

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR
KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES & DE LA
TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DE GENIE
INDUSTRIEL



جامعة عباس لغرور خنشلة

كلية العلوم و التكنولوجيا

قسم: الهندسة الصناعية

No. Réf. :/...../2019

Mémoire

Présenté par :

Mokadem Chahinez

Pour obtenir le diplôme de MASTER (LMD)

OPTION : Génie des Procédés et Environnement

Thème

**Valorisation d'une plante médicinale
algérienne «*Ephédra sinica*» : étude de la
composition chimique et évaluation d'activités
biologiques.**

Soutenu publiquement le.30/06/2019

Devant le jury :

Mr.BAHLLOULI/SAFIEDDINE

Président

U.A.L.K

Dr. MAKHLOUFI A/SLEM

Rapporteur

U.A.L.K

Mr.MAKHLOUF/AZEDDINE

Examineur

U.A.L.K

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

*Je remercie le DIEU, de ma avoir accordé santé,
volonté, courage et patience le long de ma parcours.*

*Je remercie toute ma famille, surtout mes parents qui
ont fait de moi une femme que je suis.*

*Je témoigne ma profonde gratitude à
Mr makhloufi.A, mon encadreur, pour tous ses efforts et
ses encouragements qu'il a fournis durant ce travail.*

*Je remercie aussi ceux qui m'ont aidé pour achever ce
travail, staff administratif du département de génie*

industriel.

*Autrement dit tous qui a participé à valoriser mon
travail.*

Dédicace

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien morale et source de joie

Et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,

Que dieu te garde dans son vaste paradis

A toi mon père **Rachid**

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, maman **Salih**a que j'adore

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mon cher frère

Lotfi sans oublier mon cher frère elhasen (allah yarhmou)

A ma chère sœur **Nina** et ses enfants **Hatem et monder**

A ma famille

A mon encadreur **Mr. Makhloufi. A**

Aux personnes qui m'ont toujours aidé en encourageant, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et mes amis de cœur

Mana.rajasmichou.houda.hind

A toute personne qui m'aime

A toute personne que j'aime

A tous ceux qui cherchent le savoir

Chapitre I

Figure I.1 : Plantes médicinales, source potentielle de revenus extérieurs

Figure I.2 : La répartition géographique des ZIP

Figure I.2 : *L'éphédra sinica*

Figure I.3 : Répartition géographique de l'*Ephédra* dans le monde

Figure I.4 : Carte géographique représente le site de wilaya de kenchela dans l'Algérie

Figure I.5 : Structure d'éphédrine et de La pseudo éphédrine

Chapitre II

Figure II.1 : Principales sources endogène des radicaux libres

Figure II.2 : Les principaux dommages oxydatifs médiés à l'ADN par les ERO

Figure II.3 : Structure d'acide urique

Figure II.4 : Structure de vitamine C

Figure II.5 : Structure de vitamine E

Figure II.6 : Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque

Figure II.2: La réponse inflammatoire aigue : (A) initiation, (B) amplification, (C) réparation

Figure II.3 : Différentes voies de la formation de kinine

Chapitre III

Figure III.1 : protocole de preparation de la matière végétale

Figure III.2 : Carte géographique représente la localisation d'obtention de plante *Ephédra sinica* (Chechar - kenchela)

Figure III.3: Protocole d'extraction solide liquide

Figure III.4 : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant

Figure III.5: Protocole de l'activité antioxydant d'extrait l'*éphédra sinica*.

Figure III.6: Protocole de l'activité anti-inflammatoire d'extrait l'*éphédra sinica*.

Figure III.7: Protocole de l'activité antibactérienne de l'*éphédra sinica*.

Figure III.8: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait.

Figure III.9: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Figure III.10: Zones d'inhibitions des souches : *Pseudomonas* _ *Staphylococcus* _ *E. coli* _ *Listeria monocytogenes*

Chapitre I

Tableau I.1: zones importantes pour les plantes en Algérie tellienne

Tableau I.2: Principaux alcaloïdes isolés du genre *Ephédra* autres que l'éphédrine

Chapitre II

Tableau II.1: Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Tableau II.2: Principales sources des RL (endogènes et exogène)

Tableau II.3: Les cellules de l'inflammation

Chapitre III

Tableau III.1: le volume total de chaque macération

Tableau III.2: Concentrations des extraits pour le test antioxydant avec DPPH.

Tableau III.3: Les souches bactériennes utilisées.

Tableau III.4: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA

Tableau III.5: Zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur milieu MH (mm).

- A** : Absorbance
- AC** : Absorbance du contrôle
- ADN**: Acide Désoxyribonucléique
- AGE**: Advanced Glycosylation End production
- AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés
- AINS** : Anti -Inflammatoires Non Stéroïdiens
- AS**: Anti -Inflammatoires Stéroïdiens
- At** : Absorbance du l'échantillon
- BSA** : Albumine de sérum bovin
- DMSO** : Dimethylsulfoxyde
- DO** : Densité Optique
- DPPH** : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- GR**: Récepteur des Glucocorticoïdes
- GSH**: Glutathion réduit
- GSSH**: Glutathion oxydé
- HSV** : herpès simplex virus
- IC50**: Concentration Inhibitrice à 50 %
- MTC** : médecine traditionnelles chinois
- NADPH** : Nicotinamide-Adénine-dinucleotide-Phosphate
- PAM** : plantes aromatique et médicinales
- PDF** : Produit de Dégradation de la Fibrine
- ROS** : Reactive oxygen species = Espèces réactifs de l'oxygène.
- UV**: Ultra-violet
- ZIP** : zones importantes pour les plantes



Sommaire



Dédicace.....	
Remerciements.....	
Liste des figures.....	I
Listes des tableaux.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction générale.....	2

Chapitre I : Aperçu sur la plante Ephédra Sinica

I.1.Plantes médicinales et phytothérapie	5
I.1.1.Définitions.....	5
I.2.Historique.....	5
I.3.Les plantes médicinales en Algérie.....	6
I.3.1.Marché.....	6
I.3.2.Répartition géographique.....	7
I.4.Généralités sur l'éphédra.....	9
I.4.1.Genre Ephédra.....	9
I.3.2. Sous espèce Ephédra sinica.....	10
I.3.2.1.Position systématique.....	10
I.3.2.2.Description botanique.....	10
I.3.2.3.Répartition géographique.....	11
I.3.2.4.Utilisation thérapeutique.....	12
I.3.2.5. Pharmacologie.....	13
I.3.2.6.Toxicologie.....	13
I.3.2.7.Travaux antérieurs.....	14
I.3.2.7.1. Activités biologiques de la plante.....	14
I.3.2.7.2.Chimie de la plante.....	15

Chapitre II : Activités anti oxydantes et anti inflammatoires

II.1.Activité antioxydante.....	20
II.1.1.Généralité.....	20

II.1.2. Les radicaux libres.....	20
II.1.2.1. qu'ès ce qu'un radicaux libres ?.....	20
II.1.2.2. Types.....	21
II.1.2.3. Origine des radicaux libres.....	22
II.1.2.3.1. Sources endogènes.....	22
II.1.2.3.2. Sources exogènes.....	22
II.1.3. Le stress oxydatif.....	23
II.1.3.1. Définition.....	23
II.1.3.2. Les cibles de stress oxydant.....	24
II.1.3.2.1. Peroxydation des lipides.....	24
II.1.3.2.2. Oxydation des protéine.....	25
II.1.3.2.3. Oxydation de l'ADN.....	25
II.1.3.2.4. Les glucides.....	26
II.1.4. Les systèmes de défenses antioxydants.....	26
II.1.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	26
II.1.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	26
II.1.4.1.2. Catalase.....	26
II.1.4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)	26
II.1.4.2. Antioxydants non enzymatiques	27
II.1.4.2.1. Les antioxydants non enzymatiques endogènes	27
II.1.4.2.1.1. Le glutathion	27
II.1.4.2.1.2 Acide urique	27
II.1.4.2.2 Les antioxydants non enzymatiques exogènes : végétales.....	28
II.1.4.2.2.2. Vitamine E	28
II.1.4.2.2.3 . Acide lipoïque.....	29
II.1.4.2.2.4. Antioxydants phénoliques	29
II.2. Activité anti-inflammatoire.....	30
II.2.1-Définition de l'inflammation	30

II.2.2. Types d'inflammation	30
II.2.2.1.L'inflammation aiguë	30
II.2.2.2.Inflammation chronique	31
II.2.3. Anti-inflammatoires	31
II.2.3.1.Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	32
II.2.3.2.Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	32
II.2.3.3.Anti-inflammatoires d'origine végétale	32
II.2.4. Cellules de l'inflammation	32
II.2.5.Les médiateurs de l'inflammation	34
II.2.5.1.Médiateurs plasmatiques	34
II.2.5.1.1. Les systèmes coagulation / fibrinolyse	34
II.2.5.1.2.Le système du complément	34
II.2.5.1.3. Le système des kinines/Kallicréine	34
II.2.5.2.Médiateurs cellulaires	35
II.2.5.2.1.Médiateurs lipidique	35
II.2.5.2.2. Les radicaux libre	35
II.2.5.2.3.Amines vasoactives	35
II.2.5.2.4.Cytokines et chimiokin	35
II.2.6.Mécanismes de l'inflammation	36
Chapitre III : Partie expérimentale	
III.1. Matériels et méthodes	39
III.1.1. Matière végétale	39
III.1.1.1. Présentation du site de récolte	40
III.1.2.Extraction solide-liquide par Macération	40
III.1.2.1. Matériels et produits.....	41
III.1.2.3. Mode opératoire.....	41
III.1.2.4. Détermination de rendement.....	42

III.1.3. Les activités biologiques.....	44
III.1.3.1. Première Partie : L'activité antioxydant.....	44
III.1.3.1.1. Tests antioxydants.....	44
III.1.3.1.1.1. Test de chélation des métaux (Ferrozine)	44
III.1.3.1.1.2. test du peroxyde d'hydrogène.....	44
III.1.3.1.1.3. test scavenger de radical ABTS ^{•+}	45
III.1.3.1.1.4. test de blanchissement du f-carotène	45
III.1.3.1.1.5. Test du piégeage du radical libre DPPH	46
III.1.3.1.1.5.1. Matériels et produits	47
III.1.3.1.1.5.2. Mode opératoire	47
III.1.3.1.1.5.2.1. Préparation des dilutions.....	47
III.1.3.1.1.5.2.2. Préparation des solutions de DPPH.....	47
III.1.3.1.1.5.2.3. Préparation et lecture des échantillons	47
III.1.3.1.1.5.2.4. Expression des résultats.....	47
III.1.3.2. Deuxième Partie : L'activité anti inflammatoire	49
III.1.3.2.1. Matériels et produits.....	49
III.1.3.2.2. Mode opératoire.....	49
III.1.3.3. Troisième partie : L'activité antibactérienne.....	52
III.1.3.3.1. Les souches testées.....	52
III.1.3.3.2. Matériels et produits.....	53
III.1.3.3.3. Mode opératoire.....	53
III.1.3.3.3.1. Préparation du milieu de culture	53
III.1.3.3.3.2. Stérilisation du matériel	53
III.1.3.3.3.3. l'antibiogramme.....	54
III.1.3.3.3.3.1. Repiquage des souches bactériennes.....	54
III.1.3.3.3.3.2. Préparation de l'inoculum.....	54
III.1.3.3.3.3.3. Préparation les boîtes de pétri.....	54

III.1.3.3.3.4.Ensemencemen.....	54
III.1.3.3.3.4. Préparation des dilutions de l'extrait.....	54
III.1.3.3.3.5. Dépôt des disques.....	54
III.1.3.3.3.6.Incubation et Lecture.....	55
III.2.Résultats et discussion	57
III.2.1.Evaluation du potentiel anti-radicalaire	59
III.2.2.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	60
III.2.3. Evaluation L'activité antibactérienne	60
Conclusion générale.....	63
Références bibliographiques.....	65



Introduction générale



Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit ^[1].

Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en absence d'un système médical moderne.

Dans les pays en voie de développement, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique.

D'autre part, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie ^[2].

L'Algérie, connue par sa biodiversité et sa flore très diversifiée, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules à propriétés thérapeutiques ^[3].

Ce qui nous a encouragés l'étudier pouvoir antioxydant, anti inflammatoire et antimicrobien, d'une plante médicinale de notre région à savoir l'éphédra *sinica*.

Ainsi, le présent travail, est composé de deux parties distinctes :

Dans une première partie, nous présentons une mise au point bibliographique est menée sur :

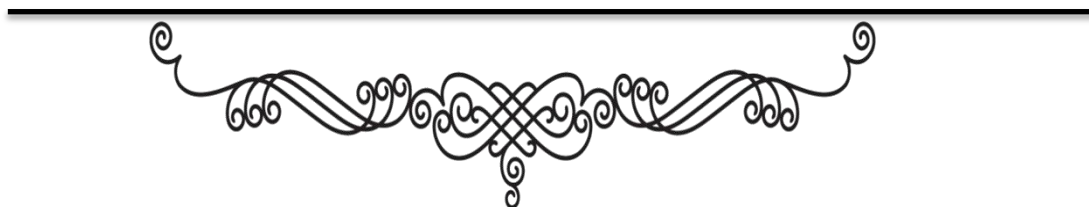
- ✓ L'histoire des plantes médicinales au cours du temps.
- ✓ La définition, et importance de la plante sélectionnée.
- ✓ Ensuite nous décrivons une aperçue sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

La deuxième partie de notre travail concernera la partie expérimentale de cette étude, avec une présentation de différentes techniques d'analyse utilisées au cours de ce travail et présentation des résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



CHAPITRE I



Chapitre I : *Aperçu sur la plante Ephédra Sinica*

Sommaire

- ◆ Plantes médicinales et phytothérapie.....
- ◆ Généralités sur *l'éphédra*
- ◆ Description botanique.....
- ◆ Utilisation thérapeutique.....
- ◆ Pharmacologie.....
- ◆ Activités biologiques de la plante.....
- ◆ Chimie de la plante.....



Dans ce chapitre on va présenter l'une de ces médicaments naturels qui est l'éphédra avec sa description, composition, utilisation, et ses genres ...

I.1.Plantes médicinales et phytothérapie

I.1.1.Définitions

Il existe plusieurs définitions pour désigner une plante médicinale mais, pour faire simple, le terme désigne une plante ou une partie d'une plante possédant des substances appelées principes actifs, pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques sans effets nocifs aux doses recommandées.

Une « drogue végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments ^[4].

Étymologiquement, du grec « phyton » qui signifie plante et « therapein » qui signifie soigner. La phytothérapie est l'utilisation de plantes à des fins thérapeutiques.

Ayant conjointement évoluée avec le développement scientifique et industriel, la phytothérapie revêt désormais des pratiques variées.

La littérature scientifique, de même que la législation des médicaments à base de plantes distinguent, sans systématiquement les opposer, l'approche traditionnelle et l'approche scientifique de la phytothérapie ^[5].

I.2.Historique

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisait les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner les blessures et les maladies.

Ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus Les végétaux peuplaient la planète bien avant l'homme et ont d'abord servi à le nourrir via la cueillette puis la culture. Leur emploi a rapidement évolué en constatant leurs propriétés thérapeutiques -Christ, de l'époque pharaonique, qui furent les premières à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, avec notamment un mélange d'huiles essentielles comme l'huile de cèdre, de basilic, et en utilisant des plantes aux propriétés antiseptiques connues comme le nard de l'Himalaya, la cannelle, le ciste, des produits de sécrétion aromatique comme l'encens ou la myrrhe.

En Occident, dans la Grèce antique, Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine, recommandait déjà l'asperge et l'ail pour leurs vertus diurétiques, le pavot comme hypnotique et les feuilles de saule pour soulager douleurs et fièvre... Au début de notre ère, un autre médecin grec, Dioscoride, établit le premier herbier des plantes

médicinales. Traduit en arabe et en persan, ce traité sera utilisé quelques siècles plus tard par les savants musulmans, qui influenceront les grandes universités de l'époque, notamment celle de Montpellier, le centre européen le plus réputé en botanique.

Les grands médecins : Galien, Discoride, ont trouvé des milliers de remède dans les plantes. Les médecins arabes du moyen Age : AL-Rhazi, Avicenne, soignaient tous leur malades par les plantes ou les alimentaires ^[6].

I.3. Les plantes médicinales en Algérie

Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été fait au IXème siècle par Ishâ-Ben-Amran et Abdallah-Ben-Lounès né à Oran, et qui décrit l'usage de beaucoup de plantes médicinales, mais la plus grande production de livres a été réalisée au dix-septième au dix-huitième siècle ^[7].

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie a été publié en 1942 par Forment et Roques où ils ont mentionné décrit et étudié 200 espèces. La plupart d'entre elles étaient du Nord de l'Algérie et seulement 6 espèces ont été localisées au Sahara ^[8].

I.3.1. Marché

Quant à la grande diversité des plantes médicinales en Algérie et leur usage, une synthèse regroupant toutes ces informations à l'échelle nationale devrait être rapidement entreprise. Des chiffres recueillis auprès du centre national du registre de commerce, montrent qu'à la fin de l'année 2009, l'Algérie comptait 1.926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1.393 sédentaires et 533 ambulants. La capitale en abritait, à elle seule, le plus grand nombre avec 199 magasins, suivie de la wilaya de Sétif (107), Bechar (100) et El Oued avec 60 magasins ^[9].

L'Algérie a importé en 2015 pour plus de 19 millions de dollars en plantes aromatiques et médicinales (PAM), en dépit des potentialités que renferme le pays pour développer ce type de culture qui a trouvé une large clientèle dans la mesure où le nombre de magasins spécialisés dans la vente de ces plantes est en constante progression dans les quatre coins du pays.

D'ailleurs dans ce domaine, l'Algérie est classée 74^{ème} importateur au niveau mondial de plantes aromatiques et médicinales et 44^{ème} mondial pour les importations des huiles essentielles ^[10, 11].

I.3.2. Répartition géographique

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Ce sont des savoir-faire ancestraux transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurales. C'est un héritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées [12].

Dans le Hoggar et en absence de médecins, dans certaines contrées isolées, les Touaregs se soignent avec les plantes médicinales et aromatiques dont ils connaissent le secret transmis de père en fils. En Kabylie, lorsqu'il y a de la neige et que les routes sont coupées, les montagnards utilisent des plantes médicinales et aromatiques pour se soigner (fumigation de feuilles d'eucalyptus contre la grippe). Dans la steppe pendant les transhumances, les nomades utilisent l'armoise blanche pour lutter contre les indigestions.



Figure I.1 : Plantes médicinales, source potentielle de revenus extérieurs [13].

La richesse de la flore algérienne est donc incontestable, elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (FAO, 2012) Ces plantes sont certes abondantes, mais dispersées géographiquement et ont des potentialités de rendement faible, leur contrôle est difficile, leur exploitation ne suffit pas à couvrir les besoins nationaux de la médecine, la pharmacie et de l'herboristerie. Ces plantes se localisent

majoritairement dans des Zones Importantes pour les Plantes (ZIP). Une ZIP est un « site naturel ou semi-naturel présentant une richesse botanique exceptionnelle et/ou une composition remarquable de plantes. Yahi et al, en 2010 sur la base d'un travail bibliographique ont défini 14 ZIP en Algérie tellienne (tableau I.1).

Tableau I.1 : Zones importantes pour les plantes en Algérie tellienne.

Les zip	description	Donnees floristiques
El kala 2	Monts de la medjerda	32 menacées ,20 endémiques
Pèninsule de l'Edough	Monts et pèninsule	38 menacées ,11 endémiques
Bèlezma	Massif forestier	43 menacées ,12 endémiques
Chaine des babor	Massif forestier	50 menacées ,23 endémiques
Massif de l'Akfadou	Massif forestier	38menacées ,28 endémiques
Djurdjura	Massif forestier et pelouses orophytiques	88 menacées ,40 endémiques
Theniet El had	Massif forestier	30 menacées ,19 endémiques
Chrèa	Massif forestier et gorges	63 menacées ,22 endémiques
Djebel ouahch	Milieus ouverts	21 menacées ,12 endémiques
Gouraya	Matorral et falaises calcaires	17 menacées ,11 endémiques
El kala 1	Complexe de zones humides et littorales	94 menacées ,20 endémiques
Guebès	Plaine,milieu marècageux	41 menacées ,4 endémiques
Sahel d'oran	Falaises et dunes cotières	36 menacées ,2 endémiques

La plupart de ces ZIP se situent en zones forestières. Deux seulement en zones humides et une dernière en zone littorale. Aucune n'est située en zone aride, alors même que des plantes endémiques y sont présentes [14-16].



Figure I.2 : La répartition géographique des ZIP

I.4.Généralités sur *l'éphédra*

I.4.1.Genre *Ephédra*

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *l'éphédra* inclue environ 40 espèces dans le monde [17]. Est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se termine par une pointe souvent acérée. Au niveau des nœuds, qui sont écarté 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 [18-20].

I.3.2. Sous espèce *Ephédra sinica*I.3.2.1. Position systématique ^[21]

Nom latin	<i>éphédra sinica</i>
Nom anglais	<i>éphédra</i>
Nom anglais	<i>Ephédra</i> , raisin de mer
Nom vernaculaire	Azrem, âlenda
Famille	ephedracées
Partie utilisée	tige (rameaux)
Constituants	Alcaloïdes ; Ephédrine

I.3.2.2. Description botanique

L'éphédra sinica est un arbuste de 50 cm à 1 mètre de hauteur. Les tiges fortes, fines, cylindriques et ramifiées confèrent un aspect touffu, vert glauque. Elles supportent des feuilles opposées, longues, brunes, mortes et membraneuses sur les pieds âgés. C'est un arbrisseau trapu et dioïque (il y a des mâles et des femelles). A chaque ramification, il présente une gaine (feuille modifiée) de forme allongée et bilobée.

Les fleurs sont de couleur jaune et les fruits rouges sont des akènes (un fruit à graine unique) qui ressemblent à des baies ou à des grains de raisins. Certaines espèces *d'éphédra* ne contiennent pas d'éphédrine, la substance active que contient *l'éphédra sinica* et ses cousins. Elle préfère les sols sablonneux ^[22].



Figure I.2 : *L'éphédra sinica* [23].

I.3.2.3. Répartition géographique

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes [24]. Et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques [25].

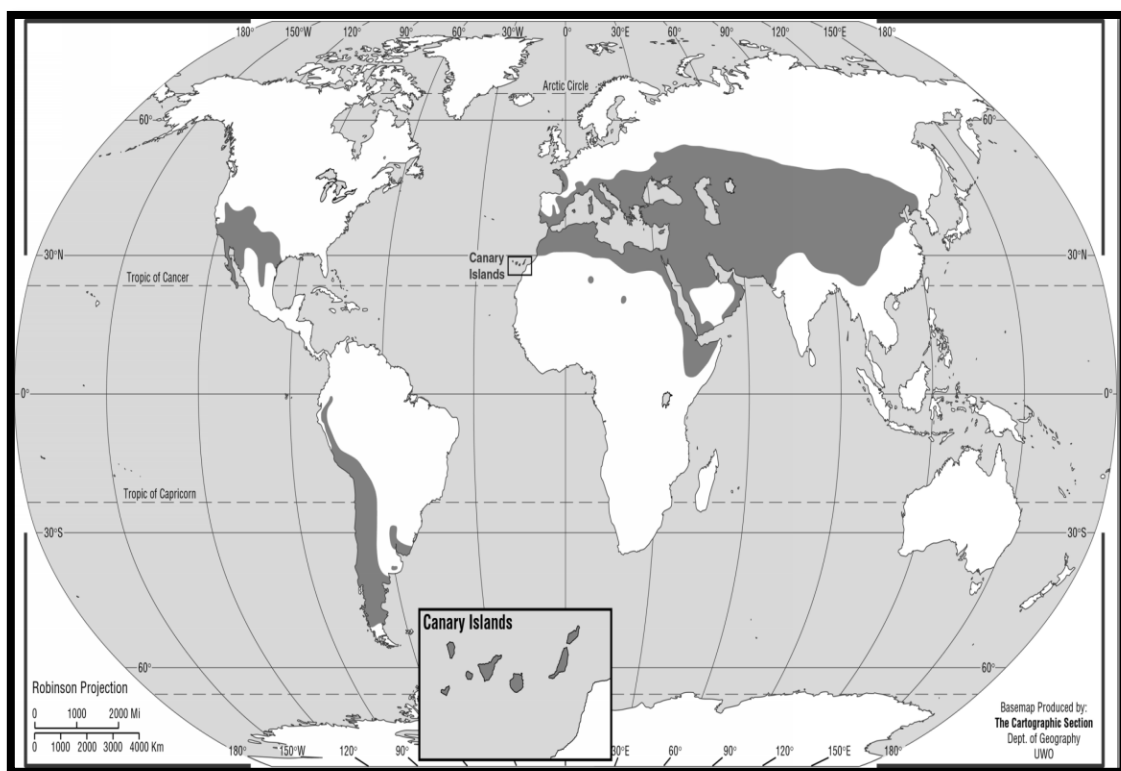


Figure I-3 : Répartition géographique de l'*Ephédra* dans le monde [26].

En Algérie, *l'éphédra* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert ^[26].

Dans notre région la wilaya de kenchela : *L'éphédra* est une plante vivace qui grandit dans les collines de montagne et terres non agricoles et sur les banques des vallées sèches dans la région de Chechar (Tabergda, Siaire, Djalal, Chehada, Khirane, Désert El mamcha, Village Nasseh et Henchir ...) ^[27].



Figure I.4 : Carte géographique représente le site de wilaya de kenchela dans l'Algérie ^[28].

I.3.2.4. Utilisation thérapeutique

En Algérie, *l'éphédra* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes.

Au Maroc, elle est utilisée pour lutter contre le diabète. Ainsi, les tiges broyées d'*Ephédra* dans du beurre, seraient ingérées par les femmes du Sahara pour avorter.

En Egypte, *éphédra* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent ^[29].

En Médecine traditionnelle chinoise ; l'éphédra est utile pour traiter les infections respiratoires, l'asthme, l'eczéma, la rhinite allergique (rhume des foins), l'œdème et la narcolepsie. La médecine *kempo* (Japon) reprend systématiquement les usages médicaux et les formules de la MTC. Quant à la médecine ayurvédique (Inde), elle reconnaît depuis longtemps l'utilité de l'éphédra pour traiter l'asthme, les spasmes, le rhume des foins et les allergies.

Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud ^[30].

I.3.2.5. Pharmacologie

L'effet pharmacologique de cet arbuste semble être attribuable à ses alcaloïdes de types éphédrine, principalement (-) éphédrine et (+) pseudo éphédrine ^[31]. L'éphédrine et la pseudo éphédrine ont également une structure similaire à celle de l'adrénaline. (Autrement connu sous le nom d'épinéphrine), une hormone / neurotransmetteur importante, et sont classés physiologiquement comme adrénérgiques (imitateurs de l'adrénaline) ou agents sympathomimétiques. Ils peuvent avoir des effets agonistes directs au niveau des récepteurs adrénérgiques (α et β) des effets indirects en provoquant la libération de noradrénaline (noradrénaline) endogène provenant de neurones sympathiques ou effets sur d'autres récepteurs inconnus. Ephédrine provoque la sérotonine centrale et libération de dopamine, ce qui pourrait contribuer à sa nature suspecte de dépendance. De nombreux effets se produisent dans le corps à la suite de l'activation des récepteurs adrénérgiques.

L'action décongestionnante du pseudo éphédrine résulte de la vasoconstriction de des vaisseaux sanguins dans les membranes nasales, causant moins de liquide à quitter les vaisseaux, moins production de mucus et inflammation moins importante des membranes nasales. Cependant, les muscles bronchiques sont relâchés, entraînant une broncho dilatation et une respiration, qui soulage l'essoufflement dans l'asthme. Fréquence respiratoire et fréquence cardiaque, en plus de la pression artérielle, sont augmentées ^[30].

I.3.2.6. Toxicologie

Les espèces de l'Ephédra ont des effets bénéfiques et néfastes. Un traitement prolongé peut provoquer une accoutumance, angoisse, tremblements et insomnie. A forte dose, l'éphédra risque des agitations fortes, tellement l'effet sera stimulant et l'intoxication peut être létale.

✓ Les signes d'intoxication :

Des vomissements, des céphalées accompagnées de sueurs et des coliques.

✓ Contre-indications :

L'insuffisance coronaire, glaucome et hypertension.

Attention aux interactions médicamenteuses avec les antidépresseurs [22].

I.3.2.7.Travaux antérieurs

I.3.2.7.1. Activités biologiques de la plante

a) Activité antimicrobienne

L'éphédra s'est révélée avoir une activité antivirale élevée contre le HSV (Herpès simplex virus). L'extrait aqueux *D'éphédra* égyptienne présente un potentiel d'inhibition significatif in vitro et in vivo contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*. Ghanem et El-Magly ont montré que l'extrait acétonitrile de *l'E.alata* de l'Egypte présente simultanément, une forte activité contre des bactéries à gram+ et à gram- ainsi que des champignons et champignons de type levure. *L'E.alata* de la région d'Ouargla testé par Kessal et Bouafia (2003) et Chebouat et al. (2014) s'est révélée avoir des activités plus ou moins importantes sur la croissance de bactéries à gram positif et à gram négatif selon la souche ciblée.

b) Effet sur la masse corporelle

Une étude réalisée par (Boozer et al., 2001) a montré qu'un mélange d'*Ephédra* et de guarana favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids. Un tel effet a été principalement attribué à une augmentation de la tonicité sympathomimétique entraînant une augmentation de la lipolyse et la glycolyse, avec la stimulation sympathique du centre de la satiété central conduisant à la suppression de l'appétit [31].

c) Action sur la pression artérielle

Les croyances chinoises prétendent que la partie aérienne et souterraine de *l'Ephédra* ont des effets opposés. Cela a été confirmé, pour l'action sur la pression artérielle, par des tests sur des animaux. Un polyphénol nommé *l'Ephedrannine A* isolé à partir des racines de la plante ainsi qu'un type mineure d'alcaloïdes dans la plante isolé de ses racines, nommé *l'Ephedradine*, présentaient un effet hypotensif. Par contre, l'éphédrine présente une action hypertensive.

d) Effet hypoglycémiant

Cinq glycanes actifs isolés de *E.distachya* : Ephedranes A, B, C, D et E ont réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des souris normales et diabétiques. Ainsi

que l'extrait alcoolique de l'*E.alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun.

e) Effet anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de *l'E.sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue. Ont rapporté que la partie aérienne des espèces d'*Ephédra* contient de *l'Ephedroxane* qui s'est révélée également posséder une activité anti-inflammatoire [32].

I.3.2.7.2.Chimie de la plante

Les constituants les plus connus de l'espèce *Ephédra* sont optiquement actifs, structurellement alcaloïdes relativement simples. Le composant principal est l'éphédrine (-) - éphédrine [(R, S 2-méthylamino-1-phénylpropane-1-ol], avec des quantités mineures de (+) - pseudo éphédrine [(S, S-2-méthylamino-1-phénylpropane-1-ol] et le nor- (déméthyle) correspondant et les dérivés N, N-diméthyle des deux composés. Stéréochimiquement, l'éphédrine (-) - a la configuration (1R, 2S) et La pseudo éphédrine (+) a la configuration (1S, 2S). Presque tous les commerciaux les applications de l'éphédra proviennent de ces alcaloïdes N-méthyles [30].

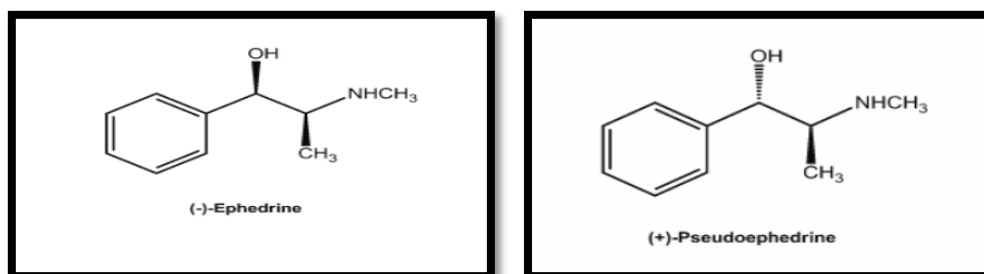
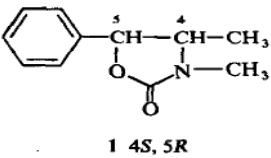
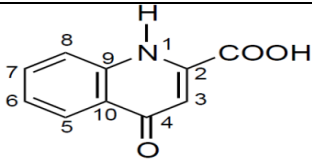
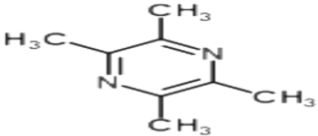
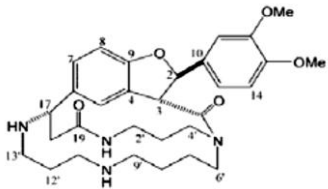
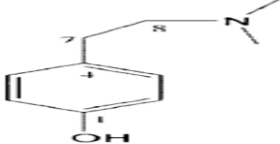


Figure I.5 : structure d'éphédrine et de La pseudo éphédrine

Plus de 50 espèces d'*éphédra* sont originaires de deux hémisphères, mais la détection des alcaloïdes de la série de *l'éphédrine* a été limitée à des espèces en Eurasie dont *l'Ephédra sinica* est la principale source, tandis que les espèces américaines telle que *E. nevadensis* connue comme le thé de désert sont considérées comme dépourvues de ces métabolites .Le tableau montre d'autres types d'alcaloïdes mineurs isolés à partir de différents espèces d'*éphédra* [31].

Tableau I.2: Principaux alcaloïdes isolés du genre *Ephédra* autres que l'éphédrine [31].

Alcaloïde	Structure chimique	Source
Ephedroxane	 <p>1 4<i>S</i>, 5<i>R</i></p>	<i>Ephédra</i>
Transtorine		<i>Ephédra transitoria</i>
Ephedralone	même structure précédente avec O-CH ₃ en C7	<i>Ephédra alata</i>
Tétraméthylpyrazine		<i>Ephédra sinica</i>
Ephedradines		<i>Ephédra aphylla</i>
Hordenine		<i>Ephédra aphylla</i>

Néanmoins, ce type d'alcaloïdes ne représente pas les seuls alcaloïdes identifiés dans la plante. Il existe d'autres types d'alcaloïdes mineurs isolés à partir de différents espèces d'*Ephédra* [33].

a) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi

dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [33].

Les flavonoïdes des espèces de *Ephédra* comprennent principalement des di-C-glycosyl flavones, flavonol-3-O-glycosides et proanthocyanidines [34].

b) Tanins

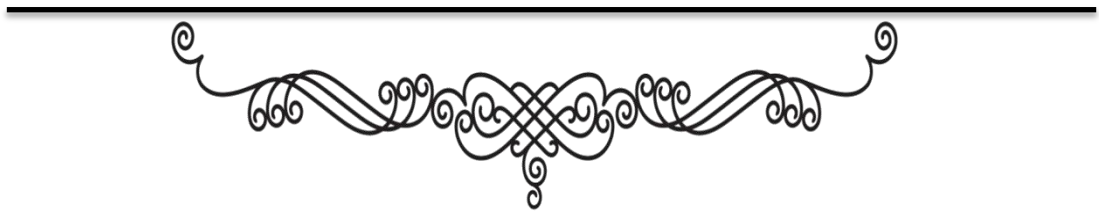
Les tanins, principalement les proanthocyanidines, se caractérisent par des réactions colorimétriques. Ce sont des produits en grande quantité dans les tiges de plusieurs espèces d'*éphédra* appartenant aux deux continents eurasiens et américains. Le goût astringent de *Ephédra* c'est grâce à ces molécules.

c) Huiles essentielles

L'huile essentielle de *E. sinica* signalés se constitue de le 2,3-dihydro-2- méthylbenzofuranne, et du tétraméthylpyrazine, l' α -terpinéol, le terpinen-4-ol, le linalool, et du le cis-p-menth-2-ène-7-ol., le p-vinylanisole, et le γ -eudesmol, et le 3-méthyl-2-butén-1 ol, le phytol, qui a été approuvé ultérieurement comme alcaloïde [34].



CHAPITRE II



Chapitre II : Activités anti oxydantes et anti inflammatoires

Sommaire

- ◆ Activité antioxydante.....
- ◆ Les radicaux libres.....
- ◆ Le stress oxydatif.....
- ◆ Les systèmes de défenses antioxydants.....
- ◆ Activité anti-inflammatoire.....
- ◆ Types d'inflammation.....
- ◆ Les médiateurs et les cellules de l'inflammation.....
- ◆ Mécanismes de l'inflammation.....



Dans ce chapitre nous définirons chaque type de radicaux libres en s'intéressant à leur formation, leur action au niveau biologique et au stress oxydant. Ensuite, nous nous intéresserons aux principaux mécanismes et les manifestations cliniques et biologiques de la réaction inflammatoire.

II.1. Activité antioxydante

II.1.1. Généralité

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde O_2 , les radicaux hydroxyles HO , peroxydes ROO et alkoxydes RO . Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines ^[35].

II.1.2. Les radicaux libres

II.1.2.1. qu'est ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule ^[36].

Les méthodes utilisées pour produire des radicaux libres sont :

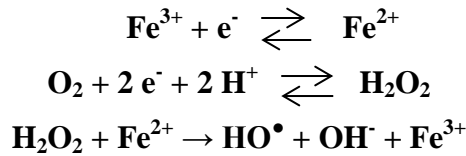
a. Méthodes physiques : Thermolyse, photolyse, radiolyse et sono chimie.

b. Méthodes chimiques : L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H. J. H. Fenton décrivit l'oxydation de l'acide tartrique par addition de fer (II). Il mit en évidence l'action catalytique du fer en 1895. C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu, Fe).



Réaction de Fenton.

c. Méthodes électrochimiques : La production du radical hydroxyle (HO^{\bullet}) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électrochimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton ^[37].



II.1.2.2. Types

- a- Les radicaux primaires :** qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires et dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote. Ils jouent un rôle particulier en physiologie.
- b- Les radicaux secondaires :** se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.
- c- D'autres espèces dérivées de l'oxygène :** dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de certains radicaux ^[38].

Tableau II.1 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ^[39].

	Nom	Symbole chimique
Formes radicalaires	Anion superoxyde	O_2^-
	Radical hydroxyle	OH^\bullet
	Oxyde nitrique	NO^\bullet
	Radicaux peroxydes	RO_2
	Peroxynitrite	ONOO^\bullet
	Radical nitrosyl	ONOOH
Formes non radicalaires	Oxygène singulet	O_2
	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2

II.1.2.3. Origine des radicaux libres

II.1.2.3.1. Sources endogènes

La première source des ERO cellulaires est la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie .Au cours de la respiration cellulaire, la mitochondrie génère de l'ATP via la réduction de l'oxygène par une série d'additions d'électrons et d'ions H^+ (membrane interne de la mitochondrie). Au cours du transport électronique, il y a production de O_2 (complexe I : NADH déshydrogénase et complexe III : Cytochrome c - coenzyme Q oxydoréductase) qui est ensuite convertit en H_2O_2 ou OH^\bullet [39].

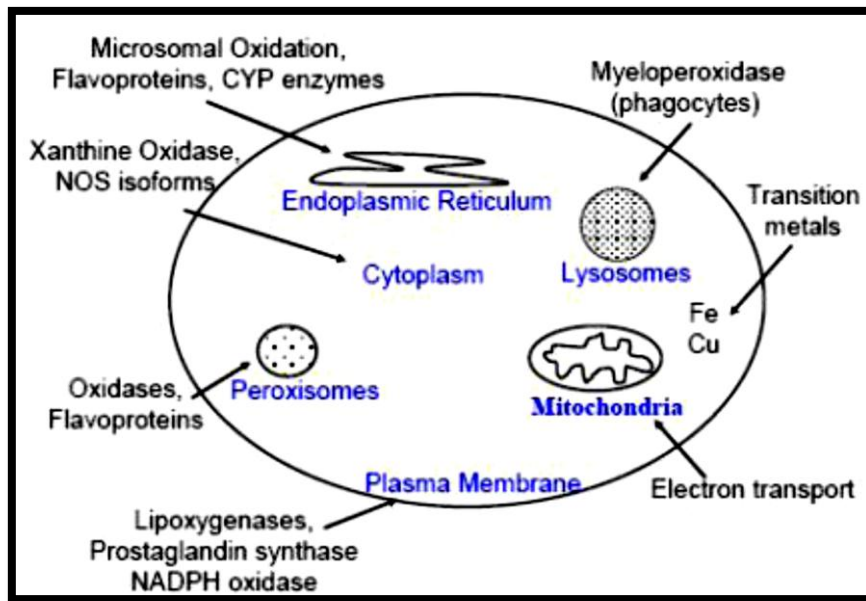


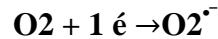
Figure II.1 : Principales sources endogènes des radicaux libres [40].

II.1.2.3.2. Sources exogènes

Plusieurs réactions biologiques impliquent l'oxydation de substrats ou l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire (O_2). Ces types de réactions sont catalysés par un groupe d'enzymes métalloprotéines appelées « oxydases », 90 % de l'oxygène consommé par les cellules des mammifères est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l' O_2 peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou réactive oxygen species (ROS) selon la terminologie anglaise.

Les ROS sont des formes variées de l'oxygène, elles incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^\bullet), et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [41].

Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$:



Radical hydroxyle OH^{\cdot} :



Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :

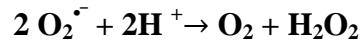


Tableau II.2 : Principales sources des RL (endogènes et exogène) ^[38].

<i>Sources endogènes</i>	<i>Sources exogènes</i>
-NADPH oxydase.	-Toxiques environnementaux.
-Chaîne respiratoire mitochondriale.	-Radiations ionisantes.
-Peroxisomes.	- Radiations UV.
-Cytochrome P450.	-Champs électriques..
-Xanthine oxydase.	-Xénobiotiques prooxydants.
-Cyclo-oxygénases.	-Tabagisme.
-Lipo-oxygénases.	-Chémothérapie.
- Phagocytes.	-Ozone
-Réactions des ions de transition.	
-Inflammation	
- Etat d'ischémie-reperfusion	
-Atherogénèse	
-Hémodialyses	
-exercices intensifs.	

II.1.3. Le stress oxydatif

II.1.3.1. Définition

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et de métabolites réactifs, que l'on appelle des oxydants ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et leur élimination par des mécanismes de protection, dénommés antioxydants est appelé stress oxydatif. La balance oxydative définit donc l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydants. En médecine la balance oxydative est un concept pour maintenir l'organisme en bonne santé. Son

déséquilibre est sujet de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs de molécules très actives ^[42].

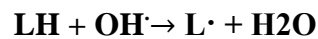
II.1.3.2. Les cibles de stress oxydant

Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le mécanisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles protéines, lipides acides nucléiques et les glucides ^[41].

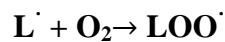
II.1.3.2.1. Peroxydation des lipides

Les premières cibles des ERO sont les lipides notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGP) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. l'oxydation des lipides génère de peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. la peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, cette réaction organisée en 3 phases successives : ^[43]

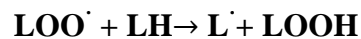
- **La phase d'initiation:** Le processus de peroxydation lipidique est initié par l'abstraction, par un radical OH[•] ou HOO[•] Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI).



- **La phase de la propagation:** Le radical lipidique (L[•]) réagit avec une molécule d'oxygène par oxydation pour former un radical peroxyde (LOO[•])

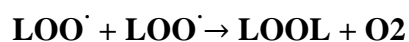


Le LOO[•] va propager la réaction en chaîne avec une molécule LH voisine pour former un nouveau L[•] et un hydroperoxyde lipidique (LOOH). De cette manière, de nombreuses molécules d'hydro peroxydes lipidiques peuvent être formées pour chaque RL initial.



- **La phase terminaison :**

Cette étape consiste en la formation de composés stables issus de l'association de 2 composés radicalaires. Leurs électrons non appariés s'associent rapidement pour former une liaison covalente stable. La réaction peut également être stoppée à l'aide d'antioxydants.



II.1.3.2.2. Oxydation des protéines

La toxicité des ERO s'exerce également sur les protéines. Ils sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, les plus sensibles à leur action sont les acides aromatiques comme la tyrosine, sur lesquels le radical OH s'additionne, modifiant la conformation de la protéine, sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques, les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire.

II.1.3.2.3. Oxydation de l'ADN

L'ADN est une molécule très sensible, elle est attaquée par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH• peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaire, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. La peroxydation lipidique génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés [44].

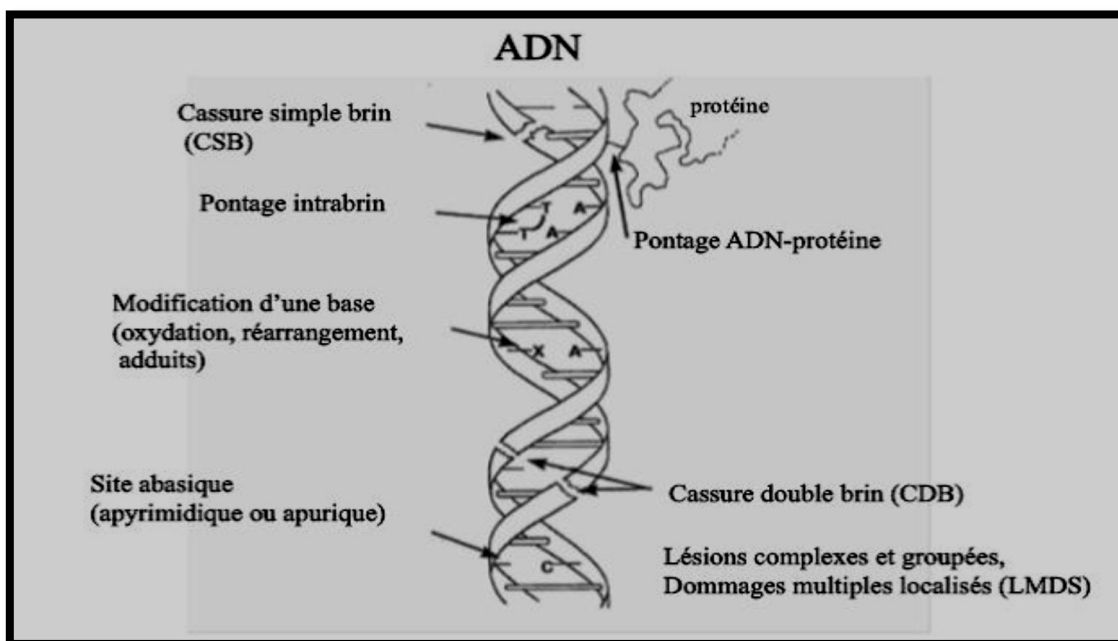


Figure II.2 : Les principaux dommages oxydatifs médiés à l'ADN par les ERO [44].

II.1.3.2.4. Les glucides

L'oxydation du glucose conduit à la formation de différents intermédiaires réactifs, dont les produits terminaux de la glycation protéique, les AGE (Advanced Glycosylation End Products) s'accumulent au niveau des protéines à durée de vie longue, entraînant notamment une perte d'élasticité tissulaire au niveau des vaisseaux sanguins et du cristallin, et pourraient ainsi participer au dysfonctionnement endothélial et aux complications vasculaires du diabète. Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les ERO attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage [45].

II.1.4. Les systèmes de défenses antioxydants

II.1.4.1. Antioxydants enzymatiques

II.1.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

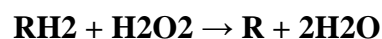
La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères. Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, une forme mitochondriale associée au manganèse et une forme extracellulaire. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres.

II.1.4.1.2. Catalase

La catalase est présente dans de nombreux tissus et particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est un tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et la protège contre l'inactivation.

Chez les mammifères, la catalase est particulièrement présente dans les peroxysomes. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ empêchant ainsi la formation de radical hydroxyl.

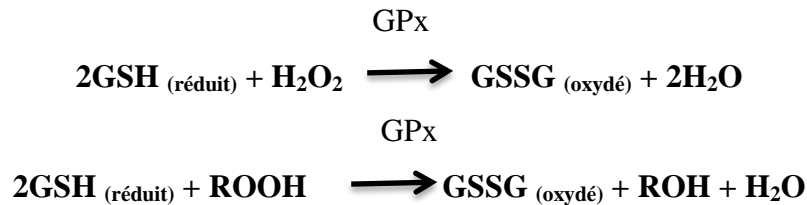
La catalase permet également de détoxifier différents substrats, tels que les phénols et les alcools par un couplage avec la réduction d'hydrogène [46] :



II.1.4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

- Les glutathion peroxydases présentes dans la plupart des tissus de mammifères, catalysent la réduction par le glutathion du peroxyde d'hydrogène et de divers hydroperoxydes lipidiques produits.

- La glutathion réductase participe de façon indirecte dans la défense antioxydante, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction ^[47].



II.1.4.2. Antioxydants non enzymatiques

II.1.4.2.1. Les antioxydants non enzymatiques endogènes

II.1.4.2.1.1. Le glutathion

Le glutathion est un tri peptide, il joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant il résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C.

II.1.4.2.1.2. Acide urique

L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines, il est issu de l'oxydation de l'hypo xanthine et de la xanthine, réaction catalysée par la xanthine oxydase et la déshydrogénase. L'acide urique est considéré comme un antioxydant car il piège l'oxygène singlet, les radicaux peroxy et hydroxyle ainsi que l'acide hypochloreux, même si son rôle comme tel n'est pas totalement clarifié. La réaction de l'acide urique avec les oxydants entraîne la formation du radical urate, qui peut être alors réduit par l'ascorbate.

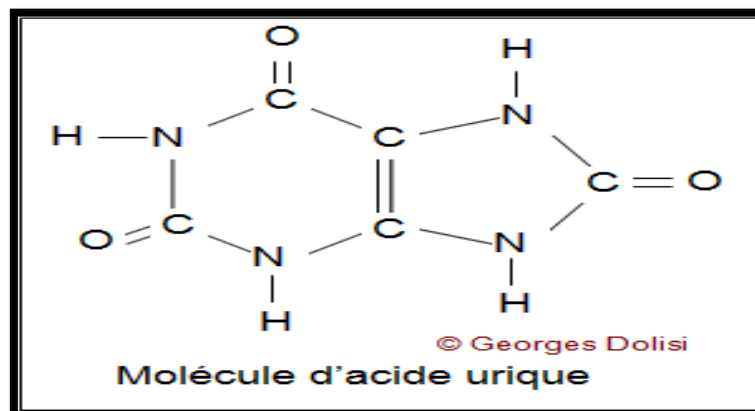
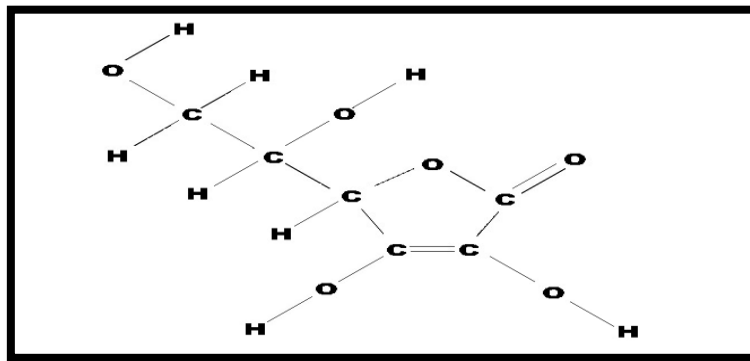


Figure II.3 : structure d'acide urique ^[48].

II.1.4.2.2. Les antioxydants non enzymatiques exogènes : végétaux

II.1.4.2.2.1. Vitamine C

L'acide L'ascorbique, ou vitamine C, est considérée comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes et de l'oxygène singlet. Elle agit en régénérant la vitamine E in vivo (**figureII.5**), mais peu in vitro. In vivo, elle est maintenue sous forme réduite par l'action de la déshydroascorbate réductase qui utilise le glutathion comme cofacteur ^[49].



FigureII.4 : structure de vitamine C ^[50].

II.1.4.2.2.2. Vitamine E

La vitamine E (α -tocophérol) elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique. Durant la réaction antioxydante, le α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxyde).

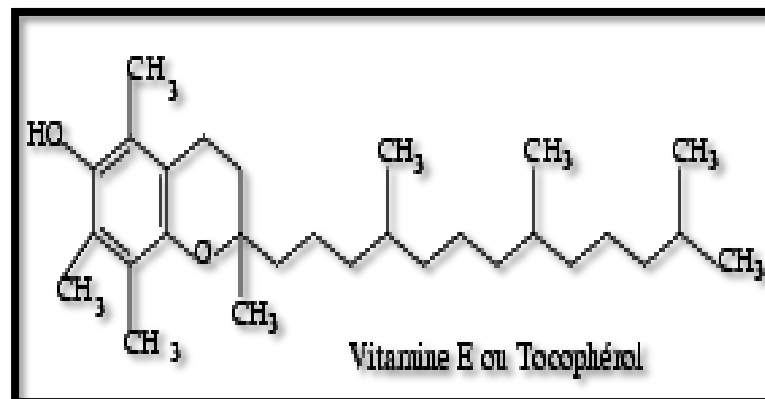


Figure II.5: Structure de vitamine E ^[51].

II.1.4.2.2.3. Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ; $C_8H_{14}O_2S_2$) :

Cet acide est aisément absorbé et converti rapidement dans de nombreux tissus à la forme réduite dithiol, l'acide dihydrolipoïque (**Figure II.6**). Il joue un rôle important dans le piégeage des ERO, la régénération des antioxydants endogènes et exogènes tels que les vitamines C et E et le glutathion, la chélation des métaux.

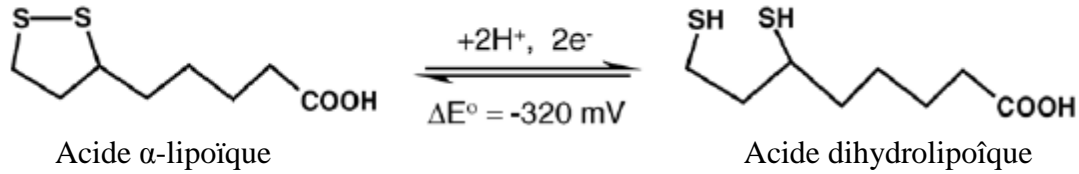


Figure II.6: Structure de l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque.

II.1.4.2.2.4. Antioxydants phénoliques

Ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes. Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions ^[52].

II.2. Activité anti-inflammatoire

II.2.1-Définition de l'inflammation

L'inflammation est un processus adaptatif coordonné induit par une infection microbienne ou par une blessure de tissu. La réaction inflammatoire est responsable de phénomènes locaux caractérisés par quatre signes cardinaux :

- Rougeur : due à la vasodilatation et l'hyperémie.
- Gonflement : occasionne par l'exsudation de liquide et de protéines plasmatiques dans les tissus, qui est due à une augmentation de la perméabilité membranaire.
- Chaleur : associée à une augmentation du débit sanguin et à une activité cellulaire accrue.
- Douleur : associée à la stimulation de neurones nocicepteurs par des médiateurs chimiques spécifiques ^[53].

II.2.2. Types d'inflammation

II.2.2.1.L'inflammation aigue

L'inflammation aiguë représente la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante ^[54]. Se constitue en trois phases :

A. Phase vasculaire (initiation)

La phase est immédiate, de l'ordre de quelque minute et caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème et un dégagement de chaleur locale. Cette phase se produit une altération des micro-capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine et dérivés du complément) et l'exsudation des cellules et du plasma vers les tissus.

B. Phase cellulaire (amplification)

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

C. Phase de résolution et la réparation (effectrice)

C'est la phase de résolution permettant la restauration du tissu lésé. En effet les conditions les plus favorables, les agents agresseurs et les débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages qui vont sécréter des médiateurs induisant ainsi la réparation tissulaire, les cellules fibroblastes et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation [55].

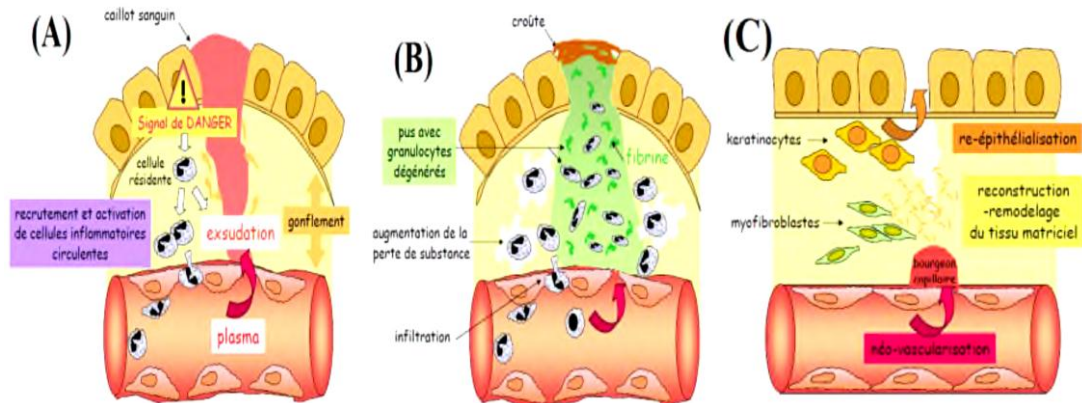


Figure II.2 : La réponse inflammatoire aiguë : (A) initiation, (B) amplification, (C) réparation [55].

II.2.2.2. Inflammation chronique

Inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (déterSION incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C) [56].

II.2.3. Anti-inflammatoires

II.2.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes sont des substances

dérivées du cholestérol, synthétisé par les glandes surrénales. Les GC agissent essentiellement sur le métabolisme glucidique et protéique chez l'individu sain et exercent une puissante activité anti-inflammatoire dans des conditions pathologiques. (Ils sont régulièrement utilisés dans les traitements anti inflammatoires). Parmi les anti inflammatoires stéroïdiens les plus puissant, les glucocorticoïdes, les corticoïdes naturels (cortisol) et les corticoïdes de synthèses (prednisone, prednisolone, la dexaméthasone ou Triamcilone) ^[57].

II.2.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques capables de s'opposer au processus inflammatoire, quelle qu'en soit la cause (mécanisme, chimique, infectieuse, immunologique), ils agissent sur les signes locaux de l'inflammation : rougeurs, chaleur, douleur et œdème. Les AINS se caractérisent par l'absence d'une structure chimique stéroïdienne, et ils sont les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques, sont parmi les médicaments le plus fréquemment prescrits dans le monde (4,5% de la consommation médicamenteuse des pays industrialisé). Et sont appartiennent à diverses catégories mais sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances comme les prostaglandines, médiateurs chimiques nécessaires au développement de l'inflammation. Ils sont surtout efficaces dans les phases aiguës de l'inflammation ^[58].

II.2.3.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de lacycloxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes ^[59].

II.2.4. Cellules de l'inflammation

Les cellules impliquées dans l'inflammation sont appelées immunocompétentes, elles proviennent d'un précurseurs commun, la cellule souche hématopoïétique pluripotente de la moelle osseuse ^[55].

Tableau II.3: Les cellules de l'inflammation ^[55].

Type	Fonction
Cellules Phagocytaires	Comprennent les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages, elles sont les premières cellules à migrer vers le foyer lésé sont capable d'éliminer les agressions par phagocytose.
Lymphocytes	Sont des cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, de type B, T ou NK. Parmi les lymphocytes T, certains sont dits auxiliaires (helper) (CD4), d'autres cytotoxiques (CD8) secrètent des cytokines, les plasmocytes (la maturation de la lignée B) secrètent les anticorps et les lymphocytes NK peuvent avoir une action cytotoxique.
Polynucléaires Basophiles	Ce sont les acteurs majeurs de la réaction allergique et de divers évènements immuns et inflammatoires, ils agissent par libération de composés vasoactifs (histamine).
Polynucléaires Eosinophiles	Sont des cellules clés de l'inflammation allergique. En effet, ils possèdent dans leurs granules de l'histaminase, une enzyme qui agit sur l'histamine et la neutralise.
Mastocytes	Les mastocytes comportent des granulations qui contiennent des médiateurs chimiques de l'inflammation, l'histamine, l'héparine et sérotonine. Elles sont capables d'envoyer des signaux au système immunitaire en présence d'une bactérie ou d'un parasite et de déclencher une réponse immédiate
Plaquettes	Ou encore appelées thrombocytes, sont de petites cellules dépourvues de noyau. Les plaquettes jouent un rôle primordial dans le processus de coagulation, Elles suppriment un saignement lors de l'apparition d'une brèche au niveau du tissu lésionnel
Fibroblastes	Ce sont les cellules qui produisent le collagène, elles jouent un rôle important dans la cicatrisation.

II.2.5. Les médiateurs de l'inflammation

II.2.5.1. Médiateurs plasmatiques

Les conséquences fonctionnelles de cette activation sont l'élimination du pathogène (par ex. par phagocytose) et/ou la réparation de la lésion.

II.2.5.1.1. Les systèmes coagulation / fibrinolyse

Les relations sont complexes entre inflammation et système de la coagulation, la présence de dépôts de fibrine intra et extra vasculaires est quasi constante dans l'inflammation.

Au cours de la coagulation, une cascade de protéolyses aboutit à la production de fibrine à partir du fibrinogène. La fibrine est un composé important de l'exsudat inflammatoire, elle limite le foyer inflammatoire et constitue une matrice sur laquelle les cellules inflammatoires peuvent se déplacer. La coagulation est en équilibre avec la fibrinolyse : la plasmine dégrade la fibrine en produisant des fragments appelés produits de dégradation de la fibrine (ou PDF). L'inflammation donc active la fibrinoformation et par voie de conséquence la fibrinolyse. La fibrinoformation/fibrinolyse contribue à amplifier l'inflammation ^[60].

II.2.5.1.2. Le système du complément

Ce sont globalement une grosse vingtaine de protéines majoritairement synthétisées par le foie qui interviennent dans les mécanismes de défense immunitaire. Dès que la réponse inflammatoire est déclenchée et que les cellules résidentes sont activées, elles vont produire un certain nombre de cytokines qui vont agir sur le foie et initier la production de ces molécules de façon plus importante. Ces molécules circulent de façon inactive dans la circulation sanguine même en condition non inflammatoire. Il fonctionne à partir de molécules de reconnaissance qui ont la capacité naturelle de reconnaître un certain nombre de déterminants antigéniques étrangers, de s'y fixer et de déclencher une cascade de réactions. Il existe 3 voies d'activation : La voie classique, la voie des lectines, La voie alterne ^[60].

II.2.5.1.3. Le système des kinines/Kallicréine

Les kinogènes précurseur inactifs des kinines, sont activé par la kallicréine, ou par le facteur Hageman et augmentent la chaleur et la douleur. La bradykinine agit sur les terminaisons nerveuses en favorisant la douleur ^[60].

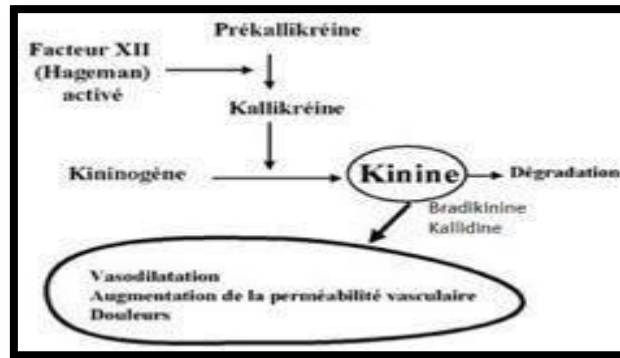


Figure II.3 : différentes voies de la formation de kinine [60].

II.2.5.2. Médiateurs cellulaires

II.2.5.2.1. Médiateurs lipidique

Lorsque qu'une cellule (phagocyte ou mastocyte) détecte un signal de danger, la phospholipase A2 est activée par le $\text{TNF}\alpha$. Cette enzyme transforme les acides gras de la membrane plasmique des cellules en leucotriènes, prostaglandines et PAF.

II.2.5.2.2. Les radicaux libres

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées.

Dans la minute qui suit le contact avec la particule étrangère, les neutrophiles induisent une augmentation de la consommation d'oxygène. Tout l'oxygène consommé est réduit par le NADPH en ion superoxyde. Dans le phagosome, les ions superoxyde sont convertis en eau oxygénée (H_2O_2) et en présence d'ion chlorure et de l'enzyme myeloperoxydase, l' H_2O_2 est transformée en acide hypochlorique. Ce dernier agit sur la membrane des bactéries en fixant le chlore, en oxydant les groupements SH et en décarboxylant les acides aminés en aldéhydes, ce qui provoque une perte de l'intégrité de la membrane bactérienne [61].

II.2.5.2.3. Amines vasoactives

L'histamine et la sérotonine sont stockées dans les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes, produisent une vasodilatation et une perméabilité vasculaire.

II.2.5.2.4. Cytokines et chimiokines

Sont des protéines sécrétées par (les lymphocytes et les monocytesmacrophages), elles permettent l'orientation de la réponse en fonction de la nature du signal détecté. Certaines cytokines sont pro-inflammatoires (IL1, IL6, $\text{TNF}\alpha$) et d'autres sont anti-inflammatoires (IL4, IL10, IL13). Les chimiokines sont des peptides apparentés aux cytokines, permettent le recrutement des monocytes et des polynucléaires pendant l'inflammation [62].

II.2.6.Mécanismes de l'inflammation

Classiquement, les mécanismes de l'inflammation peuvent être groupés selon la séquence et les manifestations cellulaires et tissulaires successives suivantes:

- vasodilatation, modification du débit sanguin et de la paroi interne des vaisseaux avec adhésivité plaquettaire et leucocytaire;
- augmentation de la perméabilité vasculaire avec exsudation plasmatique et diapédèse leucocytaire;
- recrutement, différenciation et prolifération cellulaires.
- activation de cellules spécifiques d'organe par des cytokines et libération d'enzymes protéolytiques avec destruction de la matière intercellulaire; tentative de régénération et de fibrose ^[63].



CHAPITRE III



Chapitre III : Partie expérimentale

Sommaire

- ❖ Matériels et méthodes.....
- ◆ Matériel végétale.....
- ◆ Méthode d'extraction solide /liquide.....
- ◆ L'activité antioxydant.....
- ◆ L'activité anti inflammatoire.....
- ◆ L'activité antibactérienne.....
- ❖ Résultats et discussions.....



La partie expérimentale représente l'essentiel de notre travail, consistera tout d'abord a procédé l'extraction des métabolites secondaires de plante sélectionnée, ensuite mettre en évidence ces différents composés en testant leur activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne

III.1. Matériels et méthodes

Notre travail expérimental a été effectué au laboratoire de recherche de chimie et microbiologie de faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abbés Laghrour – Khenchela, Pendant une durée de cinq semaines (avril / mai 2019).

III.1.1. Matière végétale

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des rameaux et des feuilles et la partie souterraine de l'espèce *Ephédra sinica*. La récolte s'est effectuée le 11/02/2019 au niveau de la localité Chechar.

Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures. et cela pendant 8 semaines à partir de la récolte (11/02/2019) jusqu'à broyage (9/04/2019).

Les parties aériennes de l'éphédra (feuilles, tiges) séchées, sont broyées à l'aide d'un broyeur traditionnel (Mehras) et par le mortier, jusqu'à obtenir une poudre très fine puis en passant la poudre à travers une passoire fine et mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) à l'abri de l'humidité. Pour les analyser.

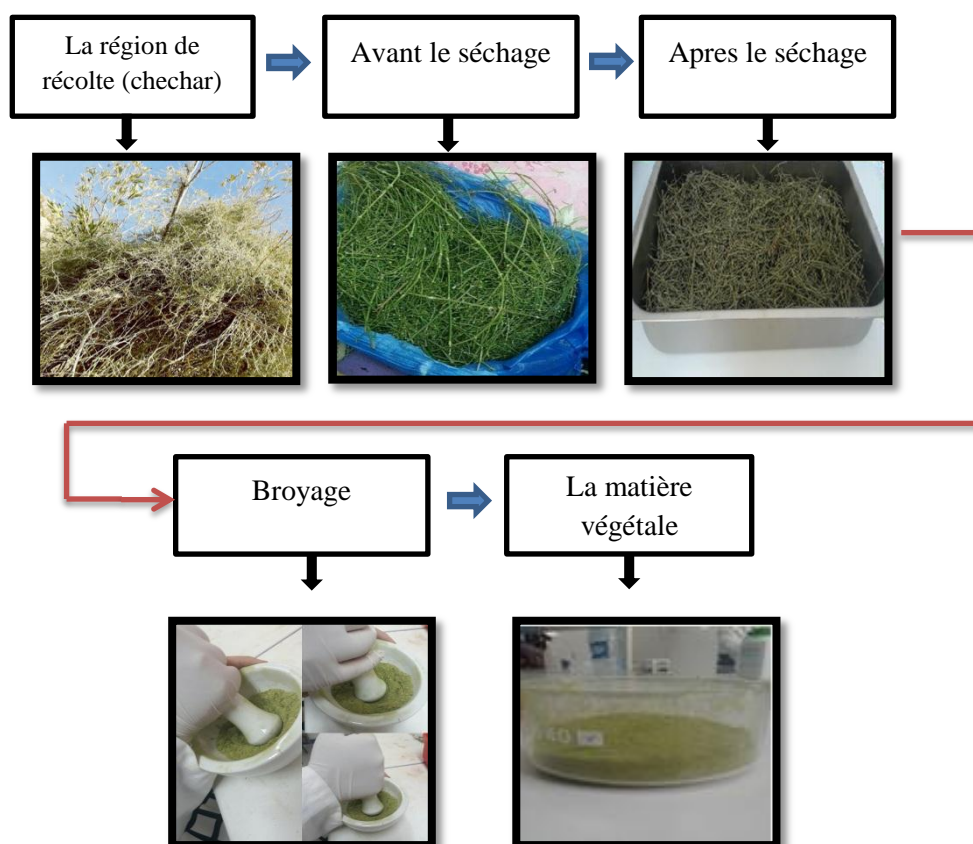


Figure.III.1: protocole de preparation de la matière végétale

III.1.1.1. Présentation du site de récolte

ville situé de chechar c'est une ville situé de l'état de kenchela dans l'est de l'Algérie , chechar est situé au sud-est de l'État de Khenchela sur la route nationale n ° 83, reliant les États de Khenchela et Biskra, plus précisément dans la région des Amazigh Auras, délimitée au nord et à l'est par la municipalité de Babar, au nord-ouest par la municipalité de Khiran, à l'ouest par la municipalité de Jalal et au sud par sahara el Namamsha. La ville d'Alger s'étend sur 550 km à 1243 mètres d'altitude, Elle s'étend sur une superficie de 923 km², considérée comme l'un des plus anciens districts de Khanshla (division administrative en 1974) et est l'une des plus importantes municipalités de Shachar, Khiran, Al Walaja et Jalal.

Coordonnées géographiques : 35° 02' 17" nord, 7° 00' 15" [64].



Figure III.2: Carte géographique représente la localisation d'obtention de plante Ephédra sinica (Chechar - kenchela).

III.1.2.Extraction solide-liquide par Macération

L'extraction solide-liquide : est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant [65].

La macération : est une méthode qui consiste à laisser la poudre de plante en contact prolongé avec un solvant [66]. Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires, généralement les solvants les plus

utilisés sont l'éthanol, méthanol ou même l'eau pour l'extraction des composés polaires et le dichlorométhane pour l'extraction des composés non polaires [67].

III.1.2.1. Matériels et produits

a) Matériels et appareillages

- Rota vapeur - Etuve - Balance
- Bécher - Erlenmeyer - Epprouvettes graduées - Cristalliseur – Entonnoir – mortier-ballon
- Pissette - Spatule - Papier filtre -barreau

b) Solvants utilisés

- Méthanol
- H₂O

III.1.2.3. Mode opératoire

96g de la matière végétale (l'éphédra sinica) est soumise à une extraction par macération dans le mélange :

- ✓ Méthanol / H₂O distillée (70% _ 30% : /V/V)

Chaque macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant:

Tableau III.1 : le volume total de chaque macération

Macération	Durée	Volume de solvant	
		Méthanol	H ₂ O distillée
1 ^{ère}	24H	350ml	150ml
2 ^{ème}	24H	200ml	85ml

Le volume total de ces macérations (350ml) est filtré 2 fois :

- Filtration par un papier filtre.
- Filtration sous vide.

L'extrait est évaporé dans un évaporateur rotatif à température appropriée 65 C° jusqu'à l'élimination totale du solvant (méthanol) pendant 5 heures

Le résidu est repris puis séché à l'Etuve à une température 46C° pendant 4h, et le résidu obtenu est conservé par réfrigérateur.

III.1.2.4. Détermination de rendement

Rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir d'une matière végétale (Bssaibis et al. 2009 ; Dinzedi, 2015). Il est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche (poudre végétale) et a été calculé selon la formule :

$$R (\%) = M_1 \times 100/M_0$$

R : Rendement de l'extrait exprimé en pourcentage (%),

M_1 : Masse de l'extrait (en g),

M_0 : Masse de poudre végétale (en g) ^[68].

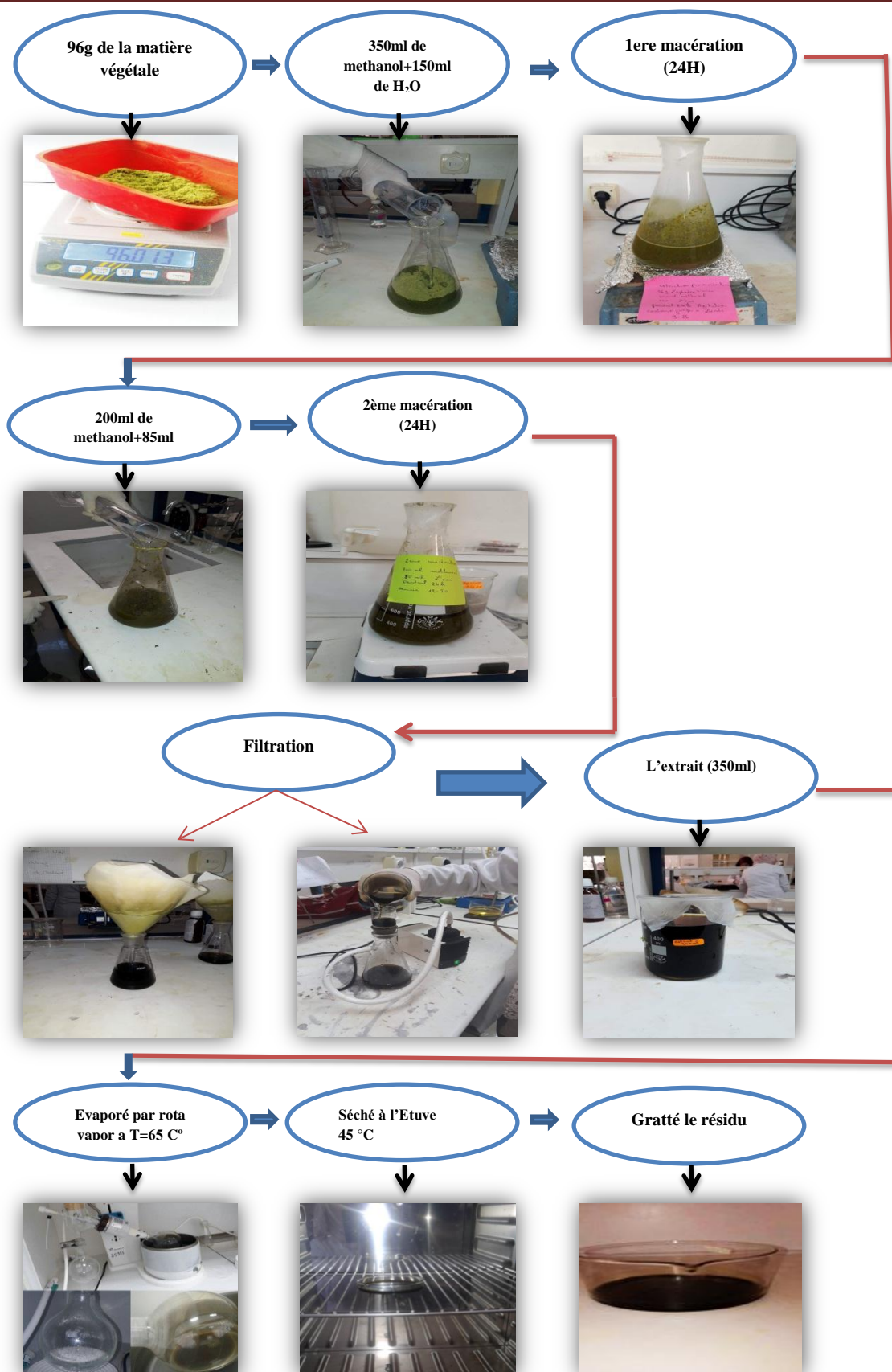


Figure III.3: Protocole d'extraction solide liquide.

III.1.3. Les activités biologiques

III.1.3.1. Première Partie : L'activité antioxydant

L'activité antioxydant est un ensemble des actions qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques et capable de réagir avec les radicaux libres et les rendent inoffensif (neutraliser et les dégrader). Il est un système de protection qui lui permet de lutter contre les radicaux libres ^[69].

III.1.3.1.1. Tests antioxydants

III.1.3.1.1.1. Test de chélation des métaux (Ferrozine)

La capacité chélatrice des extraits a été mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons, à différents concentrations, avec le fer divalent selon la méthode de Decker et Welch (1990). Les solutions d'échantillons (500 µl) ont été initialement mélangées avec 100 µl FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) ont été additionnés au milieu réactionnel, le mélange a été bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec une couleur violet (Fe (II)- Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception des extraits. L'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) a été utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de (0-40 µg/ml). L'activité des échantillons vis-à-vis du fer a été exprimée en pourcentage de chélation selon l'équation :

$$\% \text{ Chélation} = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AE : absorbance en présence de l'extrait

AC : absorbance en absence de l'extrait

La concentration effective (EC₅₀) qui chélate 50 % de Fe²⁺ a été calculée ^[70].

III.1.3.1.1.2. test du peroxyde d'hydrogène

Le potentiel de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été estimé en utilisant une méthode fluorimétrique. 500 µL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (0.01 M) a été ajoutée dans une cuve contenant 500 µL d'une solution méthanolique de lucigénine (1×10⁻⁴ M), 500 µL de solution méthanolique de peroxyde d'hydrogène (0.1 M) et 1000 µL d'une solution méthanolique contenant l'huile essentielle et les extraits à tester à diverses concentrations. Après une heure, l'intensité de fluorescence a été mesurée à 425 nm nous avons fixé la longueur d'onde d'excitation à 390 nm. L'intensité de fluorescence de la solution à blanc (I₀) est enregistrée par l'introduction de 1000 µL de méthanol à la place de la solution

de l'échantillon à tester dans la cellule de réaction. Les concentrations finales des échantillons étudiés étaient (100, 250, 500, 750 et 1000 mg. L⁻¹). L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été calculée à l'aide de l'équation :

$$\% \text{ AA} = (\text{I}_0 - \text{I} / \text{I}_0) \times 100$$

I₀ : est l'intensité de fluorescence de la solution à blanc (sans l'échantillon testé)

I_L : l'intensité de fluorescence de l'échantillon contenant l'extrait [71].

III.1.3.1.1.3. test scavenger de radical ABTS^{•+}

Le protocole de détermination de la capacité d'antioxydants à piéger le radical cationique ABTS^{•+} Adopté par Karaçelik et al, 2015 est le suivant :

La solution stock d'ABTS (ABTS à 7 mM et persulfate de potassium à 2,45 mM) est incubée à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. Cette solution stock est ensuite diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance finale de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. Les échantillons, à des différentes concentrations (10 µL) sont mélangés avec 990 µL de la solution diluée d'ABTS.

Le mélange est soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 734 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule suivante :

$$\% \text{ I} = (\text{Absctl} - \text{Abséch} / \text{Absctl}) \times 100$$

Absctl : absorbance de contrôle.

Abséch : absorbance de l'échantillon.

% I : pourcentage d'inhibition [72].

III.1.3.1.1.4. test de blanchissement du f-carotène

Dans ce test l'activité anti radicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du f3-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par KARTAL et al (2007) (KOUAMÉ et al., 2009). Brièvement 2 mg de f3 - carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés Chapitre II- Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinales avec agitation vigoureuse. 2.5 ml de la solution obtenu est mélangée avec 350µl de chaque extrait (2g/l) et du témoin BHT. L'absorbance a été immédiatement mesurée pour le BHT à 490 nm. Les autres lectures sont mesurées à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h).

L'activité antioxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante:

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$

AAR : activité antioxydante relative.

Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon après 48 heures.

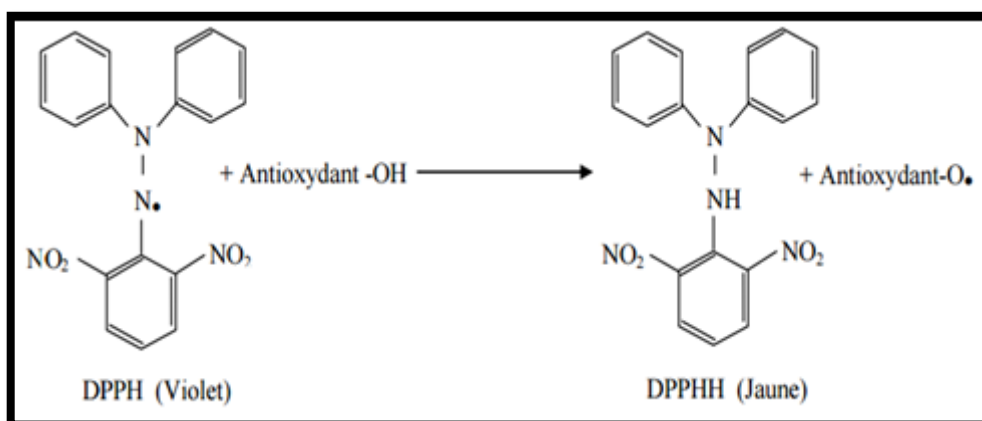
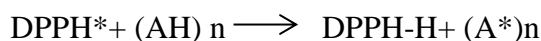
Abs BHT : absorbance du BHT après 48 heures ^[73].

III.1.3.1.1.5. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques.

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel ^[74].

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation : ^[75]



figureIII.4 :Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant^[75].

III.1.3.1.1.5.1. Matériels et produits

a) Matériels et appareillages

- Spectrophotomètre - Cuve spectre - Balance analytique
- Les tubes à essais - Les tubes à hémolyse - Micropipette - Pipette

b) Produits Chimique

- DPPH
- Méthanol

III.1.3.1.1.5.2. Mode opératoire

III.1.3.1.1.5.2.1. Préparation des dilutions

Pour l'extrait on prépare une solution mère de concentration (100 mg/ml). Des dilutions sont préparées à partir de cette solution.

Tableau III.2 : Concentrations des extraits pour le test antioxydant avec DPPH.

Volume	Concentration (mg/ml).		
	Solution mère	Les dilutions	Méthanol
V ₁	100	C ₁	0.0975
V ₂		C ₂	0.195
V ₃		C ₃	0.39
V ₄		C ₄	0.78
V ₅		C ₅	1.56
V ₆		C ₆	3.125
V ₇		C ₇	6.25
V ₈		C ₈	12.5
V ₉		C ₉	25
V ₁₀		C ₁₀	50

III.1.3.1.1.5.2.2. Préparation des solutions de DPPH

3 Mg de DPPH est solubilisés dans 100 ml de solvant, la solution est placée à l'obscurité.

III.1.3.1.1.5.2.3. Préparation et lecture des échantillons

Pour chaque dilution on prépare 3 tubes à hémolyse qui constituent les trois répétitions, à chaque tube on met 50 µl de l'extrait (méthanol) à différentes concentrations sont ajoutés à 950 µl de chaque solution du DPPH.

Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50µl de solvant (méthanol) avec 950 µl de chaque solution de DPPH.

Après agitation par un vortex les tubes sont placés à l'obscurité à température de chambre pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

III.1.3.1.1.5.2.4. Expression des résultats

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou par l'inhibition des radicaux libres en pourcentage (RSA %) en utilisant la formule suivante:

$$\text{RSA}(\%) = \{(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}\} \times 100$$

RSA % : pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

Abs échantillon : absorbance de l'échantillon.

Abs contrôle : absorbance du contrôle négatif [76,77].



Figure III.5: Protocole de l'activité antioxydant d'extrait l'*éphédra sinica*.

III.1.3.2. Deuxième Partie : L'activité anti inflammatoire

III.1.3.2.1. Matériels et produits

b) Matériels et appareillages

- Spectrophotomètre - Cuve spectre - Balance analytique - BAIN-MARIE
- Les tubes à essais - Micropipette - Pipette –thermomètre

c) Produits Chimique

- Sérum bovine albumine(BSA) 5%
- Eau distille
- Diclofenac sodium
- Acide citrique (annexe 02)
- Na_2HPO_4 (annexe 02)

II.1.3.2.2.Mode opératoire

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

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

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

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

-Solubiliser 0.5 g BSA dans 5 ml eau.

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

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

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

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

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

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

✓ La solution standard test (0,5 ml)= 0,45 ml de a + 0,05 ml de c

c-diclofenac sodium 0.25 mg dans un ml eau.

✓ Préparer la solution phosphate buffer saline :

- Solution D : 1.9 g acide citrique / 100 ml de H_2O .

- Solution F: 2.8 g de Na₂HPO₄ /100 ml de H₂O.
- Pour 100 ml de solution pH=6.2, on mélange 16.9 ml de D et 33.1 ml de F puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

✚ Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,2), les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline (Ph=6,2) a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV -visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

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

OD: la densité optique.

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le diclofenac sodium (250ug/ml) ^[59].

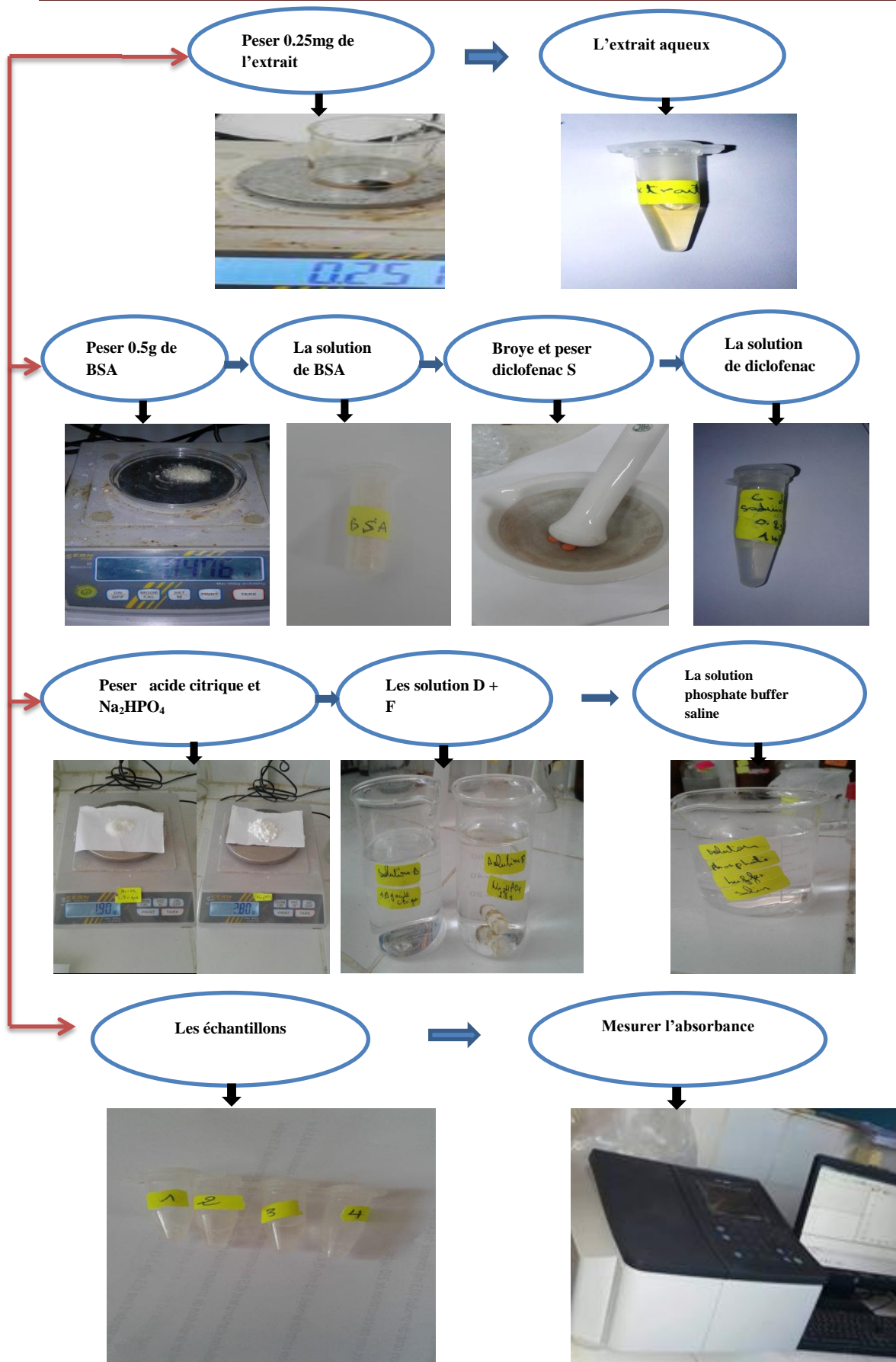


Figure III.6: Protocole de l'activité anti-inflammatoire d'extrait l'*éphédra sinica*.

III.1.3.3. Troisième partie : L'activité antibactérienne

III.1.3.3.1. Les souches testées

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

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

Tableau III.3: Les souches bactériennes utilisées.

a. *Staphylococcus aureus* (SARM)

Le *Staphylococcus aureus* (ou staphylocoque doré) est une bactérie que l'on peut trouver normalement sur la peau et les muqueuses. Certains *Staphylococcus aureus* produisent des toxines et peuvent être responsables de divers syndromes, par exemple des intoxications alimentaires.

Le SARM est un *Staphylococcus aureus* résistant aux pénicillines semi-synthétiques, dont la méthicilline. Apparue dans les années 1960, le SARM était au début principalement acquis en milieu hospitalier (SARM-H ou SARM nosocomial). Par la suite, des cas d'infections causées par des SARM-AC ont été décrits [78].

b. *Escherichia coli*

Escherichia coli, aussi mentionné comme *E. coli*, est un type de coliforme fécal les bactéries qui sont trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud en santé. La plupart d'*E. Coli* est inoffensif et sert une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance d'espèce de bactéries nuisible et en faisant des vitamines nécessaires. Cependant, quelques tensions peuvent être des pathogènes opportuniste, tandis que d'autres peuvent causer la maladie gastro-intestinale dans des gens sains quand ingéré [79].

c. *Listeria monocytogenes*

Listeria est un petit bacille à Gram positif [80]. Les *Listeria* sont de petits bacilles à Gram positif, anaérobie facultatif, non sporulé, catalase positive et oxydase positive. Ces bactéries possèdent des flagelles qui sont péritriches et qui permettent la mobilité à des températures entre 20 et 30°C. Ils sont cependant non mobiles à des températures au-dessus de 37°C. Sous microscope, ce microorganisme peut être retrouvé sous la forme d'un bâtonnet et

peut parfois être arrangé en courtes chaînettes ou en forme de V ou de Y ^[81].

d.Pseudomonas aeruginosa

Est une bactérie en forme de bâtonnets droits ou courbés, à Gram négatif ^[82]. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie retrouvée fréquemment dans les eaux superficielles et les eaux résiduaires urbaines. Son origine peut être humaine et éventuellement fécale (le portage fécale est cependant rare) ^[83].

III.1.3.3.2. Matériels et produits

a) Matériels et appareillages

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

b) Produits Chimiques

- Miller Hinton
- Agar
- L'eau physiologie

III.1.3.3.3. Mode opératoire

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait

III.1.3.3.3.1.Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit Dissoudre 21 g de Muller-Hinton et 17 g de l'agar dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 60 minutes à 121°C.

III.3.3.3.3.2. Stérilisation du matériel

a) Four pasteur

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

b) L'autoclave

Le milieu de culture, les tubes à essai remplis d'eau physiologique (Chlorure de sodium 9g dans un 1000 ml d'eau distillée),utilisés dans la préparation des solutions bactériennes, les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) et les embouts jaune enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 60 minutes.

III.1.3.3.3.1. l'antibiogramme

III.1.3.3.3.1.1. Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactérienne à tester ont été repiquées par la méthode des stries dans des boites de pétri contenant de la glose nutritive, puis incubées pendant 24 heures à 37 C° afin d'obtenir des colonies isolées

III.1.3.3.3.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler Par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne, Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ^[84].

III.1.3.3.3.3. Préparation les boites de pétri

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

III.1.3.3.3.4. Ensemencement

- ✓ La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzène.
- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- ✓ L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas.
- ✓ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose ^[85].

III.1.3.3.3.4. Préparation des dilutions de l'extrait

Une série de dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de l'extrait méthanolique (Me-OH) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée à partir d'une solution mère 200mg d'E-MOH préalablement dissouts dans un ml DMSO ^[86].

III.1.3.3.3.5. Dépôt des disques

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

- Des disques de papier filtre de 6,0 mm de diamètre (Wattman n° 1) sont imprégnés individuellement avec 15 µL d'extrait à différentes concentrations ;

- A l'aide d'une pince stérile on applique les disques à la surface des milieux déjà ensemencés ;
- Un disque de l'antibiotique (Gentamicine 30µl) est placé dans la boîte de Pétri comme contrôle positif ;
- Un disque imprégné de 5 µl de DMSO est utilisé comme témoin négatif ;
- Chaque test est réalisé en trois répétitions ;
- Les boites sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.
- Chaque teste est réalisé en deux répétition ^[86].

III.1.3.3.3.6.Incubation et Lecture

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

Cette sensibilité est classée comme suit :

- Non sensible pour un diamètre inférieur à 8 mm ;
- Sensible pour un diamètre de 9-14 mm ;
- Très sensible pour un diamètre de 15-19 mm ;
- Extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20 mm ^[87].

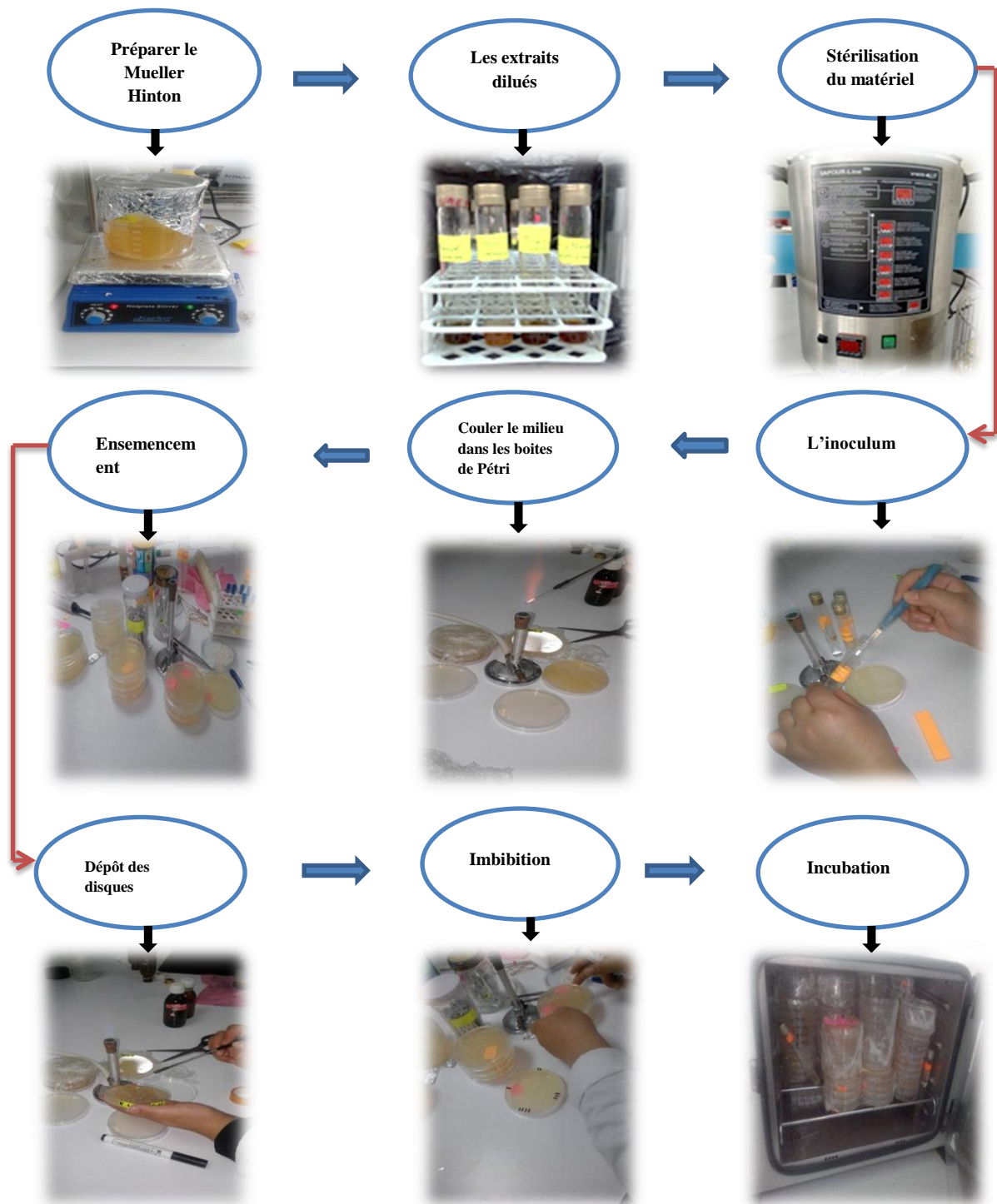


Figure III.7: Protocole de l'activité antibactérienne de l'*éphédra sinica*



III.2.Résultats et discussion

III.2.1.Evaluation du potentiel anti-radicalaire

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH $^\bullet$ est recommandé pour des composés contenant SH, NH et OH groupes. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits très riches en composés phénoliques.

Ce qui nous concerne, nous avons suivi la méthode utilisant le radical libre DPPH $^\bullet$ (diphényl-picrylhydrazyle).

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH $^\bullet$ à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH $^\bullet$ et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction.

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t :

$$\%RSA = (\text{Abs contrôle} - \text{Abst}) / \text{Abs contrôle} \times 100\%.$$

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou

le TroloxR (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

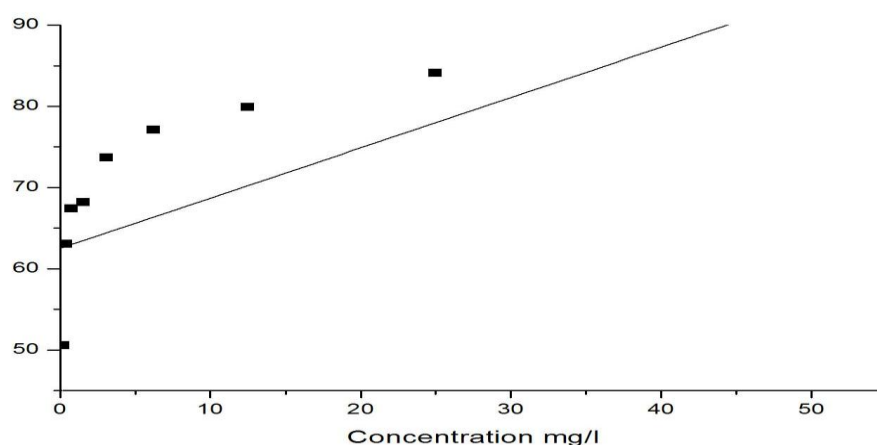


Figure III.8: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait.

Selon les résultats trouvés, l'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, leur EC50 est de 0.191 mg/ml ce qui est largement supérieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,13879 mg/ml.

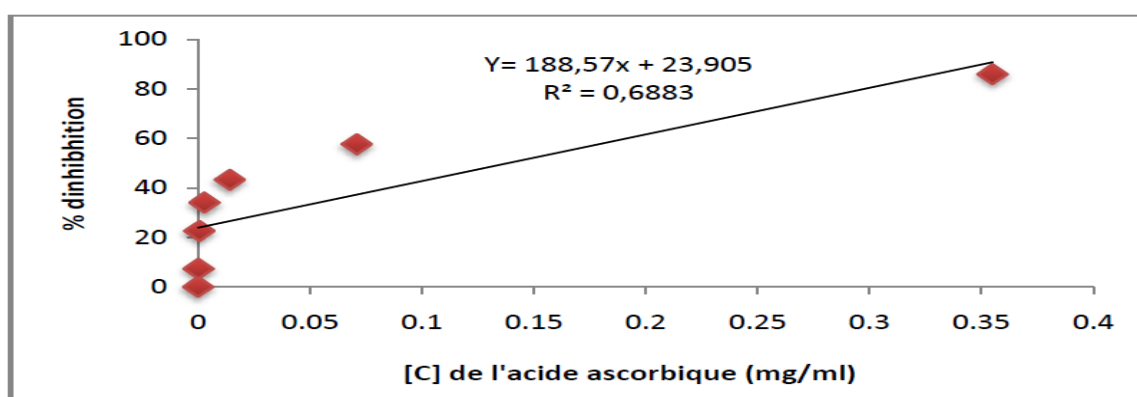


Figure III.9: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Ces résultats montrent que notre extrait possède une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, la tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène. Les polyphénols contenus dans les extraits de *l'éphédra sinica* sont probablement responsables de l'activité antioxydante. Ceci est en accord avec les travaux

menés sur les extraits *l'éphédra sinica* qui ont mis en évidence une forte activité antioxydante de l'extrait alcoolique. Les mêmes études montrent que *l'éphédra sinica*, est une espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante, anticancéreuse et antimicrobienne.

III.2.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. L'activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait méthanolique de *l'éphédra sinica* consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de Bovine sérum albumine (BSA).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(OD \text{ de test solution} - OD \text{ de test control}) / OD \text{ de test control}] * 100$$

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

Tableau III.4: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA

Solution	Absorbance	% Inhibition
solution d'essai	0.186	-
solution control test	0.127	-
Extrait (solution control produit)	0.217	73%
Diclofenac sodium (solution standard test)	0.153	97.4%

Les résultats montrent que tous l'extrait testé à 250 µg/ml inhibent la dénaturation du BSA avec un taux de 73%. Par rapport à un anti inflammatoire de référence (Diclofenac) qui montre avec une valeur de 97.4% à la même concentration. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans les l'extrait trouvés lors des criblages phytochimiques.

III.2.3. Evaluation L'activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de l'extrait isolé de *l'éphédra sinica* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton.

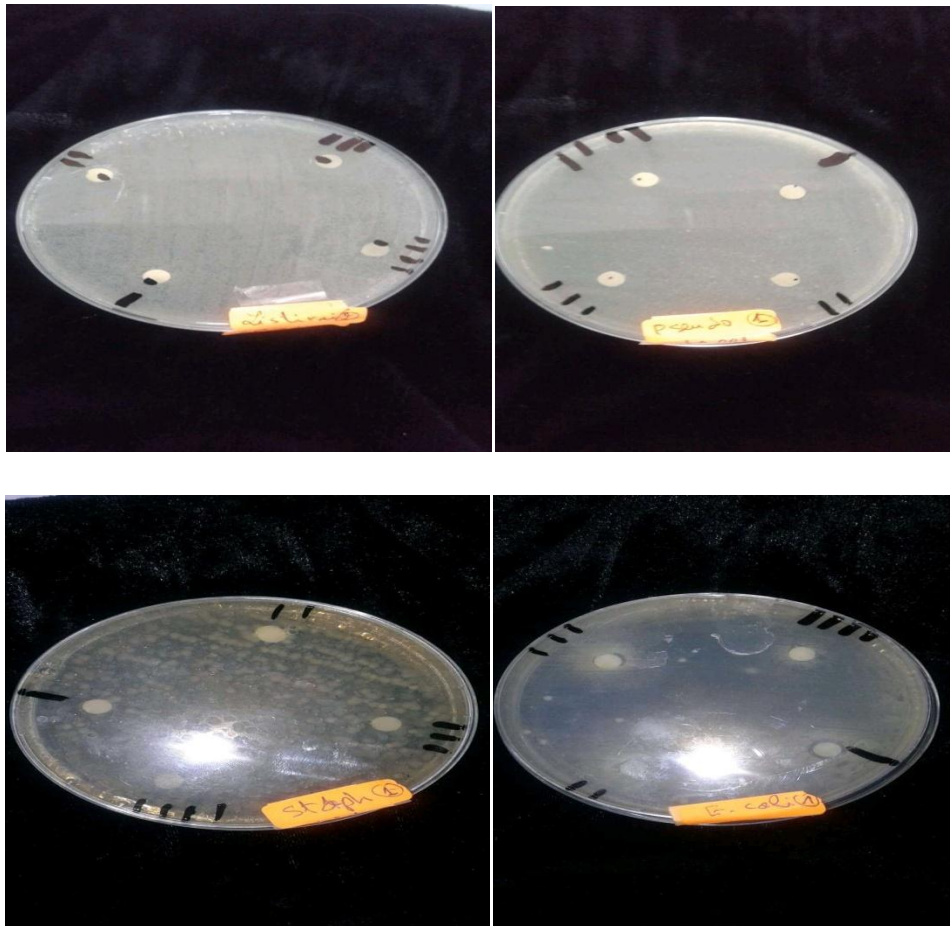


Figure III.10 : Zones d'inhibitions des souches : Pseudomonas _ Staphylococcus _ E. coli _
Listeria monocytogenes

L'activité antimicrobienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de quatre (04) bactéries. Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III.5: Zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur milieu MH (mm).

	Témoin Positif	Témoin Négatif	Extrait de <i>l'éphédra sinica</i>
<i>Staphylococcus</i>	7	-	-
<i>Listeria</i>	8	-	-
<i>Pseudomonas</i>	18	-	8
E. coli	14	-	10

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement aux témoins de contrôle, il y a une grande hétérogénéité dans les résultats. Les meilleures zones d'inhibition de l'extrait méthanolique sont de zone d'inhibition de l'extrait méthanolique de *ephedra sinica* sur la croissance de *Escherichia coli* (10mm) et de *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm) en comparaison avec l'antibiotique standard utilisé qui est la gentamicine .

En outre , *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* montrant une résistance contre l'extait méthanolique.



Conclusion générale



Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs années. Ils sont toujours des sources essentielles de médicaments et ce sont la source de la majorité des antioxydants naturels et leur utilisation dans le traitement des différentes infections est connue de longue date. Et jusqu' nos jours elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale.et l'industrie pharmaceutique. Cette efficacité est due à des métabolites secondaires ou ses principes actifs comme : les composes phénoliques, les alcaloïdes, et les huiles essentielles... Notre pays est riche de ce type des plantes qui sont utilisées souvent en médecine traditionnelle.

Ce travail a porté sur la détermination des activités antioxydant anti inflammatoire, antibactérienne de la plante médicinale *Ephédra sinica*.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, elle a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.et d'après les résultats : l'extrait méthanolique présent qu'un grand pourcentage de l'inhibition de la dénaturation de protéines.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Ephédra sinica*, selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante modérée.

Sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

L'extrait de la plante *Ephédra sinica* a des propriétés antibactérienne, anti-inflammatoire et surtout antioxydante ; ce qui justifient son usage traditionnel. Ces propriétés sont probablement liées à la présence de polyphénols, flavonoïdes et de saponosides mis en évidence par l'étude phytochimique.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, en étudiant les mécanismes d'action sur les médiateurs inflammatoires, les enzymes impliquées dans la production des ROS et sur les systèmes antioxydants in vivo.



Références bibliographique



- [1] **J.R.S.Tabuti** et al., (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. J. Ethnopharmacology ; p : 19-44.
- [2] **S. Chaouki**(2012). Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M, doctorat en sciences physiques, université abou bekr Belkaid Tlemcen.
- [3] **D.mustapha mahmoud**(2015). étude écologique, phytochimique et valorisation des plantes médicinales des monts tessala (W.de sidi bel-Abbes NW) : cas de *daphne gnidium* l, doctorat 3eme cycle, université Djilali laibes de sidi bel-Abbes.
- [4] **Z.Mohammedi**(2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Doctorat en Biologie, Université abou bekr Belkaid- Tlemcen.
- [5] **S.Jorite**. La phytothérapie, une discipline entre passé et futur, de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel.
- [6] **Z.bouziane** (2017). Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région d'azail (Tlemcen –Algérie), master en écologie, Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen.
- [7] **H.belbache**. Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *centaurea parviflora* des f, magister en sciences en chimie organique option phytochimie, université mentouri constantine.
- [8] **A. Ben zaini et Y. Ismail**, (plantes médicinales en Algérie), [http\\Site Google.com](http://Site Google.com) ; consulté 2001.
- [9] **S.adouane** (2016). étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région méridionale des aurès. (Magistère en sciences agronomiques, université mohamed khider – biskra) ; p : 17.
- [10] **R. Zeguerrou** et al., (2010). « Recueil des plantes médicinales dans la région des Ziban ».
- [11] **H. Ilbert** et al., (2016). « Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie », centre international de hautes études agronomiques méditerranéennes.
- [12] **A.BELKHIRI et T.DEROUICHE** (2011). Médicaments à base de plantes Médicinales traditionnelles : nécessite d'une Règlementation adaptée concernant leur

mise sur le Marche en Algérie, Laboratoire de Pharmacognosie, Dépt. De Pharmacie Faculté de Médecine (UMC), universitaire Ben Badis, Constantine.

[13] **M.Mendaci**, (Plantes aromatiques et médicinales), <http://www.elmoudjahid.com/fr>, Consulté le 17 oct. 2016.

[14] **A. Bouzabata(2017)**. Herbal drugs in Alegria: régulation and registration *phytothérapie*, les médicaments à base de plantes en Algérie : réglementation et enregistrement.

[15] **S. Hadjadj (2017)**. Doctorat analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du sahara septentrional est algérien, université kasdi merbah- Ouargla.

[16] **I. Messai(2011)**. Doctorat Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est algérien (*artemisia herba alba*), université mentouri constantine.

[17] **W.Charles (2009)**. Trease and Evans ' pharmacognosy, Elsevier health sciences.

[18] **R.pereira limberger et al., (2013)**. Pharmacological effects of ephedrine, (pages 1217-1237).

[19] **ozenda(1991)**. Flore et végétation du sahara. Centre national de la recherche scientifique, paris (3éme ed.) ; p : 662.

[20] **Abourashed E.A et al., (2003)**.*Ephedra* in perspective—a current review. *Phytother. Res.*, Vol. 17, PP. 703-712

[21] **D. roux**. Les nouvelles plantes qui soignent ; p : 67.

[22] **S.aouadhi (2010)**. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. A%otude de 57 plantes recommandées par les herboristes, master spécialisé en toxicologie, faculté de médecine de Tunis.

[23] **G.Vincent, ephédra sinica**, { <https://www.le-jardin-ethnobotanique.fr> } .

[24] **R.limberger et al., (2013)**. Pharmacological effects of ephedrine. In natural products), Springer berlin Heidelberg; p: 1217-1237.

[25] **g. A. E. M.hegazi et t. M el-lamey (2011)**. In vitro production of some phenolic compounds from ephedra alata decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 1(8), 158-163.

[26] **S.boulberhane et H.nabti (2018)**.étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des deux plantes : *artemisia compestris l*. Et *ephédra alata alenda staph*, master sciences biologiques université des frères mentouri constantine ; p : 11.

- [27] **R.hakkar et D.dekhlil (2017)**. Etude phytochimique et activités biologique de l'éphédra sinica une plante médicinale de l'est d'Algérie, (mastère GPe, université de khenchela) ; p : 15
- [28] **zidani, et sedouga (2016)**. Contribution à l'inventaire des orthoptères (orthoptera, insecta) dans la région des aurès (Batna et khenchela) et l'étude de l'espèce ephippiger terrestris (yersin, 1854) (tettigonidae, ensifera)). (Master biologie évolution et contrôle des populations d'insectes, université des frères Mentouri Constantine).
- [29] **F.Benkezzim et L.derradji (2017)**. Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques des extraits aqueux, méthanolique et alcaloïdique de deux plantes médicinales daphne gnidium (l.) Et éphédra alata alanda.(master 2 en biochimie appliquée , université m'hamed bougara de boumerdes) ; p :6-8.
- [30] **J. David Adams (jr.), Eric j. Lien**, traditional Chinese medicine: scientific basis for its use publié. P.82.83.84.
- [31] **Z.kebili (2016)**. Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de éphédra alata de la région de Ouargla, magister en biochimie et analyse des bioproduits université kasdi merbah - Ouargla ; p : 4-8.
- [32] **A. yahaoui et L. silat(2017)**. Contribution à l'étude des extraits de l'espèce Ephédra alata alanda de la région de sigus, master en biologie, université larbi ben mhidi oum el bouaghi ; p : 6-7.
- [33] **R.sahli(2017)**. Etude phytochimique de quelques plantes extremophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques, thèse de doctorat en génie biologique, université Lille 2 bordj cédria ; p : 14.
- [34] **A.atatra et L. bouhdiche (2018)**. Etude phytochimique et évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale : éphédra alata alanda, Master immunologie appliquée, université 8 mai 1945 Guelma ; p : 8.
- [35] **M.François Nsemi (2010)**. Identification de polyphénols, Evaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, thèse doctorat Chimie organique, l'Université Paul Verlaine-Metz ; P : 79.
- [36] **N. BELKHEIRI(2010)**.dérives phénoliques a activités Antiathérogènes, thèse doctorat en Chimie-Biologie-Santé, l'Université Toulouse III ; p : 7.

- [37] **B. BOUGUERNE (2012)**. Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose), thèse doctorat chimie biologie santé, université de Toulouse ; P : 7-8.
- [38] **A. BOUMAZA (2009)**. Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation, Magister en Biologie cellulaire et moléculaire, Université Mentouri-Constantine ; p : 16-11.
- [39] **C. HATON (2005)**. effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale, thèse de doctorat en physiologie et physiopathologie, université paris VI ; p : 43-44.
- [40] **D. Mercan Unilabs (2010)**, Le Stress Oxydatif A.R.L., Lausanne.
- [41] **GRAIT Souâd (2014)**. Etude du pouvoir antioxydant d'une plante médicinale (*Urginea maritima* L), master Génie des Procédés Pharmaceutiques Université Ferhat ABBAS, Sétif 1 ; p : 19.
- [42] **B. Bagora (2014)**. Etude des propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes, thèse doctorat Physiologie et génétique moléculaire, université blaise pascal ; p : 26.
- [43] **F. KHALDI (2015)**. évaluation de l'activité antioxydant et anti inflammatoire des plantes médicinales algériennes *Thymus vulgaris*, *Matricaria recutita* *Anethum graveolens*, master biologie cellulaire et physiopathologie, Université frères Mentouri Constantine ; p : 51.
- [44] **I. Taïba et al., (2017)**. Evaluation de l'activité anti inflammatoire, analgésique, antioxydante et antipyrétique de la plante médicinale Algérienne *Salvia Officinalis*.L, master Toxicologie ,Université des Frères Mentouri Constantine ; p: 18-19.
- [45] **F. SAFI et S. BOUABID**. Evaluation de l'activité biologique de l'extrait éthyle acétate du thé vert et l'extrait butanolique de la plante *Chrysanthemum sp* vis à vis la toxicité induite par la streptozotocine, master Toxicologie et santé , Université Mentouri Constantine 1 ; p : 16.

- [46] **A.FERRADJI (2011)**. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacia lentiscus, master Biochimie appliquée, université Ferhat Abbas –setif ; p : 15
- [47] **M.Moulay Ahmed El-hadi (2011)**. Statut oxydant / antioxydant chez les agriculteurs consommateurs de pesticides dans la région de Tlemcen, master physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition, université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen ; p : 26.
- [48] **S.Sylvain(2013)**. L'acide urique : une molécule physiologique pouvant être pathologique, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de limoges ; p : 13.
- [49] **Adoui et al., (2016)**, Effet du stress oxydant dans l'apparition de quelques complications du diabète mellitus, master Toxicologie et santé Université des Frères Mentouri Constantine ; p : 32-33.
- [50] **E.Schwartz(2016)**, LA VITAMINE C, DESS DE COSMETOLOGIE université du quebec à chicoutimi ; p : 8.
- [51] **P. KAMOUN**, ASCORBIQUE ACIDE ou VITAMINE C, Encyclopædia Universalis, {<http://www.universalis.fr/encyclopedie/ascorbique-vitamine-c>}, consulté le 18 juin 2019.
- [52] **N.BELYAGOUBI Née BENHAMMOU(2011)**, Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, thèse doctorat en biologie, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen ; p : 37-38.
- [53] **H.REHRAH(2015)**. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de quelques plantes médicinales, master Biochimie Appliquée, université A. MIRA – Bejaia.
- [54] **Collège Français des Pathologistes (CoPath) (2012)**. La réaction inflammatoire. Les inflammations ; p : 12.
- [55] **K.AITEUR et H.AMRANI(2017)**. Activité antioxydante et anti inflammatoire de la nigelle, master Biochimie appliquée, Université A. MIRA – Bejaia ; p : 14-15.
- [56] **MC Rousselet, et al.,(2005)**. Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3) ; p : 3.

- [57] **A. DOUAOUI**. cours pharmacologie (Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), Faculté de médecine de Constantine ; P : 2-6.
- [58] **Monassier(2005)**. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale ; P : 2-17.
- [59] **A.Haioun et F.Hamoudi(2015)**. Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice , master Toxicologie et Santé, Université des Frères Mentouri Constantine ; P : 36
- [60] **J.J. Hoarau (2017)**. La réponse inflammatoire et ses marqueurs, Ronéistes : CROSNIER Candice / NICOLAÏ Lisa ; p : 2-4.
- [61] **J.-M. Cavaillon**, Médiateurs de l'inflammation ; p : 30-31-32
- [62] **B. Combadière et al., (2007)**. Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire, Faculté de Médecine, Université Pierre-et-Marie Curie, 75634 Paris Cedex 13, France ; p : 173-179
- [63] **L.Marius(1999)**. activité anti-inflammatoire des extraits d'écorces de tronc de khaya senegalensis a. juss (meliaceae). mise au point d'une forme galénique topique (phase 1), thèse doctorat sciences biologiques appliquées , université de ouagadougou ; p : 33-36
- [64] (chechar), <https://fr.wikipedia.org>, consulté le 28 mars 2018
- [65] **F.CHEMAT (2011)**. Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs, Technique et Ingénierie, Ed Dunod.
- [66] **L.LAGNIKA(2005)**. Etude phytochimique et activité biologique de substances Naturelles isolées de plantes béninoises (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- [67] **N.RISPAIL et al., (2005)**. Secondary metabolite profiling. Lotus japonicus Herd-book ; p:341-348.
- [68] **Okou et al., (2018)**. valuation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de Solanum torvum Swartz (Solanaceae) sur la croissance in vitro de 3 souches d'entérobactéries ; p : 12298.
- [69] **H.Amzal (2010)**. Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier, thèse de doctorat Biochimie-Pharmacologie, université Mohammed v agdal rabat.

- [70] **H.TRABSA(2015)**. Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*, doctorat en biologie, Université Ferhat Abbas Sétif 1
- [71] **S. DJEDDI(2015)**. Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie, Université Badji Mokhtar Annaba, BP 12, 23000, Algérie ; p : 61-62.
- [72] **KHIMA et MERABTI (2015)**, Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Calamintha officinalis* et *Abies numidica*, master science alimentaire Université A. MIRA - Bejaia ; p : 22.
- [73] **O.MEDJOUJDA (2012)**. *Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes Médicinales*, vie licence Biochimie fondamentale et appliquée, université d'Agadir
- [74] **f.beddou(2015)**.étude phytochimique et activités biologique de deux plantes médicinales sahariennes *rumex vesicarius* L ET *RADIATA* COSS ET DUR, doctorat en biologie, université abou bekr bellaid Tlemcen.
- [75] **M.CONGO (2012)**. Etude des propriétés anti radicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso ; p : 42.
- [76] **OBAME, L et al., (2007)**. Antioxidant and antimicrobial activities of *Canarium schweinfurthii* Engl. Essential oil from Centrafrican Republic. *African Journal of Biotechnology*, 6(20).
- [77] **C.POPOVICI et al., (2010)**. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- [78] **B. Coignard, D. Rahib (InVS) (2005)**. Infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Sarm) dans les établissements de Institut de veille sanitaire santé, France ; P : 3
- [79] **P. Mariani-Kurkdjian. É. Bingen (2012)**. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines *Shiga-toxin producing by Escherichia coli*: pathophysiology and virulence, SRLF et Springer-Verlag France; P: 268.
- [80] **HARIZI Khalil(2009)**. Recherche et Identification des Bactéries Pathogènes *Salmonella* et *Listeria* dans les aliments, Mastère professionnel Contrôle de la qualité et de la sécurité des produits animaux et végétaux, Université de Gabés ; P : 9-10.

- [81] **Guillaume La rivière-Gauthier(2012)**. Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments, Faculté de médecine vétérinaire Université de Montréal ; p : 13
- [82] (Définition de Pseudomonas), <https://www.aquaportail.com> , consulté le 22/12/2016
- [83] **M. Jean LESNE(2014)**. Evaluation et gestion des risques liés à Pseudomonas aeruginosa dans les établissements de thermalisme, Atelier Santé Environnement ; p : 18.
- [84] **L.GACHKAR** et al., (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food chemistry, 102(3), 898-904.
- [85] **S.adouan(2016)**.étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des aurès, magistère en sciences agronomique, université mohamed khider-biskra ; p : 188.
- [86] **B. elmouloud (2016)**.extraction des polyphénols et etude des activités anti oxydantes et anti bactériennes de quelque plantes sahariennes, doctorat en science, université Badji Mokhtar Annaba ; p : 114.
- [87] **C.DURAFFOURD** et al., (1999).cahiers de phytothérapie clinique. a. examens de laboratoires galenique.elements thérapeutiques synergiques, 2eme ed, Masson paris.

ملخص

في ظل سيطرة الأدوية الكيميائية على المجال الطبي، وللتقدم خطوة اخرى نحو تطوير هذا الاخير, تم توجيه تطوير البحوث حول النباتات الطبية نحو الحصول على الأدوية النباتية. تم تكثيف البحث وتوصيف المواد النشطة حيويًا ، أو المخدرات. في هذا السياق ، فإن الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على نشاط مضادات الأكسدة المضادة للالتهابات ومضادات الميكروبات من العنقدة.

كلمات المفتاح: العنقدة ، مضاد للجراثيم ، مضاد للأكسدة ، مضاد للالتهابات

Abstract:

Faced with the therapeutic limits of chemical drugs, the development of research on medicinal plants has been oriented towards obtaining phytomedicines. Research and characterization of new bioactive substances, or drugs, has been intensified. In this context, the objective of this work is to highlight the antioxidant anti-inflammatory and antimicrobial activity of *ephedra sinica*.

Keywords: Maceration, medicinal plants, phytochemical screening, anti-bacterial, antioxidant.

Résumé:

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. La recherche et la caractérisation de nouvelles substances bioactives, ou des drogues, a été intensifiée. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antioxydante anti-inflammatoire et antimicrobienne de l'éphédra *sinica*.

Mots clés : *éphédra sinica*, antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire

