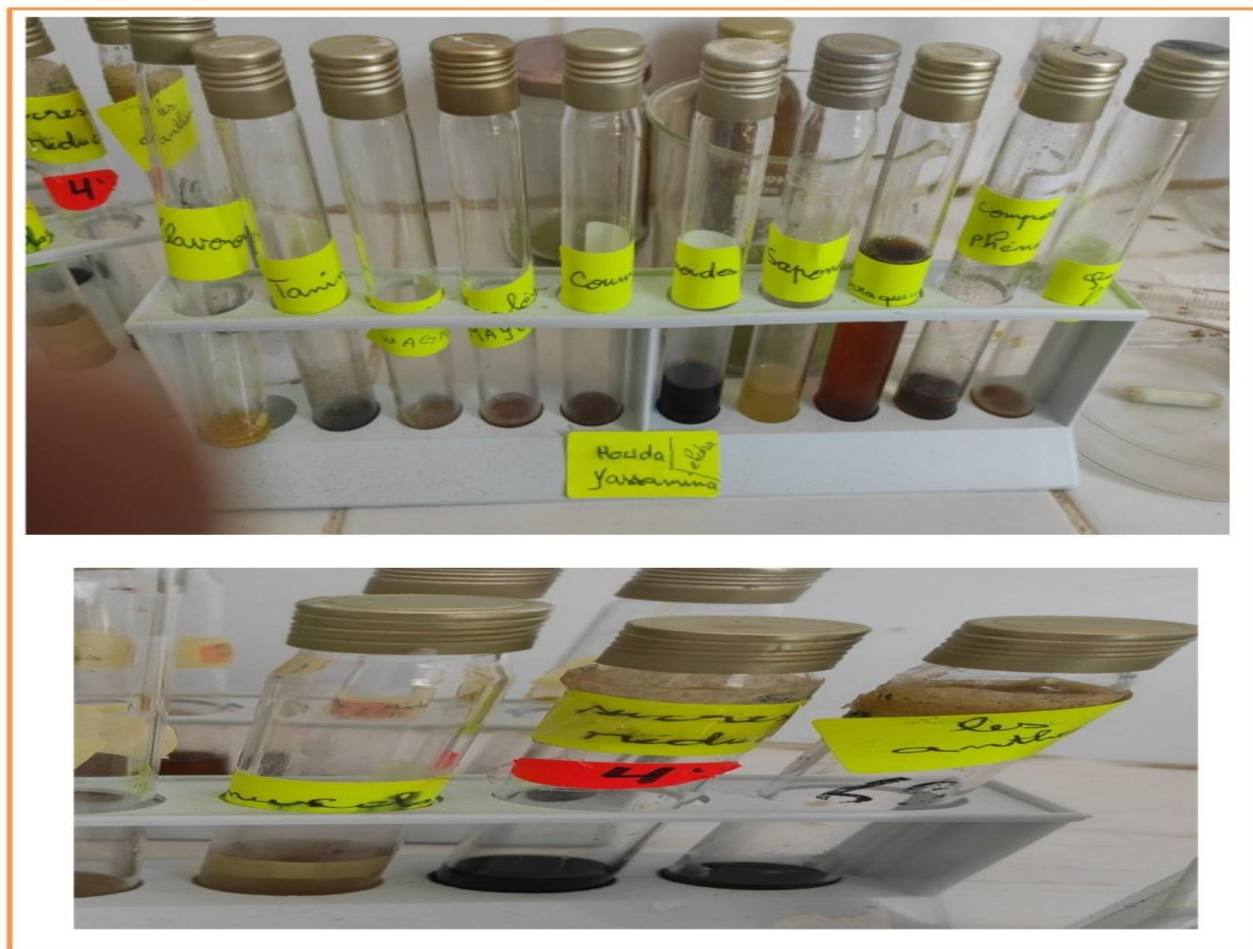
Figure : Protocole d'extraction aqueux

### Annexe n° 3 : Screening phytochimique



Figure : Screening phytochimique des extraits de *ajuga iva*

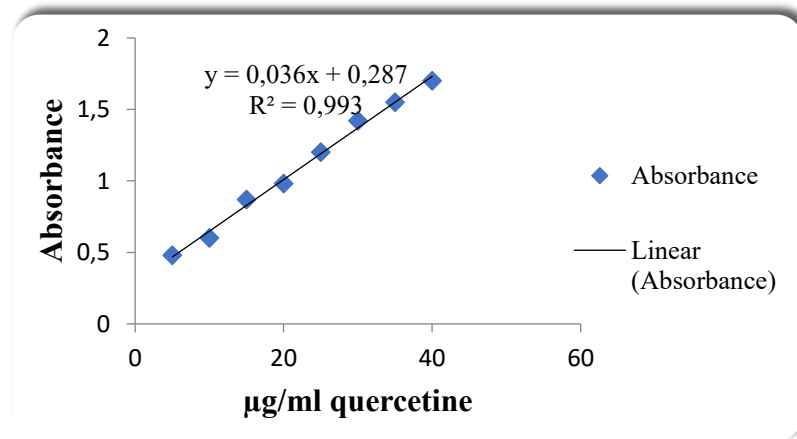
## Annexes



**Figure :** Screening phytochimique des extraits d'éphédra (graines)

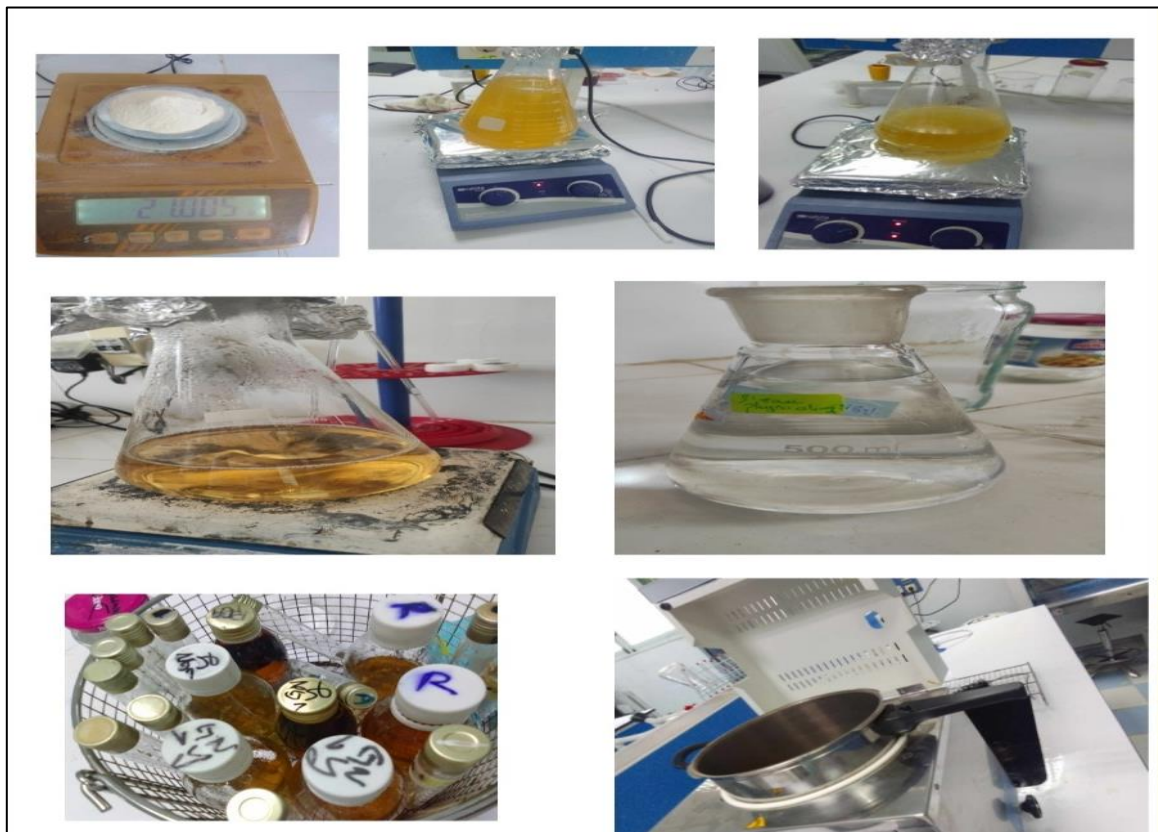


## Annexes



Annexe 03 : Courbe d'étalonnages de la quercitrine (moyenne  $\pm$  SD)

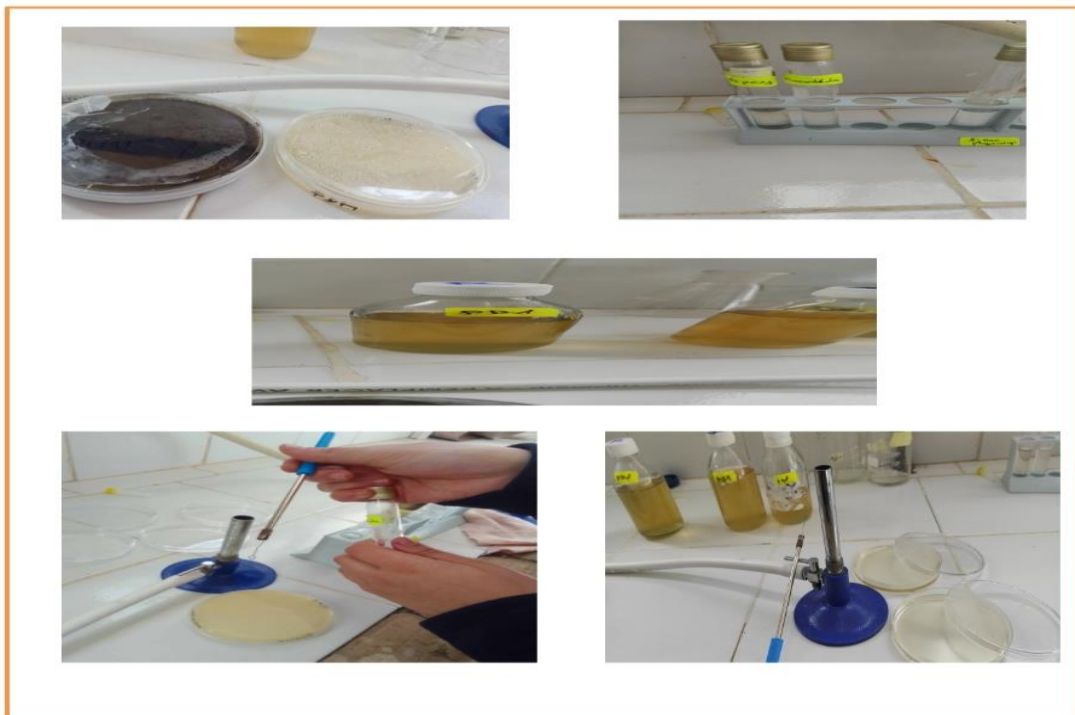
### Annexe n°5 : Repiquage des souches bactériennes et antifongique :



## Annexes



**Figure :** Repiquage des souches bactériennes



**Figure :** Repiquage des souches antifongique