



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA –

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Master académique en Biologie

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie Appliquée

Thème:

Etude comparative de deux extraits de la plante

Ephedra alata

Présenté par:

✚ MEBARKIA Ouafa
✚ OUADAOUI Hayette

Jury de soutenance :

Président : Mr. MAAMAR Hichem (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela
Promotrice : Mme. KRIM Meriem (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela
Examinatrice : Mme. DJEMIL Randa (M.C.B) Université Abbes Laghrou-Khenchela

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018 - 2019

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier :

Mme KRIM Meriem d'avoir acceptée de nous encadrer, ça sera pas suffisant pour l'exprimer toute nous reconnaissance pour la confiance et le grand soutien, pour le temps qu'elle nous a consacrée toute les fois que cela était nécessaire, pour ses conseils précieux qu'elle nous a prodiguée tout le long de notre travail, et pour son aide.

Les membres de jury, Mme DJEMIL Randa et M. MAAMAR Hichem maitres de conférences classe « B » à l'université Abbes Laghrour –Khenchela-, Que chacun d'entre eux soit vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter, de participer à ce jury, et le plaisir d'assister à notre soutenance.

Recevez, l'expression de notre respectueuse.

Nous adressons un grand remerciement à Nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie et à l'ensemble des étudiants de master 2 Biochimie, ainsi que tous les étudiants du département de biologie. Nous tenons à remercier aussi, Le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Khenchela.

Enfin, nous n'oublions pas de dire merci à nos familles car sans eux ce travail n'aurait pas vu le jour, et à tous ceux et celles qui

*ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste
travail, soient assurés de notre profonde gratitude*

Dédicace

Je dédie ce travail à :

A mes parents,

La source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous l'amour et les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.

A mon cher frère Salim, sa femme et ses enfants Malaḳ, Mohcine et Razane

A mes très chères sœurs : Nadia, Soumia, Zaima et ses époux et une spéciale

Dédicace à Chaouḳi pour son aide, et Ibtissam

A ma nièce : Soudjoud et mon neveu : Abd Arahmane

A mon amie et ma plus belle cousine qui je la considère comme sœur :

Houda

A mes très chères cousines : Nadia et Salwa

A mon binôme et ma chère : Hayat

A mes chères amies : Hadda, Rokia et Fatima

Sans oublier mes camarades de la promotion : 2ème année Master biochimie appliquée

(2018-2019)

Ouafa

Dédicace

Ce travail, est bien au-delà, je le dois à mes très chers parents, qui m'ont fournis au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

A mes précieuses sœurs Wafa et Siham, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour.

A mes chers frères Ibrahim et Abed allah.

A Nassima Belhouchet grâce à son aide

A mes cousines dont je cite particulièrement mes chères Samiha et Hadjer , ,Amira , Hassina, et Sabrina .

A ma copine ; mon binôme et ma chère Wafa

A mes amis Hassna ; Iness et Kenza

Que toute personne m'ayant aidée de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Hayette

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien.

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien.

BSA : Sérum bovine albumine.

CAT : Catalase.

CCM : Chromatographique sur Couche Mince.

D : Diamètre.

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde.

DPPH : 2,2-Diphényl-1- Picrylhydrazyl.

EAEA : Extrait méthanolique d'*Ephedra alata*.

EMEA : Extrait aqueux d'*Ephedra alata*.

HCl : Acide chlorhydrique.

IC50 : Inhibitive Concentration of 50 %.

m0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé.

m1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

µg EAG / mg E : Equivalent microgramme acide gallique par mg d'extrait.

µg EQ / mg E : Equivalent microgramme de quercétine par mg d'extrait.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium.

PBS : Tampon Phosphate Saline.

pH : Potentiel Hydrique.

R : Rendement exprimé.

Rf : Rapport frontal.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

SD : Standard Déviation.

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : Ultra Violet.

% PI : Pourcentage d'Inhibition.

Liste des figures

Figure 01 : Répartition géographique de l'Ephedra dans le monde.....	06
Figure 02 : Ephedra alata.....	08
Figure 03 : Structure basique des classes des flavonoïdes.....	11
Figure 04 : La structure des tannins hydrolysables (a) et des tannins condensés (b)....	12
Figure 05 : Structure chimique des quinones.....	13
Figure 06 : Structure d'une lignine.....	14
Figure 07 : Structure de base des coumarines.....	15
Figure 08 : La molécule d'isoprène.....	16
Figure 09 : Structure d'une saponine.....	18
Figure 10 : Troubles liés au stress oxydatif.....	22
Figure 11 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.....	23
Figure 12 : Différents modes d'action des antibiotiques.....	30
Figure 13 : Les étapes de la préparation EMEA et EAEA.....	36
Figure 14 : Mode opératoire de dosage des polyphénols.....	41
Figure 15 : Mode opératoire de dosage des flavonoïdes.....	42
Figure 16 : Réduction du DPPH• par un antioxydant.....	44
Figure 17 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	45
Figure 18 : Différentes étapes de l'activité antibactérienne.....	48
Figure 19 : Mesure de diamètres des zones d'inhibition.....	49
Figure 20 : Rendements des extraits d' <i>Ephedra alata alenda</i>	50
Figure 21 : Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EMEA.....	52
Figure 22 : Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EAEA.....	52
Figure 23 : Photos de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EMEA et EAEA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 3: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 6: (c) à 365 nm et (d) à 254 nm.....	54
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	56
Figure 25 : Teneur en polyphénols totaux (μg EAG/mg E).....	56
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	57
Figure 27 : Teneur en flavonoïdes totaux (μg EQ/mg E).....	57
Figure 28 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des	

différentes concentrations de EMEA.....	59
Figure 29 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de EAEA.....	59
Figure 30 : Représentation graphique de l'activité antibactérienne de EMEA et EAEA.....	63
Figure 31 : Résultats de l'activité antibactérienne de EMEA et EAEA.....	63

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Classification systématique d' <i>Ephedra alata alenda</i>	07
Tableau 02 : Principales classes des coumarines.....	16
Tableau 03 : Les principales familles chimiques des antibiotiques et leurs modes d'action.....	29
Tableau 04 : Souches utilisées dans l'activité antibactériennes.....	32
Tableau 05 : Réactifs chimiques et instrumentations.....	33
Tableau 06 : Différents systèmes de solvants utilisés pour la présente étude.....	39
Tableau 07 : Le rendement des extraits d' <i>Ephedra alata alenda</i>	50
Tableau 08 : Résultats des tests phytochimiques sur EMEA et EAEA.....	51
Tableau 09 : Résultats de la CCM de l'EMEA et EAEA par différents systèmes de solvant.....	54
Tableau 10 : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits de <i>Ephedra alata alenda</i>	58
Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les deux extraits de <i>Ephedra alata alenda</i>	60
Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA.....	61
Tableau 13 : Résultats de diamètres des zones d'inhibitions de croissance bactérienne.....	62

Résumés

Résumés

Résumé

Ephedra alata alenda est une plante qui appartient à la famille des Ephedraceae, et représente l'une des plantes médicinales les plus anciennes connues par l'être humain. Notre travail a eu pour objectifs de comparer entre les deux extraits, méthanolique et aqueux de la plante *Ephedra alata alenda*.

Le screening phytochimique a montré la présence des : flavonoïdes, tanins, composés réducteurs et des quinones libres, dans les deux extraits et les alcaloïdes dans l'extrait méthanolique. Les résultats de l'étude qualitative par CCM a montré que l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes plus que l'extrait aqueux

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃. Les teneurs les plus importants en polyphénols et en flavonoïdes enregistrées sont celles de l'extrait méthanolique de (50.18±3.29 µg EAG/mg) et (14.35±0.79 µg EQ/mg) respectivement.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH. L'extrait méthanolique a une activité antioxydante plus importante (74.71±6.1) que l'extrait aqueux (33.77±6.02). Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par l'évaluation de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que l'extrait aqueux de la plante inhibe la dénaturation de Bovin Sérum Albumine avec des pourcentages d'inhibition de 84.4±10.7.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur trois souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Les extraits testés ont un effet sur seulement les deux souches *E.coli*, et *L. monocytogenes* .

Mots-clés: *Ephedra alata alenda*, activité antibactérienne, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes, activité antiinflammatoire.

Abstract

Ephedra alata alenda is a plant that belongs to the family of Ephedraceae, and is one of the oldest medicinal plants known to humans. Our work was aimed at comparing methanolic and aqueous extracts of the plant *Ephedra alata alenda*. Phytochemical screening showed the presence of: flavonoids, tannins, reducing compounds and free quinones, in both extracts and alkaloids in the methanolic one. The results of the qualitative study, by CCM, showed that the methanolic extract is richer in flavonoids than aqueous extract.

Quantitative assays of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and flavonoids by the AlCl₃ method indicate that the highest concentrations of polyphenols and flavonoids recorded in the methanolic extract of (50.18±3.29 µg EAG/mg) and (14.35±0.79 µg EQ/mg) respectively.

Antioxidant activity was evaluated using the DPPH free radical reduction method. The methanolic extract had a greater antioxidant activity (74.71±6.1) than the aqueous extract (33.77±6.02). The results of the anti-inflammatory activity *in vitro* by the evaluation of percentage inhibition of the denaturation of proteins concludes that the aqueous extract of the plant inhibits the denaturation of Bovine Serum Albumin with inhibition percentages of 84.4±10.7.

The antimicrobial activity was determined on three bacterial strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The extracts tested had an effect on only two strains *E. coli* and *L. monocytogenes*.

Key words: *Ephedra alata alenda*, antibacterial activity, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, antiinflammatory activity.

المخلص

Ephedra alata alenda هي نبات ينتمي إلى عائلة Ephedracea ، وهي واحدة من أقدم النباتات الطبية المعروفة للإنسان.

الهدف من هذه الدراسة هو مقارنة المستخلصين الميثانولي والمائي من نبات *Ephedra alata alenda* . أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود: مركبات الفلافونويد ، العفص، المركبات المرجعة والكينونات الحرة ، في كل من المستخلصين والقلويدات في المستخلص الميثانولي . أظهرت نتائج الدراسة النوعية بواسطة الكروماتوغرافيا الرقيقة CCM أن المستخلص الميثانولي غني بمركبات الفلافونويد أكثر من المستخلص المائي. كشفت الفحوصات الكمية من البوليفينول الكلي بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu وفلافونويدات بواسطة طريقة AICI3 أن أعلى تركيزات البوليفينول والفلافونويد المسجلة هي موجودة في مستخلص الميثانول 50.18 ± 3.29 ميكروغرام / EAG ملغ) و 14.35 ± 0.79 ميكروغرام / EQ ملغ) على التوالي.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة تخفيض جذري DPPH. يحتوي المستخلص الميثانولي على نشاط مضاد للأكسدة يقدر ب (74.71 ± 6.1) أكبر من المستخلص المائي (30.64 ± 3.66) ، وتمثل نتائج النشاط المضاد للالتهابات في المختبر من خلال تقييم النسبة المئوية لتثبيط عملية تغيير البروتينات يخلص إلى أن المستخلص المائي للنبات يمنع تمسخ البومين المصل مع نسب تثبيط 84.7 ± 10.7

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على ثلاث سلالات : *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* . المستخلصات التي تم اختبارها لها تأثير على سلالتين فقط *E. coli* و *L. monocytogenes*

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
Introduction.....	01
Etude bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales	
1. Définition.....	03
2. Principes actifs des plantes médicinales.....	03
3. La phytothérapie.....	04
3.1. Définition.....	04
3.2. La phytothérapie à travers les siècles.....	04
4. Caractères généraux.....	06
4.1. Genre <i>Ephedra</i>	06
4.2. Classification de « <i>Ephedra alata alenda</i> ».....	07
4.3. Distribution et origine.....	07
4.4. Description botanique.....	07
4.5. Utilisations.....	08
4.6. Pharmacologie.....	09
4.7. Toxicologie.....	09
Chapitre II : Les métabolites secondaires	
1. Définition.....	10
2. Classification des métabolites secondaires.....	10
2.1. Les polyphénols.....	10
2.1.1. Les flavonoïdes.....	10
2.1.2. Les tannins.....	12
2.1.3. Les quinones.....	13
2.1.4. Les lignines.....	13
2.1.5. Les coumarines.....	14
2.2. Les terpénoïdes.....	16
2.2.1. Les stéroïdes.....	17
2.2.2. Les huiles essentielles.....	17

2.3. Les saponines.....	18
2.4. Les alcaloïdes.....	19

Chapitre III : Les activités biologiques

1. Activité antioxydante.....	20
1.1. Stress oxydant.....	20
1.2. Radicaux libres.....	20
1.2.1. Espèces réactives de l’oxygène.....	20
1.2.2. Sources des espèces réactives de l’oxygène.....	21
1.3. Pathologies liées au stress oxydant.....	21
1.4. Antioxydants.....	22
1.4.1. Définition d’un antioxydant.....	22
1.4.2. Principaux antioxydant.....	22
1.4.2.1. Antioxydants enzymatiques.....	22
1.4.2.2. Antioxydants non enzymatiques.....	23
2. Activité anti-inflammatoire.....	24
2.1. Inflammation.....	24
2.1.1. Inflammation aigue.....	25
2.1.2. Inflammation chronique.....	26
2.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation.....	26
2.3. Anti-inflammatoires.....	27
2.3.1. Anti-inflammatoire non stéroïdiens.....	27
2.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	27
2.3.3. Anti-inflammatoires d’origine végétale.....	27
3. Activité antibactérienne.....	28
3.1. Les antibiotiques.....	28
3.2. Classification et mécanisme d’action des antibiotiques.....	28
3.3. Résistance des aux bactéries antibiotiques.....	30
a. Résistance naturelle.....	30
b. Résistance acquise.....	30

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Matériel.....	32
1.1. Matériel biologique.....	32

1.1.1. Matériel végétal.....	32
1.1.2. Souches bactériennes.....	32
1.2. Réactifs chimiques et équipements.....	33
2. Méthodes.....	34
2.1. Préparation de deux extraits.....	34
2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	34
2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	35
2.2. Tests phytochimiques.....	36
2.3. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	38
2.4. Dosage des polyphénols totaux.....	40
2.5. Dosage des flavonoïdes.....	41
2.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH).....	42
2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	44
2.8. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	45
2.8.1. Méthode d'évaluation (méthodes des disques).....	46

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Etude phytochimique.....	50
1.1. Rendements des extraits.....	50
1.2. Tests phytochimiques.....	51
1.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM.....	53
1.4. Dosage des polyphénols totaux.....	55
1.5. Dosage des flavonoïdes.....	58
2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	55
3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	61
4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	62
Conclusion et perspectives.....	65
Références bibliographiques.....	66

Annexes

Introduction

Introduction

Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement créer un lien de complémentarité avec la nature et élaborer ce que nous appelons aujourd'hui la « médecine traditionnelle » (**Boucherit, 2018**).

Les plantes avec leur nombre illimité constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques. Les plantes aromatiques sont caractérisées par leur richesse en principes actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes qui sont dotées de propriétés importantes et différentes (**Madi, 2010**).

L'Algérie pays connu pour sa biodiversité et son climat, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15 % endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. C'est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche des molécules à activité biologique originaires de plantes (**Boudjad, 2009**).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier *Ephedra alata alenda* qui appartient à la famille des Ephedraceae, c'est une plante très répandue dans la région des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes (**Kebili, 2016**). Elle est très utilisée en médecine traditionnelle grâce à ces propriétés spécifiques antioxydantes et antibactériennes (**Jerbi et al., 2016**), et le traitement de certaines maladies graves tel que le cancer et les maladies inflammatoires (**Yahaioui et Silat, 2018**).

Notre présente étude s'inscrit dans l'objectif de réaliser une étude phytochimique (screening phytochimique, la séparation des principaux métabolites par la chromatographie, sur couche mince (CCM), dosage des polyphénols et des flavonoïdes) et d'effectuer une recherche sur l'activité antioxydante, l'anti-inflammatoire et l'antibactérienne *in vitro* du *Ephedra alata alenda*.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties :

- ✓ La première partie représente une mise au point d'une synthèse bibliographique. Elle est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude de la plante d'intérêt ; sa description son intérêt pharmacologique ainsi l'état de

Introduction

recherché sur cette plante. Le second chapitre traite les métabolites secondaires ou principe actif de plantes, et enfin le troisième chapitre qui décrit les activités biologiques qu'on va étudier par cette plante.

- ✓ La seconde partie (pratique) renferme deux chapitres. Dans le premier chapitre nous allons décrire en détail le matériel (végétal, appareil...) utilisé et les techniques et procédés (extraction, criblage chimique, dosage...) suivis pour l'étude biologique de notre plante *Ephedra alata alenda*. Le deuxième chapitre comportera les principaux résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Etude
bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur
les plantes
médicinales

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

1. Définition

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des propriétés thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Sofowora, 2010**).

De façon plus générale, une plante médicinale est un végétal doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à dose normale. Il est important avant tout que l'utilisation raisonnable dans le but de guérir une maladie déclarée ne nuise pas (**Debuigne et Couplan, 2013**).

Une plante médicinale est non seulement une plante, mais peut être aussi un arbre, un buisson, un champignon, un légume, une racine, une algue... C'est pourquoi, on parle alors d'espèces botaniques (**Bousta et Ennabili, 2011**).

2. Principes actifs des plantes médicinales

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants biochimiques naturellement présents dans une plante, ils lui confèrent son activité thérapeutique. Les principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale et ils n'ont pas les mêmes propriétés. Exemple type, l'oranger ; ses fleurs sont sédatives, mais son écorce est apéritive (**Adouane, 2016**).

Les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, constituent une source importante de nouveaux principes actifs, de nombreux remèdes prescrits à des milliers de personnes dans le monde, sont d'origine naturelle, qu'on l'a découvert, en étudiant l'usage des plantes dans la médecine populaire (**Bourmita et al., 2013**).

Différents principes actifs :

- a) Les phénols : Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples à des substances plus complexes, Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques.
- b) Les flavonoïdes : Présents dans la plupart des plantes, sont des pigments poly phénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antivirales.
- c) Les tanins : Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.
- d) Les saponines : Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes.

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

- e) Les coumarines: De différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.
- f) Les alcaloïdes: formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (-N-) qui les rend pharmaceutiquement très actifs (**Iserin, 2001**).
- g) Les huiles essentielles: Les huiles essentielles ou simplement essences sont des produits aromatiques légers volatils ; généralement liquides à température ambiante et insolubles dans l'eau (**Clément, 2009**).
- h) Les mucilages: Gommages visqueuses se gonflant et formant un gel dans l'eau, Les mucilages végétaux affaiblissent la sensibilité au goût surtout pour les acides.
- i) Les vitamines et minéraux: Nécessaires à diverses fonctions métaboliques et contrairement aux enzymes, non catalyseurs (**site web 1**).
- j) Les anthocyanes: Ce sont des dérivés de l'acide cyanhydrique (produit de la combinaison de l'hydrogène avec le cyanogène). Des anthocyanes, à dose modeste, dans une plante donnera des vertus antiseptiques à celle-ci. On les trouve dans les fleurs bleues (bleuet, violette, mauve) (**site web 2**).
- k) Les substances amères: Les amères ne sont pas chimiquement uniformes, mais ont tous plus ou moins un goût amer (**Hensel, 2008**).

3. La phytothérapie

3.1. Définition

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement" (**Rwangobo, 1993**).

La phytothérapie, c'est l'emploi de plantes ou de médicaments à base de plantes (poudres, préparations en ampoules, infusions...) pour soigner naturellement les différents maux du corps humain. La phytothérapie est très certainement la meilleure approche pour prévenir mais aussi pour soigner la majorité de nos maux du quotidien (**Bouakrif, 2016**).

3.2. La phytothérapie à travers les siècles

Il y a 60 000 ans, l'homme de Neandertal utilisait les plantes, et les chamans ont joué un rôle important dans la collection, l'apprentissage à l'utilisation et la transmission de la connaissance des plantes durant l'évolution d'Homo Sapiens. Les plantes étaient

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

employées largement dans l'alimentation, la gestion de certaines maladies et aussi pour atteindre un monde plus spirituel.

Puis les Grecs avec Hippocrate, Aristote, Théophraste, Galien, Dioscoride et les Romains ont enseigné l'art de traiter par les plantes en colligeant les connaissances avec plus de 500 plantes médicinales répertoriées (**Létard et al., 2015**).

Dans les pays développés, avec l'avènement de la chimie moderne vers la fin du XIX^e siècle (1860: aspirine par BAYER) et la découverte de nouveaux médicaments considérés comme miraculeux (sulfamidés et pénicilline), la phytothérapie a été reléguée au second plan comme « remèdes de grand-mère » aux vertus incertaines (**Vilain, 2012**).

Actuellement, certaines civilisations (chinoise, ayurvédique, arabe, tibétaine, indienne...) sont encore fondées sur ces systèmes thérapeutiques ancestraux, moins onéreux. (**Létard et al., 2015**).

On peut la distinguer en deux types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique (**Gahbiche, 2009**).
- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments, et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (**Sebai et Boudali, 2010**).

Ces deux sources de connaissances sont complémentaires. La médecine traditionnelle s'intéresse aux effets de la plante dans sa globalité ainsi qu'à son action sur l'ensemble de l'organisme. Les techniques modernes se concentrent sur les propriétés d'une ou d'un ensemble de molécules présentes dans la plante et de leur action sur un symptôme ou une cause précise. Elles permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action et de proposer un usage thérapeutique documenté.

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

Enfin, il est important de préciser que la phytothérapie n'est pas une thérapeutique inoffensive, certaines plantes médicinales sont toxiques, d'autres peuvent avoir des effets secondaires cumulatifs. La connaissance des plantes et le respect de leurs indications sont fondamentaux pour une pratique phytothérapeutique sûre (**Bouzouita, 2016**).

4. Caractères généraux

4.1. Genre Ephedra

Ephedra est une plante médicinale appartenant à la famille d'Ephedraceae (**Al-Rimawi et al., 2017**). Historiquement, éphédra a été employée dans la médecine chinoise pendant plus de 5000 années pour traiter asthme, froid commun, et bronchite (**Bigdeli et al., 2009**).

Malgré sa longue histoire et son agronomie, l'utilisation de l'herbe d'éphédre a diminué à travers les années, mais dans le début du 20ème siècle, l'intérêt pour l'herbe a graduellement rétabli, en particulier son utilisation aux USA pour la perte et l'exécution du poids (**Abourached et al., 2003**). Ephedra comprend environ 60 espèces qui se répartissent presque dans le monde entier (**site web3**).

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 et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (**Kebili, 2016**) (figure 01).

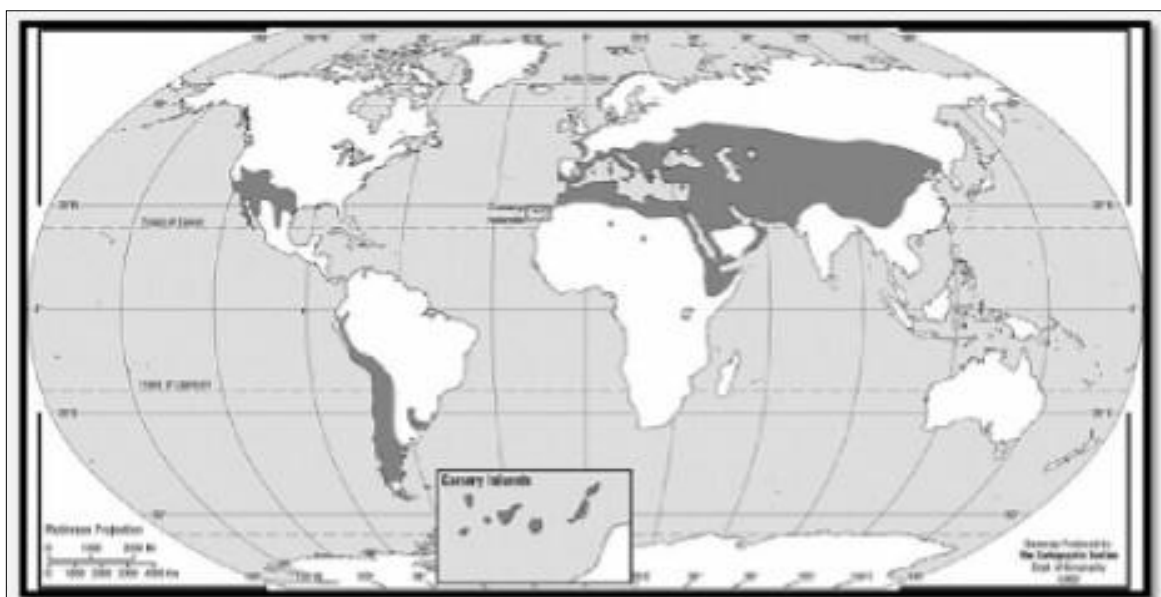


Figure 01: Répartition géographique de l'Ephedra dans le monde (**Caveney et al., 2001**).

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

4.2. Classification de « *Ephedra alata alenda* »

Le tableau ci-dessous représente la classification botanique de la plante étudiée :

Tableau 01 : Classification systématique de *Ephedra alata alenda* (Ozenda, 1991).

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

4.3. Distribution et origine

Ephedra alata se retrouve dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique du Nord, de l'Asie, de l'Europe et du nord et central d'Amérique (Gorai *et al.*, 2015). La terre natale pour cette espèce est : Iran, Algérie, Irak, Tchad, Egypte, Palestine, Liban, Jordanie, Arabie Saoudite, Maroc, Syrie, Libye, Mauritanie, Mali, Somalie et Tunisie (Jerbi *et al.*, 2016).

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

4.4. Description botanique

L'*Ephedra* est un arbuste très ramifié dioïque, largement distribué de 50 cm à 1 m de hauteur. Les tiges sont photo-synthétisante. Les feuilles sont opposées. Elles sont très petites et peu visibles (Spichiger *et al.*, 2004).

D'avril à mai apparaissent des petites fleurs jaunes, puis rouges à maturité des graines. Les fleurs sont Unisexuées, les mâles groupées en cônes ovales, solitaires et axillaires, les femelles groupées en cônes pédonculés, oblongs ovales. La fleur femelle donne deux

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

graines qui sont entourées par les bractées qui deviennent rouges et charnues, formant un pseudo fruit ovoïde de 5 à 9 mm de long. Les fruits sont des akènes (fruit à graine unique) comestibles et ressemblant, à maturité, à des baies rouges (**Boisdunal, 1828**) (figure 02).



Figure 02 : Ephedra alata (**Boulberhane et Nabti, 2017**).

4.5. Utilisations

En médecine asiatique, l'Ephedra est recommandée contre le rhume, la grippe, la fièvre, les frissons, les maux de tête, les œdèmes, l'hyperhidrose, la congestion nasale, les douleurs osseuses, la toux et la respiration sifflante (**Soni et al., 2004**).

En Egypte, Ephedra alata est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**). En Arabie Saoudite, elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2011**). Au Maroc, l'Ephedra alata est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**).

En Palestine, elle est employée dans la médecine traditionnelle pour traiter : allergies, asthme bronchique, froids, toux, œdème, fièvre, grippe, maux de tête (**Al-Rimawi et al., 2017**) et pour le traitement du cancer (**Jaradat et al., 2015**).

En Algérie, Ephedra alata s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2003**).

Les parties 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 (**Abourashed et al., 2003**).

4.6. Pharmacologie

La tige de l'*Ephedra alata* contient de l'éphédrine alcaloïde et le pseudo éphédrine qui est une autre substance présente en quantité importante dans l'*Ephedra* qui sont utilisées pour le traitement de certaines maladies graves : cancer ; maladies inflammatoires ; asthme ; maladies virales etc. et aussi contient des flavonoïdes qui constituent la catégorie la plus important de polyphénolsdes et qui sont molécules très réputées pour leurs vertus antioxydants (**Yahaioui et Silat, 2018**).

L'éphédrine stimule la fréquence cardiaque, augmente la tension artérielle, favorise le broncho dilatation, et montre des effets prononcés sur le système nerveux central (CNS) en liant aux récepteurs adrénergiques (**Ibragic et Sofia, 2015**).

4.7. Toxicologie

L'éphédrine est un alcaloïde retiré d'éphédra alata, elle reproduit tous les effets de la noradrénaline, mais son action est 100 fois moins intense, mais très prolongé.

Sur le système nerveux central, l'éphédrine produit une excitation avec des tremblements, de l'insomnie, de l'anxiété (**Cohn et Jacquot, 2008**).

L'*Ephedra* perd de son efficacité après une utilisation prolongée et peut même affaiblir les glandes surrénales (**Lauri Aesoph, 2019**).

Chapitre II :
Les métabolites
secondaires

1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Lutge *et al.*, 2002 ; Marouf et Reynaud, 2007**).

Ils sont réputés depuis l'antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques et depuis quelques décennies l'homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques (**Najjaa *et al.*, 2013**).

2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes :

- Phénols et polyphénols
- Terpénoides et stéroïdes
- Alcaloïdes

2.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont les métabolites secondaires communs dans toutes les espèces des plantes (**Yazaki *et al.*, 2009**). Les polyphénols sont plus de 8000 composés différents identifiés à ce jour. C'est pourquoi la terminologie et la classification des polyphénols sont complexes et source de confusion. Bien que tous les polyphénols aient des structures chimiques similaires, il existe des différences distinctives (**Kabera *et al.*, 2014**).

2.1.1. Les flavonoïdes

a. Définition

Le terme flavonoïdes signifie jaune en latin (flavus en latin) (**Ribereau-gayon, 1968**). Ils sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le thé (**Ghedira, 2005**). Ces molécules sont considérées comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Bruneton, 1999**). Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (**Site web 4**). Leur structure comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone, ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène.

Chapitre II : Les métabolites secondaires

(Stocklet et Schini-Kerth, 2011). Ils sont divisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont principales : les flavonones, les flavonols, les flavones, et les isoflavones et les anthocyanines (figure 03) (Zakkad, 2017).

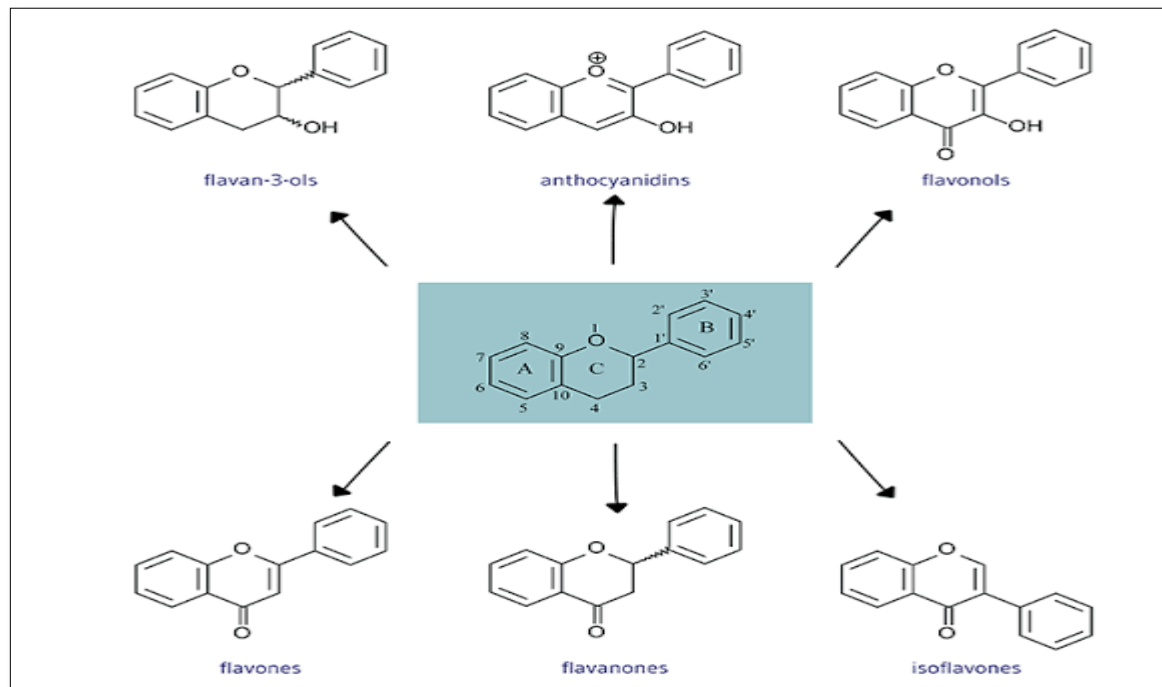


Figure 03 : Structure basique des classes des flavonoïdes (Crozier, 2016).

b. Propriétés des flavonoïdes

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (Alibert *et al.*, 1997).

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Middelton et Kardasnam, 1993).

Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (Ghedira, 2005).

2.1.2. Les tannins

a. Définition

Les tannins sont des substances amères qui renferment les écorces, les feuilles, les racines de certains végétaux (Mann, 1962).

On peut considérer que les tannins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différant à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (figure 04) (Macheix *et al.*, 2005).

- **Les tannins hydrolysables**, constitués par une molécule glucidique sur laquelle est estérifiée de l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide éllagique, acide m-digallique) d'où le nom de pyrogalliques et d'ellagitanins qu'on leur donne quelquefois. Ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique (Sereme *et al.*, 2008).
- **Les tannins condensés** se trouvent dans les raisins, les grenades, etc., ont un poids moléculaire élevé et ont été signalés comme possédant un potentiel thérapeutique. Les tannins condensés sont plus stables et ne se décomposent pas facilement. Ils ne sont pas non plus facilement hydrolysés par les acides. Le composant de base du tannin condensé est l'épicatéchine. Plusieurs utilisations monomères de la catéchine se condensent pour former la structure oligomère ou polymère du tannin condensé (Ghosh, 2015)

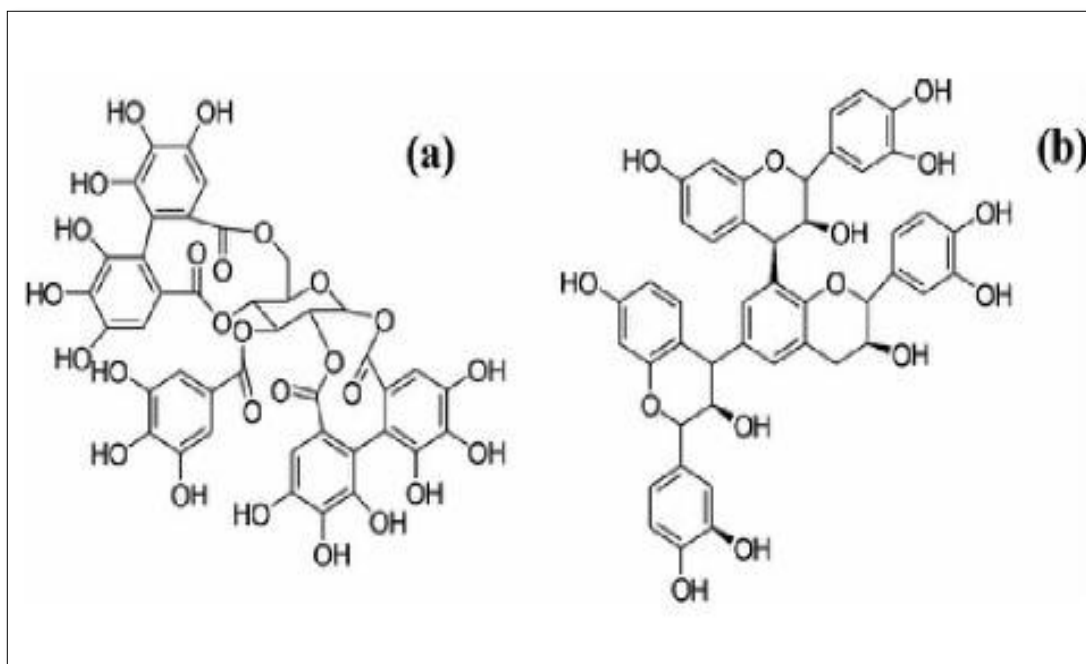


Figure 04 : La structure des tannins hydrolysables (a) et des tannins condensés (b) (Pandian *et al.*, 2014).

b. Propriétés des tannins

- Ils coagulent les protéines du derme ; d'où leur utilisation pour le tannage des peaux.
- Ils précipitent les protéines de la salive, et lui font perdre son pouvoir lubrifiant, ce qui correspond à leur action astringente : Cette propriété rend les tissus riche en tanins peu consommable par les herbivores, c'est un mode de défense de la plante (**Botineau, 2010**).

2.1.3. Les quinones

a. Définition

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques et qui sont caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinone) (**Bruneton, 1999**) (figure 05). Ils sont issus de l'oxydation de phénols (**Bruneton, 2010**).

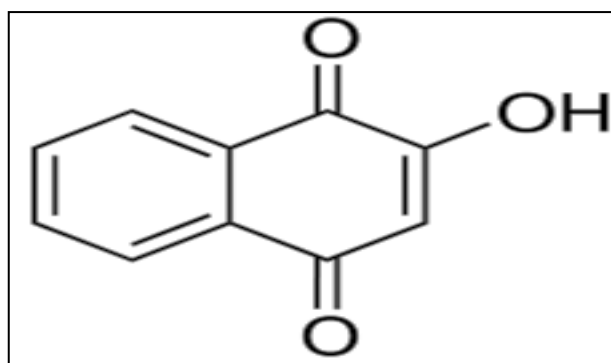


Figure 05 : Structure chimique des quinones (**Boulberhane et Nabti, 2017**).

b. Propriétés des quinones

Certains dérivés comme la plastoquinone et l'ubiquinone sont des transporteurs d'électrons. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou rendent inutilisables. Ceci explique la variété d'effets antimicrobiens potentiels des quinones. Nombre d'entre elles sont anti-appétantes et toxiques (**Gilbert et Norris, 1968**).

2.1.4. Les lignines

a. Définition

Les lignines sont définies comme « la matière incrustante » liant les éléments du bois entre eux ; c'est un polymère amorphe de nature phénolique (**Merdaga, 1985**) (figure 06).

Chapitre II : Les métabolites secondaires

La lignine est présente principalement dans les plantes vasculaires (plantes qui possèdent un tissu vasculaire pour transporter l'eau et les éléments nutritifs depuis les racines jusqu'aux feuilles) et dans quelques algues. Sa composition varie avec l'espèce végétale. La lignine est le terme générique d'un vaste groupe de polymères aromatiques. Elle constitue le seul groupe de polymères biosynthétisés à squelette aromatique. Ces polymères sont déposés principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables (Wertz, 2010).

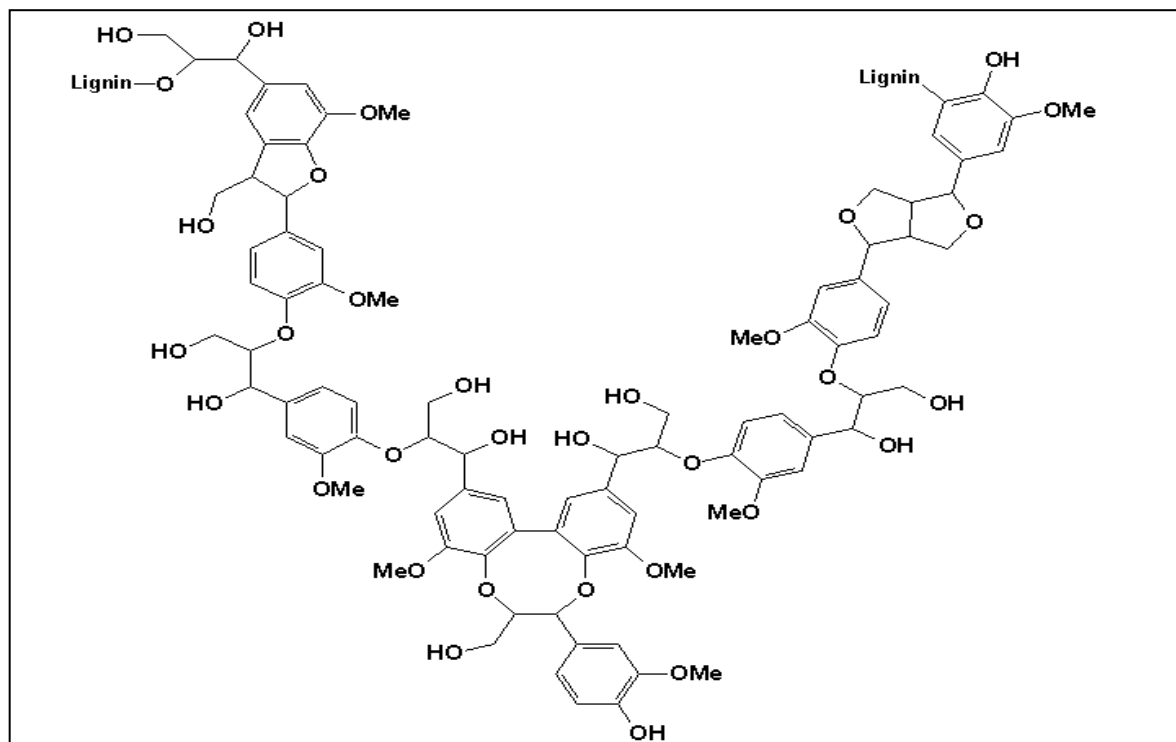


Figure 06 : Structure d'une lignine (Wertz, 2010).

b. Propriétés des lignines

- ✓ La dégradation difficile par la plupart des bactéries et champignons.
- ✓ La solubilité en milieu alcalin et la précipitation en milieu acide.
- ✓ La présence d'une fonction acide et d'une capacité d'échange cationique.
- ✓ La présence de groupe méthoxyl pour les lignines oxydées (Calvet, 2003).

2.1.5. Les coumarines

a. Définition

Les coumarines doivent leur nom de classe à « Coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka, à partir de laquelle la coumarine a été isolée en 1820 (Jain et Joshi, 2012) (figure 07).

Chapitre II : Les métabolites secondaires

Elles sont classées principalement en coumarines simples, prénylées, furanocoumarines, pyranocoumarines (tableau 02).

Elles se trouvent dans toutes les parties des plantes et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (**Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004**).

A présent plus de 1000 composés coumariniques sont isolés dont plus de 800 sont issus des plantes et des micro-organismes (**Zakkad, 2017**).

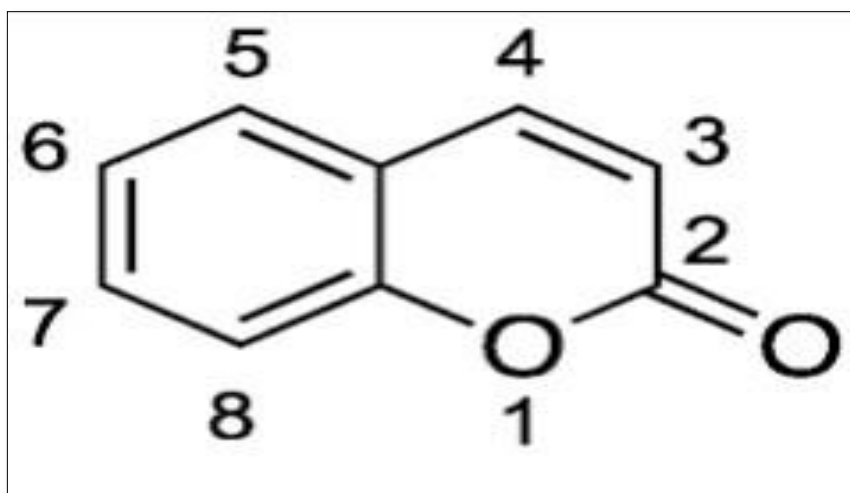


Figure 07 : structure de base des coumarines (**Benkiki, 2006**).

b. Propriétés des coumarines

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (**Hofmann, 2003**). Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (**Hofmann, 2003**).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées. L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Elle est aussi utilisée dans les produits cosmétiques (**Kansole, 2009**). Les coumarines sont indiquées dans le cas de lymphoedème du membre supérieure après traitement radiochirurgical du cancer du sein (**Harkati, 2011**).

Chapitre II : Les métabolites secondaires

Tableau 02 : Principales classes des coumarines (Bouزيد, 2009).

Coumarines simples	Coumarines ; Ombelliferone
Coumarines prenylées	Rutaculine ; Osthol
Furanocoumarines	Furanocoumarines lineaires : Bergaptene, Imperatorine Furanocoumarines angulaires : Angelicine, Pimpinéline
Pyranocoumarines	La visnadine
Les coumarines à l'état dimérique ou trimérique	Dicoumarines (coumarines dimérique) : Dicoumarol Tricoumarines : Triumbellatine

2.2. Les Terpénoïdes

a. Définition

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principal de formule $(C_5H_8)_n$ selon la variation de nombre n , dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, ... (Wichtl et Anton, 2009). Les terpènes sont composés d'unités isoprène (figure 08) (Duret, 2013). Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (Hopkins, 2003). Les terpenoides sont classés selon le nombre d'unités isoprénoides en : terpènes proprement dits ou mono terpènes (C10), sesquiterpènes (C15), di terpènes (C20), tris terpènes (C30), tétras terpènes (C40) et poly terpènes (4000) (Merghem, 2009).

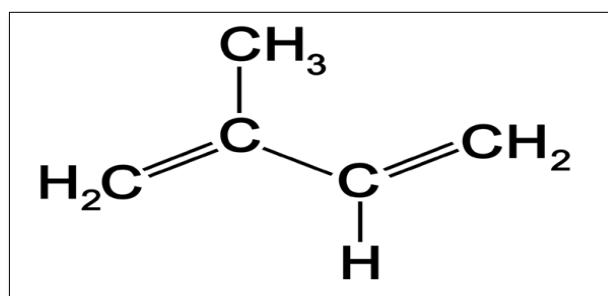


Figure 08 : La molécule d'isoprène (Loomis et Croteau, 1980).

b. Propriété des terpénoïdes

Les terpènes trouvent dans notre quotidien de nombreuses applications dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique mais également pharmaceutique. En effet, les terpènes possèdent d'importantes propriétés thérapeutiques, notamment en cancérologie, dans le traitement de l'inflammation ou encore des infections bactériennes (**Souris et Delphine, 2015**).

Les terpènes sont des substances importantes dans la chimie des plantes et participent à leur protection contre les agressions des champignons et autres bactéries (**Eurotext, 2002**).

2.2.1. Les stéroïdes

Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpénoïdes ayant perdus au maximum 3 méthyles.

Ils constituent une classe importante des composés biologiques tels que : les stérols proprement dit, les hormones corticosurrénales et sexuelles, les aglycones de glucosides cardiotoniques, les saponines et quelques alcaloïdes.

Les stéroïdes forment une famille de composés renfermant le squelette du per hydro - 1,2-cyclopentano phénanthrène et font partie de lipides (**Delaunay, 1988**).

Les stérols végétaux se trouvent à l'état naturel dans de nombreux végétaux et plus particulièrement dans les céréales complètes ; les légumes frais et secs et les fruits. Ils sont présents dans la partie lipidique (graisse) des plantes. Ils ne peuvent pas être fabriqués par l'organisme humain ; ils ne peuvent être donc apportés à l'organisme que par l'alimentation. Ils possèdent une structure proche de celle du cholestérol (**Menard, 2016**).

2.2.2. Les huiles essentielles

a. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des huiles tirées à base de plantes, avec un arôme propre à chacune d'elles. Ce sont des mélanges de substances aromatiques volatiles et odoriférantes qui sont présentes en faible quantité dans le végétal. Très aromatiques, très volatiles, elles passent instantanément de l'état liquide à l'état gazeux, aérien (**Aboughe Angone et al., 2014**). Une huile essentielle renferme majoritairement des terpènes volatils, issus de la condensation d'unités isopréniques, et des dérivés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Couic-Marinier et Lobstein, 2013**).

b. Propriétés des huiles essentielles

Ces huiles possèdent plusieurs propriétés telles que : les propriétés relaxantes, tonifiantes, énergisantes, régénérantes, assainissantes, désodorisantes, anti-inflammatoires, antioxydantes, etc..(**Aboughe-Angone et al., 2014**).

2.3. Les saponines

a. Définition

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau (**Vincken et al., 2007**). Ils sont des molécules composées de deux entités : une génine (aussi appelée aglycone) et une fraction glycoside (**Guillaume et Charrouf, 2005**) (figure 09). Les saponines sont des tensioactifs naturels que l'on retrouve, en quantité variable, dans de très nombreuses plantes (soit dans les feuilles de telle plante, soit dans le tronc de telle autre ou encore les fruits et les graines, les coques des noix, les racines etc.) (**Sit web5**).

b. Propriétés des saponines

Les saponines ont nombreuses propriétés physicochimiques (moussage, émulsification, solubilisation, douceur et amertume), ainsi que des propriétés biologiques (hémolytique, antimicrobienne, antioxydante et insecticide), coloration éclatante, industrie pharmaceutique et détergents des sols (**Kabera et al., 2014**). Les saponines ont une action expectorante, ce qui permet d'augmenter les sécrétions bronchiques. On les utilise dans le traitement des affections des voies respiratoires supérieures comme la toux ou la bronchite (**site web5**).

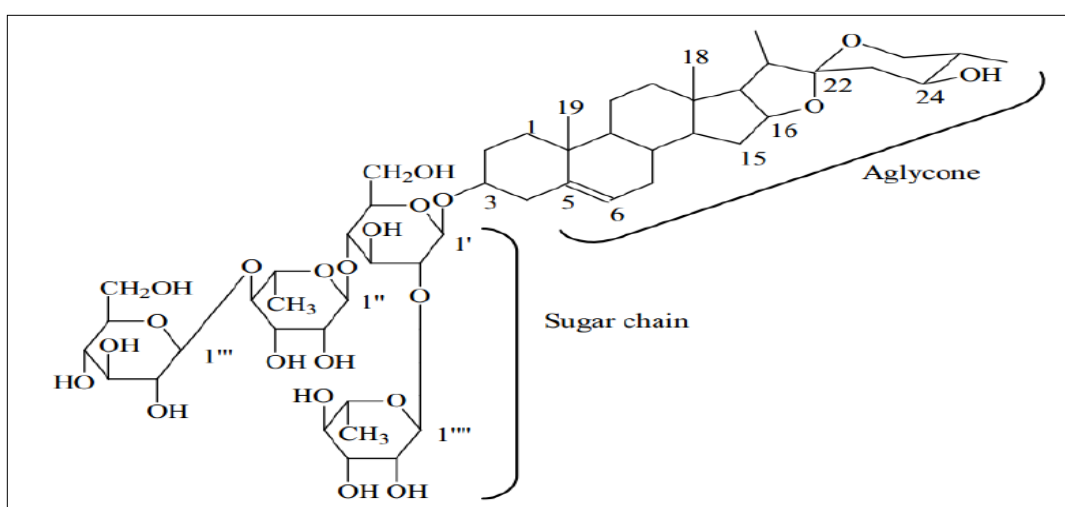


Figure 09 : Structure d'une saponine (**Moghimpour et Handali, 2015**).

2.4. Les alcaloïdes

a. Définition

Le terme alcaloïde (dérivé d'alcalin) rappelle qu'à l'origine ce nom avait été donné par W. Meissner, en 1819. Leur dénomination – de l'arabe al kali (qui a donné « alcali ») et du grec (forme) – fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique » (**Buchanan et al., 2000**). Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote (**Site web 6**).

Selon l'origine biosynthétique, On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Les pseudo-alcaloïdes** : ne possèdent pas d'azote intra cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale: exemple la coniine.
- **Les proto-alcaloïdes** : l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés, exemples : mescaline, hordénine, éphédrine, colchicine.
- **Les alcaloïdes vrais** : L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle; Bio synthétiquement formés à partir d'acides aminés; possèdent une activité pharmacologique marquée (**Merghem, 2009**).

b. Propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans des domaines variés :

- Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient anti dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine);
- Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasympathomimétiques, anticholinergiques et ganglioplégiques.
- On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, et d'antipaludiques (**Bruneton, 1999**).

Chapitre III :
Les activités
biologiques

1. Activité antioxydante

1.1. Stress oxydant

L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons au cours de la respiration cellulaire des organismes aérobies. Il est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique, mais il peut être également une source d'agression pour ces organismes (Ekoumou, 2003).

Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur destruction par les systèmes de défense antioxydants (Favier, 2003).

1.2. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe; cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Mac Laren *et al.*, 2007), sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (exemple : $\cdot\text{OH}$) (Sayre *et al.*, 2008).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires [Radical peroxyde (ROO) Radical alkoxyde (RO)], se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

1.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit [radical superoxyde (O_2), radical hydroxyl (OH), monoxyde d'azote (NO)], mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante [l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite (ONOO^-)] (Dacosta, 2003; Favier, 2003).

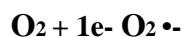
1.2.2. Sources des espèces réactives de l'oxygène

➤ Sources exogènes

Les radiations X ou gamma peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements UV sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des photosensibilisants. Une large variété de xenobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ROS qui se forment comme un des produits de leur métabolisme (**Valko *et al.*, 2007**).

➤ Sources endogènes

L'une des sources majeurs des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial (**Marfak, 2003**).



Au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre d'ERO. De plus, il y a production massive d'anion super oxyde par le mécanisme leucocytaire. Les NO synthétases, à l'origine du radical NO•, peuvent, sous certaines conditions, produire également des anions superoxydes (**Delattre *et al.*, 2005**).

1.3. Pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**Bidie *et al.*, 2011**).

De nombreuses pathologies, impliquant le stress oxydant dans leur développement, ont été recensées. Outre les maladies cardio-vasculaires (peroxydation des lipides) et le cancer (oxydation de l'ADN), c'est certainement dans le cadre du diabète (obésité, syndrome métabolique) que des avancées spectaculaires ont été réalisées au cours des dernières années (**Haleng *et al.*, 2007**) (figure 10).

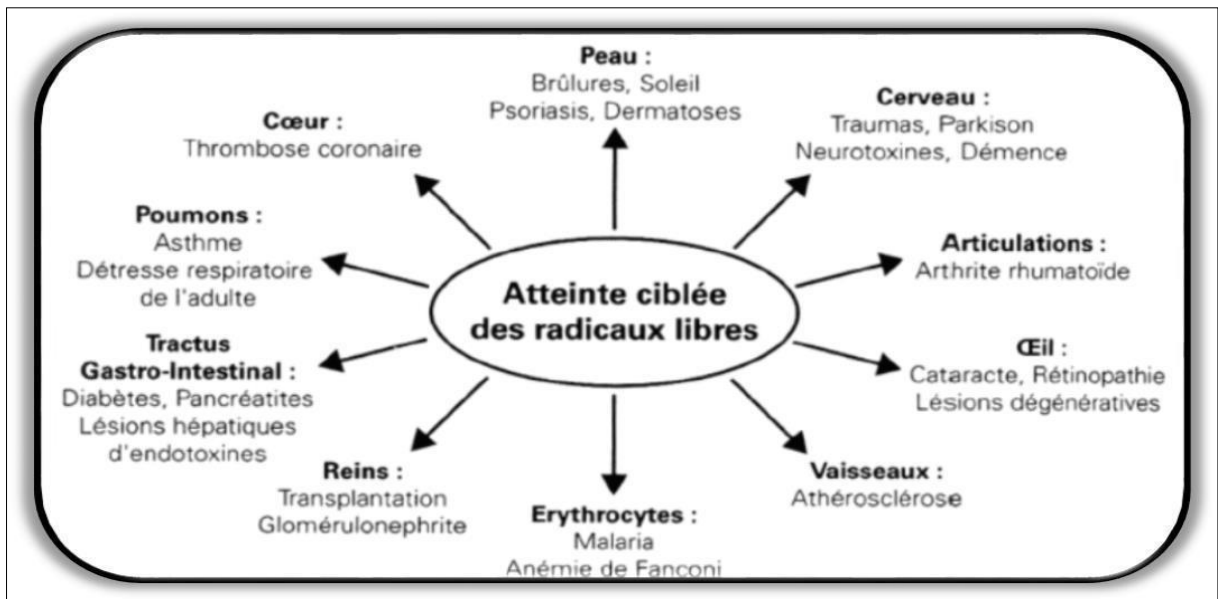


Figure 10 : Troubles liés au stress oxydatif (Favier, 2003).

1.4. Antioxydants

1.4.1. Définition

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

1.4.2. Principaux antioxydants

1.4.2.1. Antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), conduisant à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Manallah, 2012) (figure 11).

- La superoxyde dismutase (SOD) : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon

Chapitre III : Les activités biologiques

la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Ghalem, 2014).

- La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie (Soulère *et al.*, 2002).



- Les glutathions peroxydases et réductases : Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Ghalem, 2014).

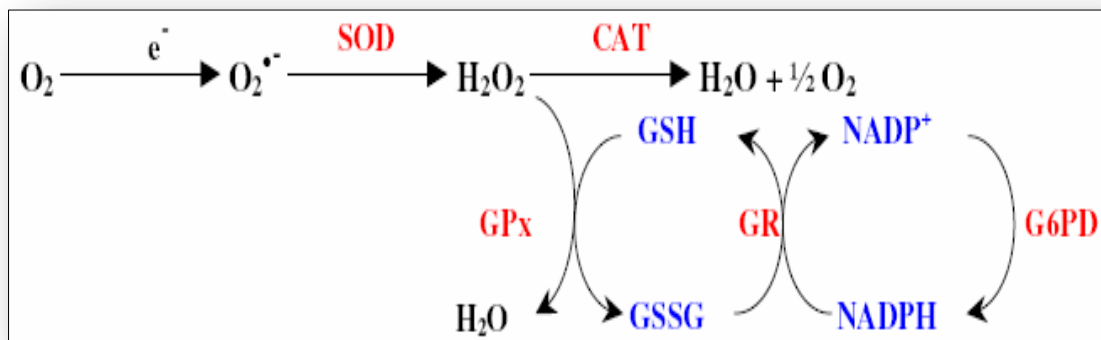


Figure 11 : Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène (Ghalem, 2014).

1.4.2.2. Antioxydants non enzymatiques

➤ Vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA ($\text{HO}\cdot$ ou $\text{O}_2^{\bullet-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en

Chapitre III : Les activités biologiques

régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques.

➤ Polyphénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (**Haleng et al., 2007**).

➤ β carotène

Il est présent dans les légumes vertes, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les pinards, la papaye (**Mogode, 2005**). Les caroténoïdes, pigments rouges (lycopène de la tomate), oranges (β -carotène des carottes) ou jaunes (lutéine et zéaxanthine du maïs) d'origine végétale, sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singlet et jouent le rôle de boucliers contre la photo-initiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le β -carotène (provitamine A), diffusant mieux que les tocophérols dans les lipides, protège les graisses profondes (**Hennebelle, 2006**).

➤ Vitamine E

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO• (**Yoshida et al., 1993**).

2. Activité anti-inflammatoire

2.1. Inflammation

L'inflammation est un processus complexe faisant intervenir de multiples partenaires cellulaires. Cette réaction est physiologique et paraît essentielle dans l'élaboration des défenses immunitaires. Cependant, dans certains cas, elle se développe de manière exagérée, dure trop longtemps et devient délétère, sans raison apparente (**Monassier, 2005**).

Les cellules inflammatoires peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de nitrogène qui peuvent déclencher des réactions d'oxydation toxiques, conduisant à des

Chapitre III : Les activités biologiques

lésions tissulaires. L'inflammation peut être aiguë ou chronique. La première est une réponse immédiate de courte durée, habituellement, elle disparaît spontanément ou avec un traitement. Toutefois, elle peut évoluer vers une inflammation chronique à laquelle plusieurs maladies peuvent être liées (Kada, 2018).

2.1.1. Inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement,

mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Rousselet *et al.*, 2005). L'inflammation aiguë renferme trois phases :

➤ Phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse,

expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux.

Cette

constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée (Charles *et al.*, 2010).

➤ Phase cellulaire

La phase cellulaire correspond à l'afflux extravasculaire des leucocytes. Elle débute avec les polynucléaires neutrophiles, suivis dans un second temps par les cellules mononucléées, principalement les macrophages. La phagocytose et la libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires permettent la destruction de l'agent pathogène. Les macrophages permettent le nettoyage du foyer inflammatoire et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires (Abbal *et al.*, 2019).

➤ Phase de résolution

La phase de résolution, ou de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et

Chapitre III : Les activités biologiques

des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaires. Le retour à l'état physiologique consiste dans un premier temps à la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes (Weill et Batteux, 2003).

2.1.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation qui persiste dans le temps (plusieurs semaines, mois ou années). Ce terme regroupe un ensemble d'aspects morphologiques différents résultants de stimuli et de mécanismes variés (Nathalie et Bedossa, 2015).

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse

inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causée par l'engagement persistant des réponses de

l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la béryllose, et dans l'inflammation granulomateuse. Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires (Hani et Abdessalam, 2015).

2.2. Les médiateurs chimiques de l'inflammation

De multiples médiateurs chimiques, provenant du plasma ou des cellules, déclenchent l'inflammation et interviennent à tous les stades de l'inflammation. Les médiateurs d'origine plasmatique sont présents dans le plasma sous la forme de précurseurs qui doivent être activés (généralement par protéolyse) pour acquérir leurs propriétés. Les médiateurs d'origine cellulaire sont soit préformés et séquestrés dans des granules intracellulaires (et le stimulus inflammatoire entraîne la dégranulation) soit synthétisés de novo en réponse à un stimulus (Vinay *et al.*, 2007).

La plupart des médiateurs exercent leur action en se fixant à des récepteurs membranaires sur des cellules cibles. Ils provoquent des réactions en cascade : un médiateur peut déclencher la libération d'autres médiateurs par les cellules cibles et qui agissant de façon synergique ou antagoniste. L'activation de divers médiateurs peut se

Chapitre III : Les activités biologiques

répéter au cours du processus inflammatoire, entraînant des mécanismes d'amplification ou de résistance à l'action médiatrice initiale. Dans les conditions physiologiques, la régulation du déroulement de la réaction inflammatoire implique que les médiateurs soient rapidement inactivés par un ou plusieurs inhibiteurs ou détruits (Weill *et al.*, 2003).

2.3. Anti-inflammatoires

2.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement prescrits en raison de leur efficacité dans la prise en charge de la douleur, de la fièvre, de l'inflammation et des troubles rhumatismaux. Cependant, leur utilisation thérapeutique à long cours est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (Ouédraogo *et al.*, 2012).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, malgré la diversité de leur nature chimique, ont tous en commun le fait de contrer les manifestations de la réaction inflammatoire. À cette action, ils associent un effet antalgique, antipyrétique et antiagrégant plaquettaire. Leurs effets secondaires sont susceptibles de toucher tous les appareils de l'organisme. La plupart se montrent bénins, mais certains peuvent avoir des conséquences graves (Pillon, 2014).

2.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol) ou hémi-synthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et immuno-suppressives (Dangoumau, 2006).

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 antiinflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxycgénase ainsi que par d'autres mécanismes (Ferhat et Belhadi, 2016).

3. Activité antibactérienne

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec anti : contre, mikros: petit et bios : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes (Muylaert et Mainil, 2012).

Les bactéries sont des micro-organismes classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé, 2005).

3.1. Les antibiotiques

L'adjectif antibiotique (du grec anti : contre, bioti-kos : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes (Muylaert et Mainil, 2012).

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique (Lavigne, 2007), capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action (Perronne, 1999).

3.2. Classification et mécanisme d'action des antibiotiques

Il existe sept classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêta lactamines : pénicilline et céphalosporines ; Aminosides: streptomycine, gentamycine ; Phénicolés: chloramphénicol et thiamphénicol ; Cyclines: tétracyclines, doxycycline ; Macrolides et apparentés: érythromycine, oléandomycine (Cohen et Jacquot, 2001) (tableau 03).

Chapitre III : Les activités biologiques

Tableau 03 : Les principales familles chimiques des antibiotiques et leurs modes d'action.

Famille	Antibiotiques	Mode d'action
Bêta lactamines	-pénicilline -céphalosporines	Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique. L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes rondes ou filamenteuses qui aboutissent à la lyse bactérienne.
Aminosides	-streptomycine, -gentamycine	Ils se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome ou ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines (Singleton, 2005) .
Phénicolés	-chloramphénicol -thiamphénicol	Inhibition de la peptidyl-transférase, en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien (Wareham et Wilson, 2002) .
Cyclines	-tétracyclines -doxycycline	Ils agissent au niveau de la sous unité 30S du ribosome en inhibant la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique, en empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt (Bryskier, 1999) .
Macrolides et apparentés	-érythromycine, oléandomycine	Ils agissent au niveau de la S/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation (Yala et al., 2001) (figure 12).

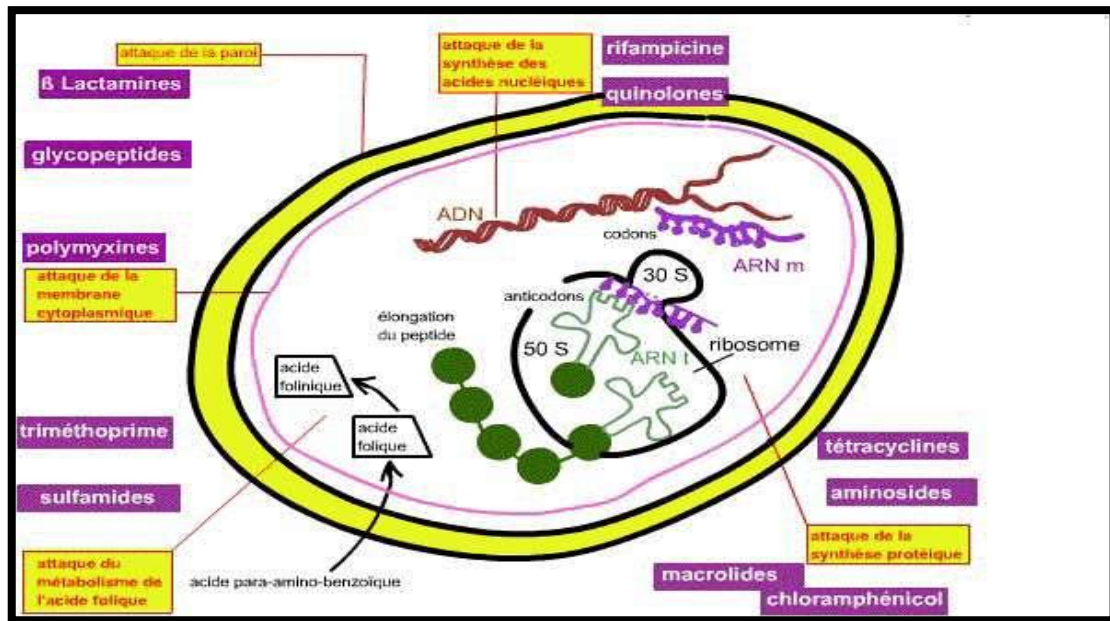


Figure 12 : Différents modes d'action des antibiotiques (Lavigne, 2007).

3.3. Résistance des aux bactéries antibiotiques

Le recours à des médicaments antimicrobiens comme les antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses constitue un point marquant dans l'histoire de la médecine. Mais en raison de l'usage généralisé de ces types de médicaments, plusieurs souches de grandes familles de bactéries pathogènes sont devenues résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Belkhiri, 2009). De fait, la prolifération de ces microorganismes résistants pose un grave problème de santé à l'échelle mondiale, un problème dont les conséquences pourraient bien s'avérer irréversibles (Mehrotra et al., 2003).

a. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) (Lozniewski et al., 2010).

b. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une

Chapitre III : Les activités biologiques

concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce, et elle a été observée dès le début de l'antibiothérapie (Lozniewski *et al.*, 2010).

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie à l'université Abbes Laghrour - Khenchela- pendant le mois de mai 2019. Elle comporte deux parties :

1ère partie :

- Préparation de deux extraits, aqueux et méthanolique de la partie aérienne de la plante médicinale *Ephedra alata alenda*.
- Analyse phytochimique qualitative et dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- Séparation et l'identification des différents métabolites par la chromatographie sur couche mince (CCM).

2ème partie :

- Etude de quelques activités biologiques de ces extraits : l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et l'activité anti-inflammatoire *in vitro*.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de deux extraits, méthanolique (EMEA) et aqueux (EAEA) de la partie aérienne de la plante médicinale *Ephedra alata alenda* récoltée dans la région de Checher wilaya de Khenchela- Algérie pendant le mois de décembre 2018 et identifiée par BELHOUCHE Nassima docteur chercheuse au CNRPA. La plante a été ensuite séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Après son séchage, elle a été broyée à l'aide d'un mortier pour l'obtention d'une poudre, cette dernière est conservée dans un flacon en verre bien hermétique jusqu'à son utilisation.

1.1.2. Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien de EMEA et EAEA *in vitro*, trois souches bactériennes ont été utilisés (Tableau 4) :

Tableau 04 : Souches utilisées dans l'activité antibactériennes

Microorganisme	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	Laboratoire pédagogique de l'université Abbes Laghrour-Khenchela-
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positif	ATCC 7644	
<i>Echerichia coli</i>	Négatif	ATCC 25922	

1.2. Réactifs chimiques et équipements

Le tableau (05) représente les réactifs chimiques et les instrumentations (Annexes) utilisés :

Tableau 05 : Réactifs chimiques et instrumentations

Réactifs chimiques et solvants	Appareillage utilisé
-Méthanol	-Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005).
-Eau distillé	-Chambre d'observation UV « 264/365 nm »
-FeCl ₃	(VILBER LOURMAT)
-HCl	-Bain Marie (nive bath, MEMMERT)
- NH ₄ OH	- Etuve universelle de 5 à 220°C avec
-NaOH	ventilation (MEMMERT)
-Réactif de Mayer et Wagner	-Agitateur magnétique (SCIOLOGEX)
-Acide sulfurique	-Vortex (VELP)
-Anhydride acétique	-Balance analytique (OHAUS)
-Fehling (liqueur de fehling A et B)	-Balance (KERN PCB)
-Réactif Folin-Ciocalteu,	-Réfrigérateurs (Liebherr)
-AlCl ₃	- Plaque chauffante (LabTech)
-Na ₂ CO ₃	-Evaporateur
-n-butanol	-Autoclave (Raypa) et pH mètre (Hanna
-Acétate d'éthyle	instruments)
-Acide formique	
-Acétone	
-Acide acétique glacial	
-Chloroforme	
- Ammoniaque 10%	
-2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH)	
-Sérum bovine albumine (BSA) 0.5%,	
-Diclofénac	
-Diméthylsulfoxyde (DMSO)	

2. Méthodes

Les différentes étapes réalisées dans cette étude sont : préparation de l'EMEA et EAEA, étude qualitative par un screening phytochimique et une chromatographie sur couche mince, étude quantitative par le dosage des flavonoïdes, des polyphénols, puis l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne d'EMEA et d'EAEA.

2.1. Préparation de deux extraits

Différentes méthodes d'extractions peuvent être adaptées à l'extraction des composés naturels. Parmi celles-ci nous avons choisi la macération une technique simple et facile à mettre en œuvre.

Extraction solide-liquide (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 (**Chemat, 2014**). La macération est une méthode qui consiste à laisser la poudre de plante en contact prolongé avec un solvant (**Lagnika, 2005**). Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires, généralement les solvants les plus utilisés sont l'éthanol, méthanol ou même l'eau pour l'extraction des composés polaires et le dichlorométhane pour l'extraction des composés non polaires (**Rispall et al., 2005**).

2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

La préparation d'extrait méthanolique est réalisée par épuisement à froid de 20g de la poudre végétale dans 100 ml d'une solution hydro-alcoolique; méthanol/eau distillée (8:2 V/V) pendant 24h avec agitation continue à température ambiante. Après filtration à l'aide d'un papier filtre; le résidu est macéré deux autres fois avec la même solution et le même volume. Les extraits obtenus sont soumis à une évaporation de solvant à sec sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec obtenu est ensuite stocké à une température de +4°C (figure 13).

2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux

La préparation de cet extrait a été faite selon la méthode par (**Guédé-Guina *et al.*, 1996**), qui consiste à macérer 80 g de poudre végétale dans 2L d'eau distillée. Le macérât est homogénéisé pendant 24 heures à l'aide d'un agitateur magnétique de type IKAMAGRCT. L'homogénat est filtré successivement 2 fois sur du coton hydrophile puis une fois sur du papier filtre 3 mm. Le filtrât obtenu est évaporé à l'aide d'une étuve de type Med Center Venticell, à 50°C pour donner une poudre noire qui constitue l'extrait total aqueux (ETA) (figure 13).

Le rendement des extraits a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = m_0/m_1 \times 100$$

*m*₀ : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;

*m*₁ : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

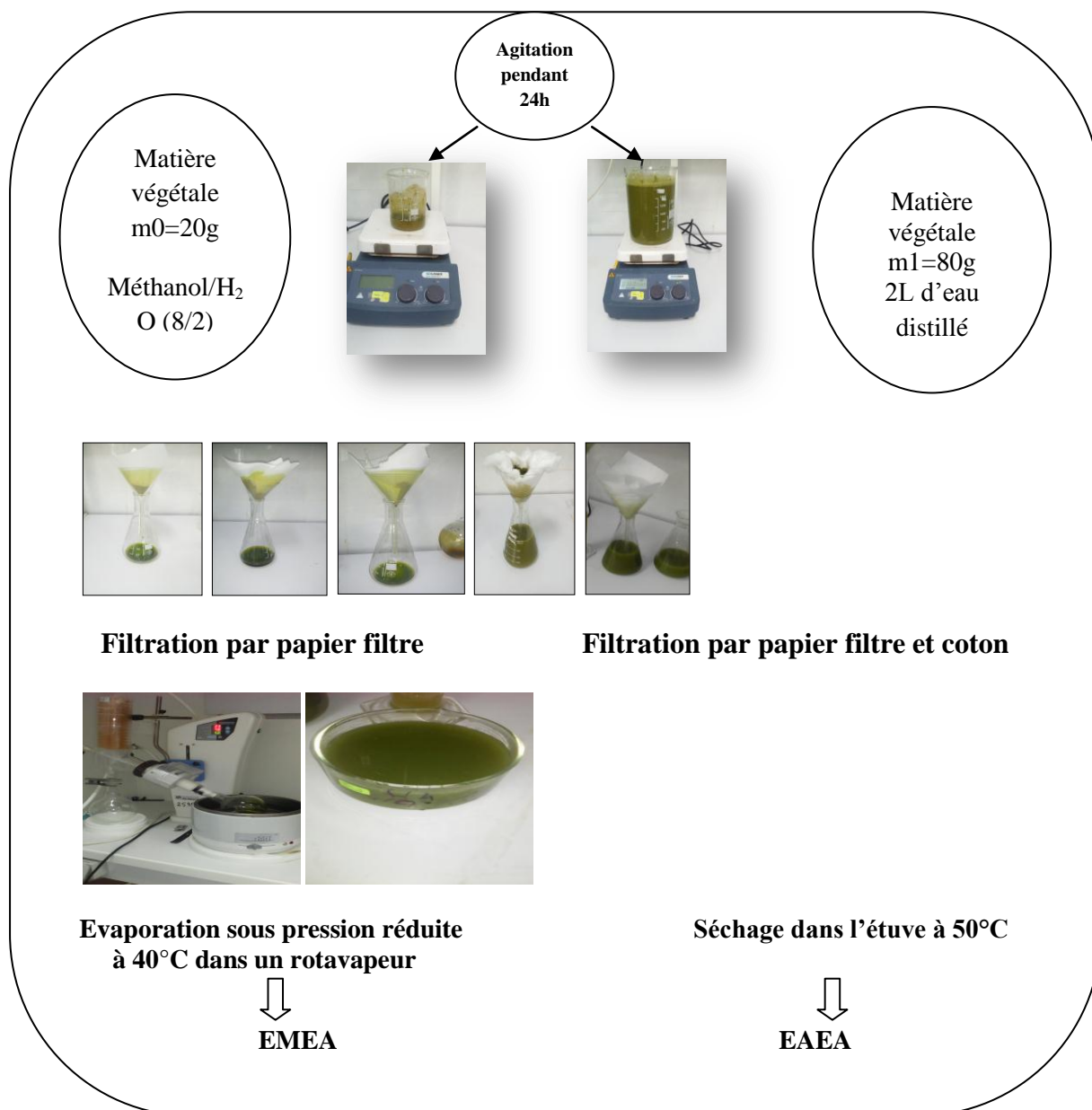


Figure 13 : Les étapes de la préparation EMEA et EAEA.

2.2. Tests phytochimiques

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les extraits préparés par des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous lumière ultra- violette. Ces tests ont été répétés trois fois ont été réalisés selon les techniques décrites par : Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999.

➤ **Tanins**

Dans un tube à essai, nous avons introduit 2 mL de l'extrait à analyser avec 0,5 mL d'une solution aqueuse de chlorure de fer (FeCl_3) à 1%. La présence des tanins est dévoilée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

➤ **Flavonoïdes : test de Shinoda**

Macérer 10 g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout du NH_4OH . Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

➤ **Coumarines : Fluorescence UV**

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL d'extrait avec 0,5 mL de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 10%. Un deuxième tube non traité par NH_4OH a été préparé pour servir comme témoin. Après dépôt d'une goutte sur un papier filtre, l'apparition d'une fluorescence intense, sous lumière ultra-violet (366 nm) indique la présence des coumarines.

➤ **Quinones libres**

Dans un tube à essai, nous avons ajouté 5 mL de l'extrait à 0,5 mL de soude (NaOH) à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet révèle la présence des quinones libres.

➤ **Anthraquinones**

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 mL de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH 10%) avec 5 mL d'extrait. Après agitation, la présence des anthraquinones est indiquée par une coloration violette.

➤ **Alcaloïdes**

La mise en évidence des alcaloïdes a été effectuée par une réaction de précipitation en présence des réactifs des alcaloïdes (Mayer et Wagner). À 1 mL d'extrait, nous avons ajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl 1%), puis la solution est divisée en deux volumes égaux. Nous avons introduit 0.5 mL de réactif de Mayer dans le premier tube, et 0.5 mL de réactif de Wagner dans le deuxième tube. La formation d'un précipité blanc ou brun respectivement dans les deux tubes révèle la présence des alcaloïdes.

➤ **Stérols et triterpènes : Test de Liebermann-Burchard**

À 5 ml d'extrait, nous avons ajouté 0,5 mL d'anhydride acétique et 0,5 mL d'acide sulfurique.

Après incubation de 15 min, l'apparition d'une couleur mauve, verte ou violette indique un test positif.

➤ **Terpénoïdes : Test de Salkowski**

Dans un tube à essai nous avons introduit 5 mL d'extrait, 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

➤ **Saponosides: Test de mousse**

Dans un tube à essai, 10 mL d'extrait ont été agité énergétiquement pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides.

➤ **Composés réducteurs**

Un volume de 1 mL d'extrait a été mélangé avec 2 mL de la solution de Fehling (1 mL de la liqueur de fehling A et 1 mL de la liqueur de fehling B), puis incubé au bain marie bouillant pendant 8 minutes. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge-brique.

2.3. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse de l'extrait brut par chromatographie sur couche mince (CCM, TLC en anglais) nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les différentes classes de composés contenus dans les deux extraits méthanolique et aqueux (**Braithwaite et Smith, 1999**).

a. Principe

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des

Chapitre I : Matériel et méthodes

composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile (**Braithwaite et Smith, 1999**).

b. Mode opératoire

Le développement de la plaque s'effectue dans la cuve en verre contenant l'éluant approprié. Nous utilisons des plaques de Silice prêtes à l'emploi à support en aluminium. Les témoins et les échantillons sont déposés sous un faible volume (2- 4 μ l).

Le tableau 6 renferme les différents systèmes des solvants (éluant) utilisé lors de l'analyse de CCM, notons que tous ces systèmes ont été rencontrés dans la littérature, et chacun est utilisé pour la séparation d'un type spécifique de molécules.

Tableau 06 : Différents systèmes de solvants utilisés pour la présente étude.

Systèmes	Solvant
Système 1	éthyle acétate/acide formique/AAG / eau (25 : 3 : 3 : 7 v/v)
Système 2	n-butanol/eau/acide acétique glacial (4 : 5 : 1 v/v)
Système 3	Acétone /eau (1 :1 v/v)
Système 4	Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau (16 : 8 : 3 : 2 v/v)
Système 5	Chloroforme/acétone/ammoniaque 10% (16 : 8 : 3 v/v)
Système 6	Chloroforme/Acétate d'éthyle/acide formique (13 :10 :3 v/v)

On place la plaque en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre ; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par appositions successives au moyen d'une micropipette en verre et éventuellement séché par ventilation sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le déplacement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire.

c. Révélation des plaques sous UV

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées avant et après l'observation sous l'UV.

d. Calcul du rapport frontal (Rf)

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son Rf (*Rate factor* ou Rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1.

$$Rf = \frac{\text{La distance parcourue par le constituant}}{\text{La distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

2.4. Dosage des polyphénols totaux

a. Principe

La méthode utilisée est celle utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes de l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène -tungstène de couleur bleu. La coloration produite absorbe à un maximum compris entre 725 et 760 nm, et est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Boizot et charpentier, 2006; Vermerris et Nicholson, 2006**).

b. Mode opératoire

Ce dosage a été réalisé selon la méthode décrite par Wong C *et al.* (2006) :(figure 14).

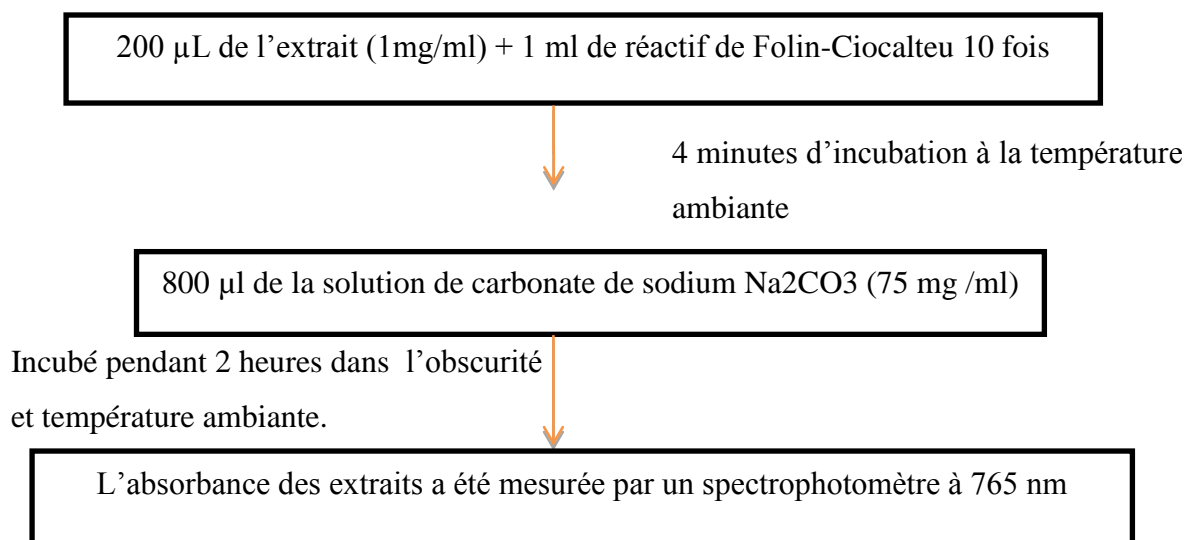


Figure 14 : Mode opératoire de dosage des polyphénols (Wong C *et al.*, 2006).

c. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon : l'acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG /mg}$).

2.5. Dosage des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes d'EMEA et EAEA est élaborée par la méthode colorimétrique de (Dejdanneet *al.*, 2006).

a. Principe

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximal et la longueur d'onde à 448 nm, contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et ne contenant pas l'extrait d'*Ephedra alata alenda*.

b. Mode opératoire

Le protocole de dosage est présenté dans la figure 15 :

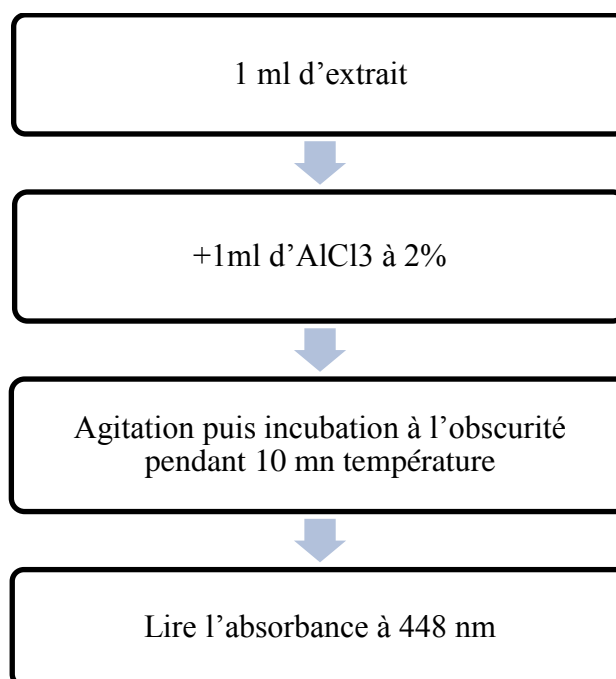


Figure 15 : Mode opératoire de dosage des flavonoïdes (Dejdanne *et al.*, 2006).

c. Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

2.6. Evaluation de l'activité antioxydante (Test de piégeage du radical libre DPPH)

a. Principe

Le radical 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse (Bozinet *et al.*, 2008).

b. Mode opératoire

Le DPPH \cdot (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH \cdot , qui est proportionnel au pouvoir

anti radicalaire de l'échantillon (Figure 12). L'activité anti-radicalaire des différents extraits EMEA et EA EA évaluée *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela l'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (**Benaribaet al., 2013**) avec quelques modifications. Cent microlitres (100 µl) de chaque dilution de l'extrait ont été mélangés avec 900 µl de la solution de méthanol de DPPH• à 0.004 %. Après 30 min d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le contrôle négatif est composé de 100 µl de méthanol et de 900 µl de la solution de DPPH•.

c. Expression des résultats

$$I \% = ((Abs_{Blanc} - Abs_{test}) / Abs_{Blanc}) \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

Abs_{Blanc}: absorbance du control négatif lue à 517 nm

Abs_{test}: absorbance de l'échantillon lue à 517 nm

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC50) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

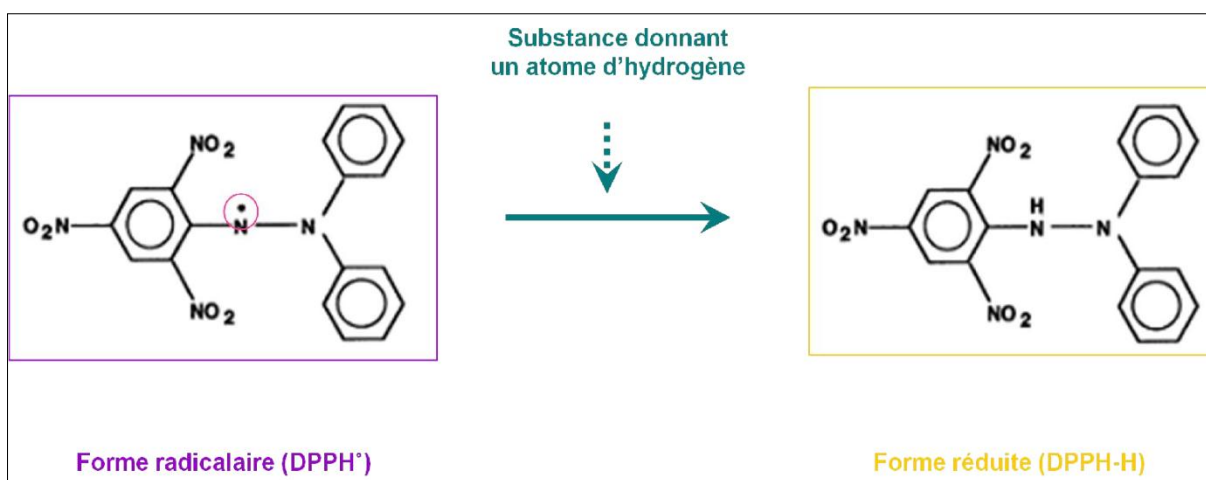


Figure 16 : Réduction du DPPH[•] par un antioxydant (Molyneux, 2004).

2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines, dans lequel les protéines perdent leur structure, est l'une des causes de l'inflammation et conduit à divers maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti inflammatoire (Habibur *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2016). L'effet inhibiteur *in vitro* des différents extraits de la plante de *Ephedra alata alenda* a été déterminé en utilisant une méthode de dénaturation protéique décrite par Habibur *et al.* (2012) avec certaines modifications, l'activité a été effectuée avec différents dilutions des extraits aqueux et méthanolique et le Diclofénac de sodium utilisé comme standard.

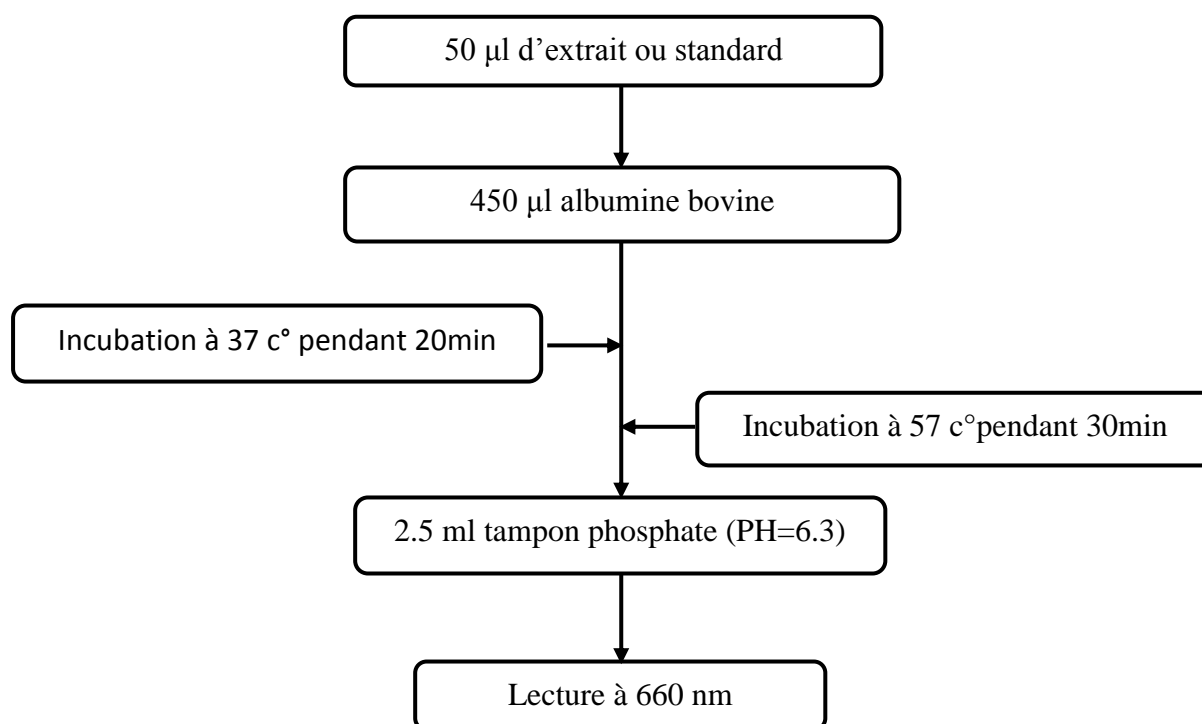


Figure 17 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (**Habibur *et al.*, 2012**).

➤ Expression des résultats

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs T}}{\text{Abs C}} \times 100$$

Abs C : absorbance de control.

Abs T : absorbance de test.

2.8. Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans cette partie, nous recherchons des composés antibactériens synthétisés par la plante médicinale *Ephedra alata alenda* connue pour leurs propriétés thérapeutiques. Nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disques décrite par **Bauer *et al.* (1966)**.

2.8.1. Méthode d'évaluation (méthodes des disques)

- **Préparation pré culture**

- a. Les milieux de culture**

Les milieux de culture (Annexes) utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries.

- b. Stérilisation des matériels**

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes.

- **Préparation de la suspension des souches de référence**

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 Mc Farland (Annexes) et été préparées, pour chaque microorganisme, dans 5 ml d'eau distillée stérile.

- **Ensemencement**

L'ensemencement a été faite sur un milieu Géloses Muller Hinton (MH), coulées en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (Les géloses sont séchées avant emploi), les étapes de l'ensemencement sont résumées comme suivant :

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le 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, en stries serrées ;

Chapitre I : Matériel et méthodes

- ✓ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte 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 ;
- ✓ Une série de dilutions (1/1, 1/2, 1/4 et 1/8) de l'extrait méthanolique (MeOH) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée à partir d'une solution mère 200 mg d'E-MOH préalablement dissouts dans un ml DMSO.

• Application des disques

L'opération d'application des disques au niveau de boîtes 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 boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.

La figure 18 montre les différentes étapes réalisées :

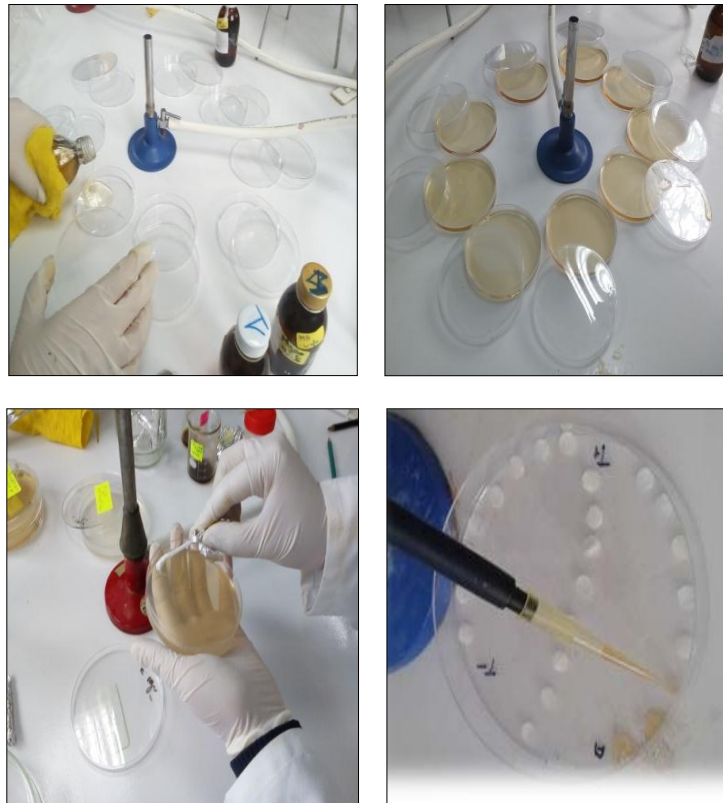


Figure 18 : Différentes étapes de l'activité antibactérienne.

- **Lecture**

La lecture se fait après 18 à 24 h d'incubation à 37° C, l'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm incluant le diamètre du disque (figure 19).

Cette sensibilité est classée selon **Ponce *et al.*, (2003)** 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.

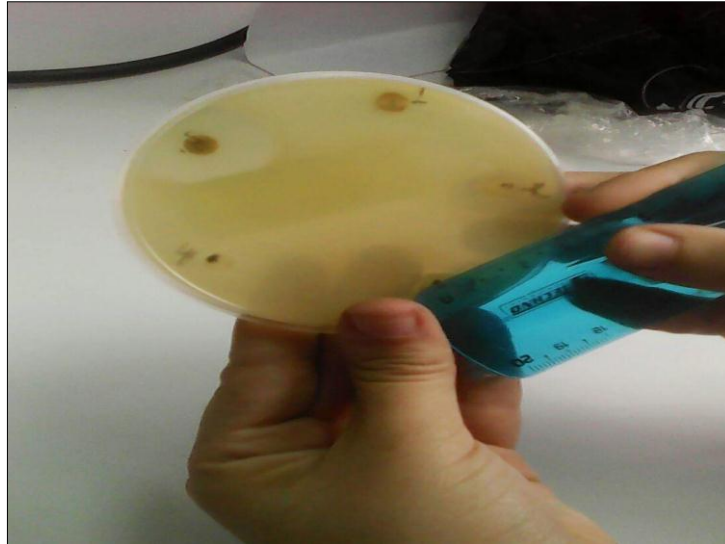


Figure 19 : Mesure de diamètres des zones d'inhibition.

II.9. Expressions des résultats

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD). L'analyse des données a été effectuée par application du test t de Student, qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux : entre l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 13.31). Les différences sont considérées comme :

- ✓ Significatives : lorsque ($P \leq 0,05$).
- ✓ Hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,01$).
- ✓ Très hautement significatives : lorsque ($P \leq 0,001$).

Résultats et discussion

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Etude phytochimique

1.1. Rendements des extraits

Deux extraits méthanolique et aqueux ont été préparés à partir de la poudre de la plante *Ephedra alata alenda* ; EMEA et EAEA. 24heures de macération d'*Ephedra alata alenda* a donné le rendement dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Le rendement des extraits d'*Ephedra alata alenda*.

Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
20	EMEA	2.19	10.95%
80	EAEA	4	5%

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'un histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des différents extraits de la plante :

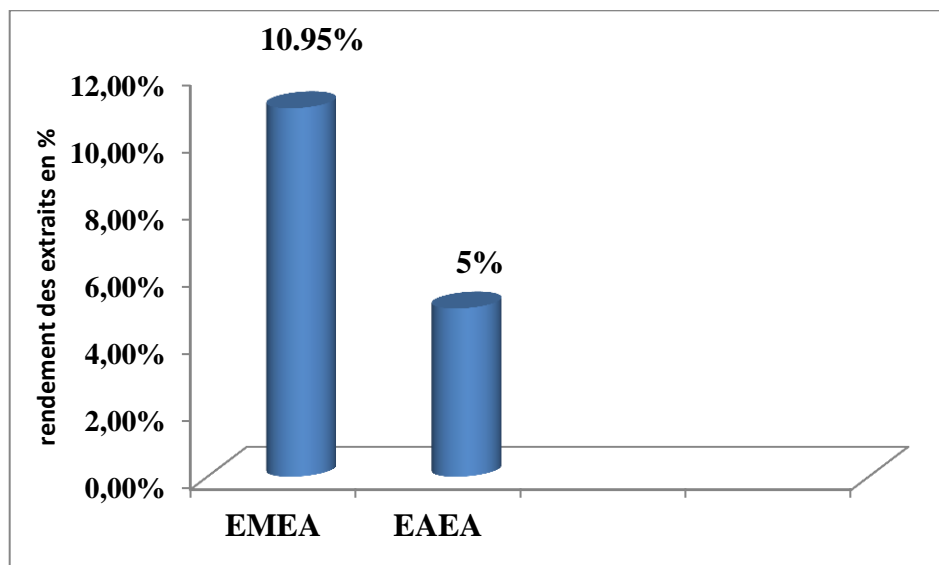


Figure 20 : Rendements des extraits d'*Ephedra alata alenda*.

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'EMEA représente le rendement le plus élevé (10.95 %), par rapport au rendement de

Chapitre II : Résultats et discussion

l'EAEA (5%). Car le rendement n'est pas relatif; il dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale (Lee, 2003).

En outre, le rendement n'est pas relatif ; il varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Mohammedi, 2006).

1.2. Tests phytochimiques

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique de plante sélectionnée pour cette étude a permis de mettre en évidence la présence de quelques constituants chimiques. Les résultats de l'analyse phytochimique des deux extraits étudiés sont présentés dans le tableau 8 et les figures 21 et 22.

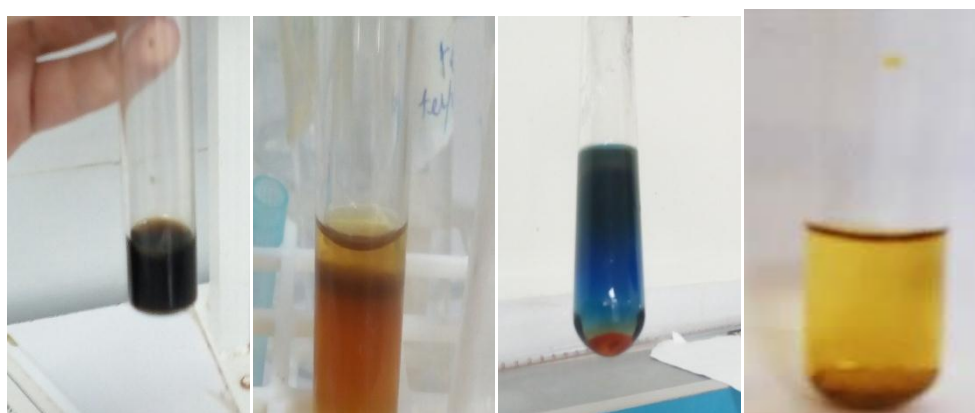
Tableau 08 : Résultats des tests phytochimiques sur EMEA et EAEA.

Métabolites secondaires	Les extraits		Observation
	EMEA	EAEA	
Flavonoïdes	+++	+++	l'apparition d'une couleur jaune
Tanins	+++	+	coloration verdâtre ou bleu-noirâtre
Coumarines	-	-	pas d'une fluorescence intense
Quinones libre	+++	+++	L'apparition d'une couleur qui vire au jaune
Anthraquinones	-	-	L'absence d'une coloration violette
Stérols et triterpènes	-	-	Absence d'une couleur mauve, verte ou violette
Terpénoïdes	-	-	Absence de formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase
Saponosides	-	-	Absence d'une mousse
Composés	+	+	l'apparition d'un précipité rouge-

Chapitre II : Résultats et discussion

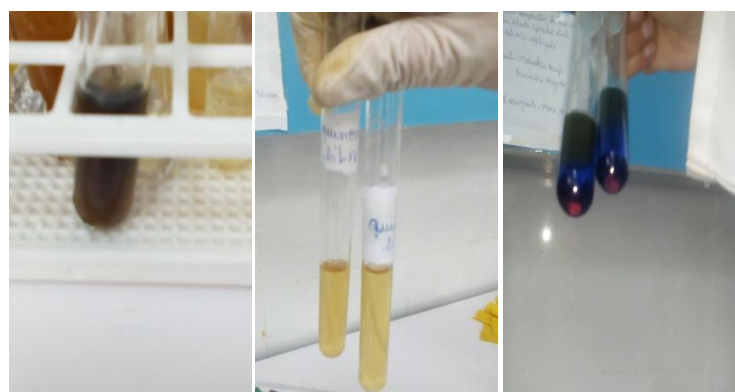
réducteurs	brique		
Alcaloïdes	++	-	<u>Réactif de Mayer</u> : l'absence de formation d'un précipité blanc <u>Réactif de Wagner</u> : La formation d'un précipité brun

Les résultats sont interprétés comme suit : (-) : test négatif ; (+) : test faiblement positif ; (++) : test positif ; (+++) : test fortement positif.



Tannins Flavonoïdes Composés réducteurs Alcaloïdes

Figure 21 : Quelques résultats des tests phytochimiques sur l'EMEA.



Tannins Quinone libres Composés réducteurs

Figure 22 : Quelques Résultats des tests phytochimiques sur l'EAEA.

Chapitre II : Résultats et discussion

L'étude phytochimique des extraits méthanolique et aqueux a montré une forte présence des flavonoïdes et des quinones libre.

Les tanins sont présents en quantités plus élevées dans l'extrait méthanolique par contre dans l'extrait aqueux sont présents en quantité faibles ; selon les travaux de **Jaradat et al** à Palestine (2015) les tanins sont absents dans les deux l'extraits ce qui explique que :

La différence de la composition chimique des mêmes plantes dans une autre région peut être expliquée par l'influence des facteurs sur la présence, l'absence et la répartition des différents principes actifs comme, le climat, la nature du sol, eau, altitude ...etc (**Boughrara, 2016**).

Les travaux de **Boulberhane et Nabti (2017)** ont démontré que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

Cette étude a démontré qu'il y'a présence aussi de composés réducteurs mais en quantité faible dans les deux extraits.

Les alcaloïdes sont présents en quantités moyennes dans l'extrait méthanolique et absents dans l'extrait aqueux. Les alcaloïdes sont dotés de propriétés pharmacologiques et toxicologiques marquées alors que les composés phénoliques présentent une large gamme d'activités biologique (**Bruneton, 2009; Ikan, 1991**).

Les analyses qualitatives indiquent l'absence des Anthraquinones, stérols et triterpènes, Terpénoïdes, saponosides dans les deux extraits.

Selon les travaux de **Yahaioui (2018)** ; ont trouvés présence de Stérols dans la souche *E-alata -alanda* de la région de Siquis.

Donc La composition chimique d'un végétal varie selon les espèces et au sein même d'une espèce. Elle dépend des conditions de culture (qualité du sol, climat, irrigation, traitements phytosanitaires), et de la période de récolte (précoce ou tardive).

La sous espèce *E. alata* de la région de Khenchela présente une richesse en métabolites secondaires, la plupart de ces résultats sont conformes à ceux de **Kebili (2016)** qui a étudié la même espèce récoltée de la région d'Ouargla.

1.3. Résultats de l'étude qualitative par CCM

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu des métabolites dans les deux extraits EMEA et EAEA, on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Chapitre II : Résultats et discussion

L'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 23 et le tableau 9.

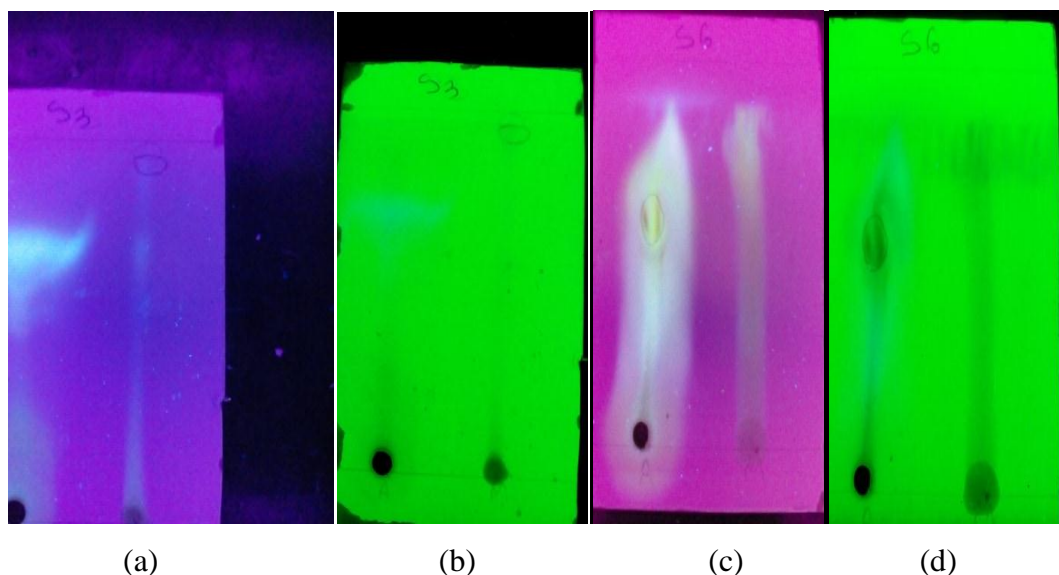


Figure 23 : Photos de Chromatogramme résultant de l'analyse de l'EMEA et EAEA par CCM sur gel de silice par le système de solvant 3: (a) à 365 nm et (b) à 254 nm et le système de solvant 6: (c) à 365 nm et (d) à 254 nm.

Tableau 09 : Résultats de la CCM de l'EMEA et EAEA par différents systèmes de solvant.

Extrait	Systèmes	Spots	Couleur	Couleur	Rf	Constituants possibles	Références
			sous UV 254 (nm)	sous UV 365 (nm)			
EMEA	1	1	Marron foncé	bleu	0.94	Tanins	(Belfekih <i>et al.</i> , 2017)
	2	2	Marron foncé	Jaune	0.21	Flavonoïdes	(Outtara <i>et al.</i> , 2016)
			Marron foncé	Jaune vert	0.33	Flavonoïdes	
3	1	Marron clair	bleu	0.97	Flavonoïdes		

Chapitre II : Résultats et discussion

EAEA	4	1	Marron clair	Jaune fluorescent	0.31	Coumarines	(Belfekih et al., 2017)
	5	/	/	/	/	/	
	6	1	Marron foncé	Jaune vert	0.70	Flavonoïdes	(Belfekih et al., 2017)

Le tableau 9 représente les Rf des différents composés apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV pour EMEA et EAEA. Un ensemble des spots a été obtenu par les différents systèmes solvants utilisés ; avec deux spots par le système 2 pour l'EMEA (n-butanol/eau/acide acétique glacial à 4 /5 /1), un seul composé a été ségrégué des dépôts de l'EMEA par les systèmes de solvants 1 (éthyle acétate/acide formique/AAG / eau à 25/3/3/7) et 3 (Acétone /eau à 1/1) et aucune séparation pour l'extrait aqueux pour les trois systèmes précédant, l'EAEA a donné un seul spot pour le système 4 (Chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau 16/8/3/2) et 6 (Chloroforme/Acétate d'éthyle/acide formique 13/10/3) et aucune séparation pour l'EMEA pour ces deux systèmes , alors que le cinquième système (Chloroforme/Acétate d'éthyle/acide formique 13/10/3) n'a séparer aucune composé pour les deux extraits.

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

D'après la littérature (mentionné dans le tableau), les couleurs des spots et leurs Rf nous ont permis de déduire que L'EMEA est majoritairement composé de flavonoïdes par rapport à l'EAEA.

1.4. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par milligramme de la matière végétale sèche (µg EAG/mg), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (figure 24).

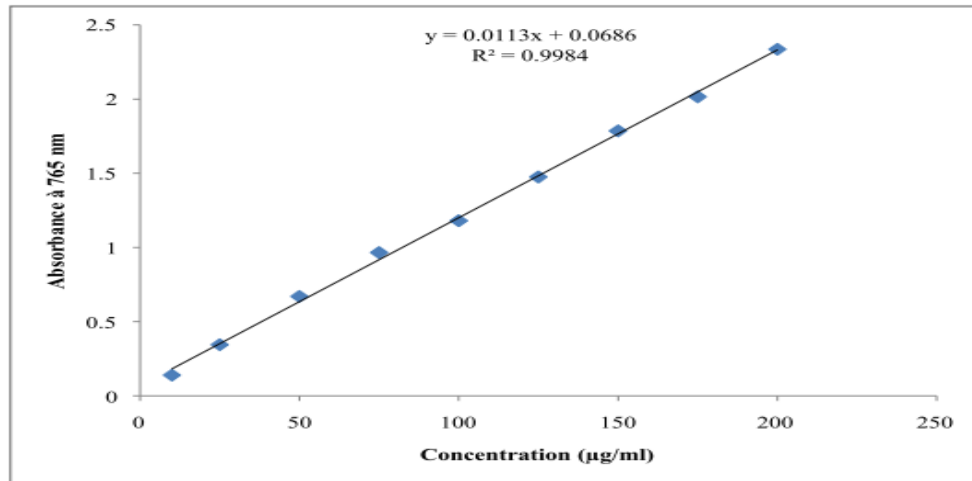


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

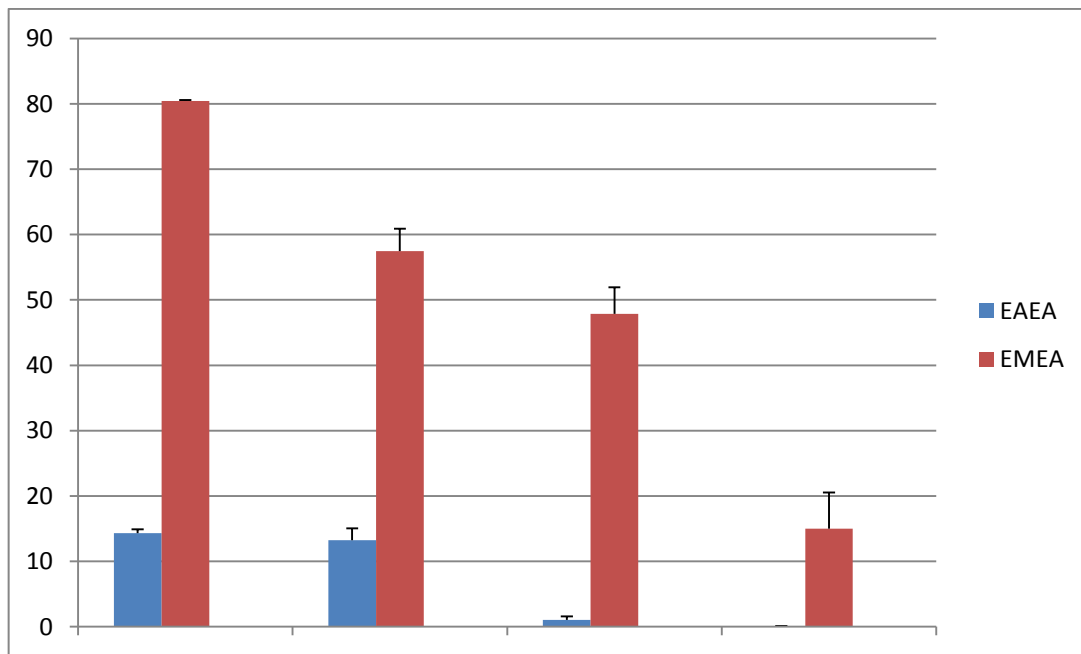


Figure 25 : Teneur en polyphénols totaux (µg EAG/mg E).

1.5. Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative de deux extraits, méthanolique et aqueux de la plante *Ephedra alata alenda* au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (Figure 26) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentration. Des mesures de densité optique pour chaque extrait réalisées à 448 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent

Chapitre II : Résultats et discussion

microgrammes de quercétine par milligramme d'extrait et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$.

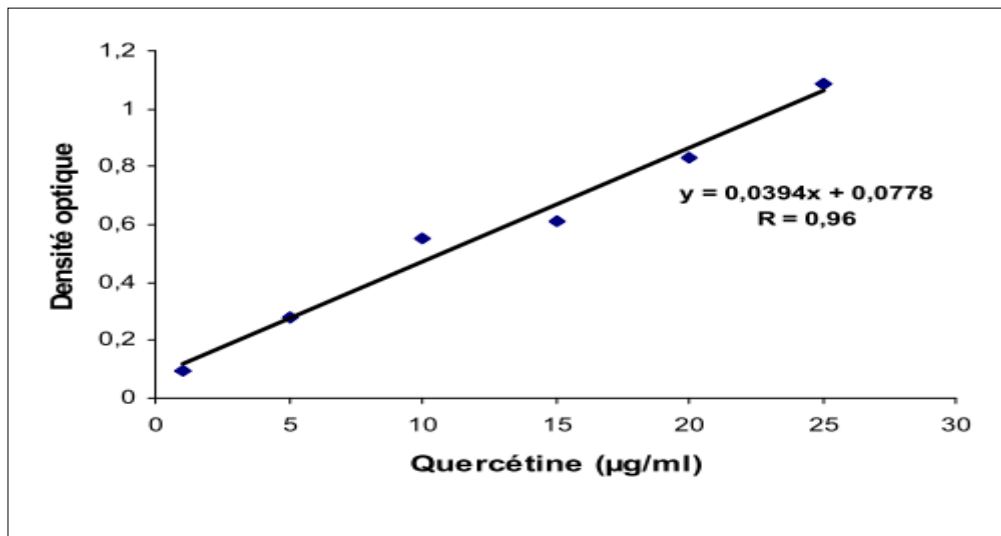


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

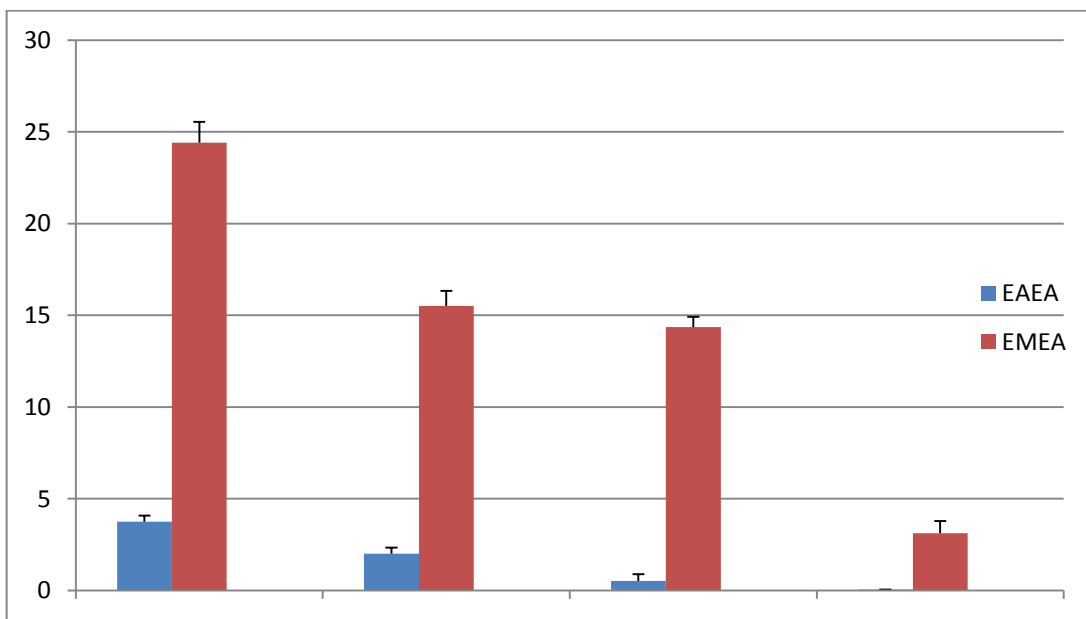


Figure 27 : Teneur en flavonoïdes totaux (µg EQ/mg E).

Chapitre II : Résultats et discussion

Tableau 10: Teneurs en composés phénoliques dans les extraits de *Ephedra alata alenda*

Extraits	Composés phénoliques	
	Polyphénols totaux (μg EAG/mg d'extrait)	Flavonoïdes totaux (μg EQ/mg d'extrait)
EMEA	50.18 \pm 3.29	14.35 \pm 0.79
EAEA	7.18 \pm 0.75	1.58 \pm 0.26

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Benhamou, 1998**).

D'après les résultats présentés les figures 25,27 et dans le tableau 10, on peut constater que l'extrait méthanolique possède la plus haute teneur en polyphénols et en flavonoides; que l'extrait aqueux avec un taux de 50.18 \pm 3.29 μg EAG /mg d'EMEA et 7.187.18 \pm 0.75 μg EAG /mg d'EAEA en polyphénol et 14.35 \pm 0.79 μg EQ /mg d'EMEA, 1.58 \pm 0.26 μg EQ /mg d'EAEA en flavonoïdes.

Le résultat du dosage des flavonoïdes dans notre étude est supérieure par rapport celle rapporté par **Jaradat (2015)**, ce qui explique que La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux. (**Lee et al., 2003**). Selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement, le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**).

Le groupe des composés phénoliques est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux et les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (**Poblocka-Olech et al., 2016**).

2. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait de la plante a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, dans le but de déterminer les concentrations d'inhibition du radical DPPH.

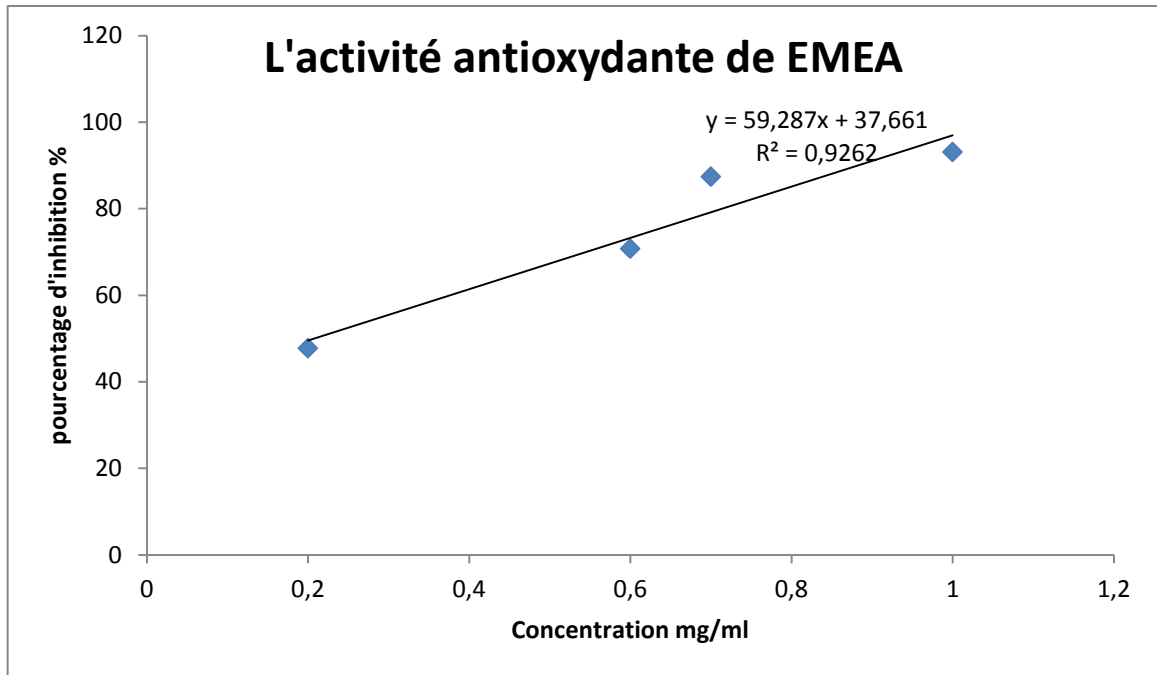


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes Concentrations de EMEA.

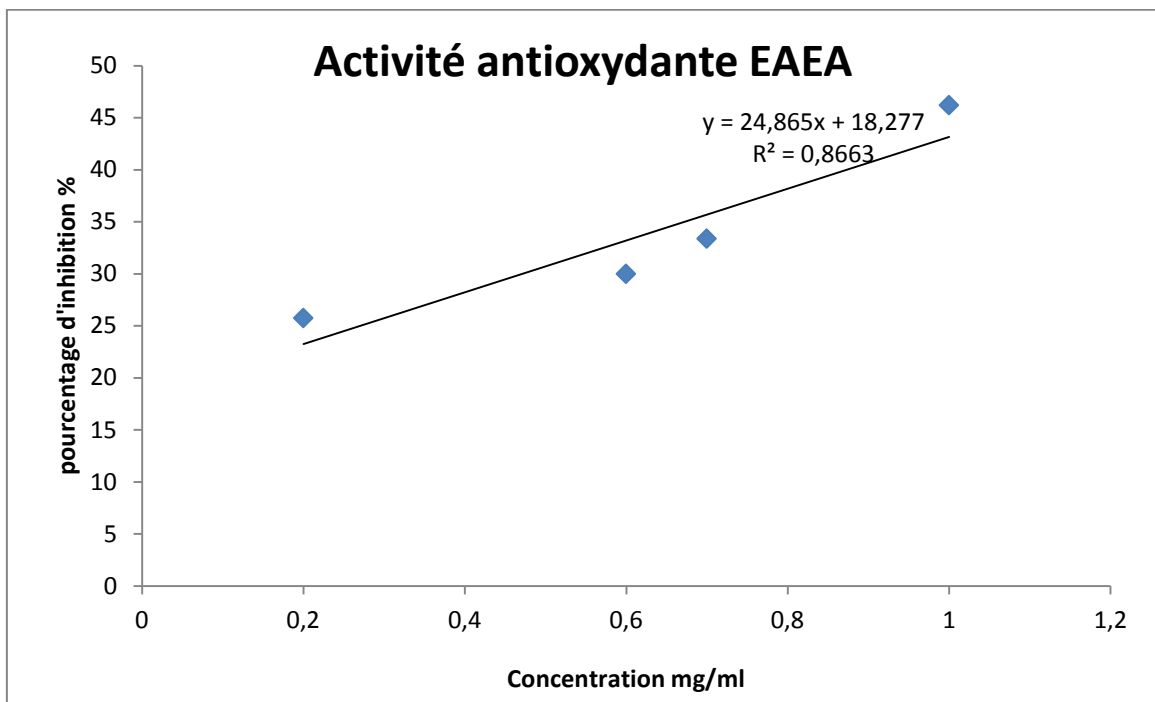


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes Concentrations de EAEA.

Chapitre II : Résultats et discussion

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans les deux extraits de *Ephedra alata alenda*.

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition	
	EMEA	EAEA
1	93.09±1.33	46.02±4.89**
0.7	87.36±6.9	33.37±4.56***
0.6	70.7 ±7.75	29.97±8.94***
0.2	47.71±8.43	25.73±5.7

D'après le tableau ci-dessus, et l'analyse par le test « t » Student, notre résultats ont montré que l'extrait méthanolique présent un PI% plus élevé que l'extrait aqueux dans les différentes concentrations utilisées. A la plus grande concentration (1mg/ml) pour l'EMEA (IP%=93.09±1.33) est hautement significative par rapport au l'EAEA (IP%=46.02±4.89). Pour La concentration (0.7mg/ml) le PI% de l'EMEA (87.36±6.9) est très hautement significative par rapport au l'EAEA (33.37±4.56). Aussi pour La concentration (0.6 mg/ml) le PI% de l'EMEA (70.7±7.075) est très hautement significative par rapport au l'EAEA (29.97±8.94). A la plus faible concentration (0.2mg/ml), l'EMEA a présenté un PI% (47.71±8.43) qui n'est pas significative par rapport à l'EAEA (25.73±5.7).

A partir de les deux courbes illustrées dans les figures 28,29 ; nous pouvons calculer la concentration IC50 pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant. Nous constatons une concentration d'IC 50 égale à 0,2 mg/ml pour l'EMEA, par rapport à l'EAEA (1.27 mg/ml). L'analyse par le test « t » de Student a montré une différence t significative (P<0.05).

Ceci montre que l'extrait méthanolique de la plante *Ephedra alata alenda* possède un grand potentiel antioxydant par rapport à l'extrait aqueux.

Cette grande activité antioxydante de l'extrait méthanolique peut être expliquée par leur forte teneur en flavonoïdes et polyphénols qui sont considérés comme d'excellents antioxydants. Les propriétés polaires de l'EMEA présentent l'activité la plus importante dont les propriétés oxydo-réducteurs leurs permettent d'agir comme les agents réducteurs.

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (**Oyaiza, 1986 ; Soares et al, 1997**).

Chapitre II : Résultats et discussion

L'effet antioxydant en piégeant le radical DPPH. est attribué soit à la capacité de libération d'hydrogène ou au transfert d'électrons par les composés antioxydants (**Ghasemi et al., 2014; Popovici et al., 2009**).

En effet, le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique et aqueux d'*E.alata* a été démontré d'après les travaux réalisés par (**Wilt et al., 2011**) sur la même espèce d'*Ephedra*, donc cette plante médicinale peut servir de source puissante d'antioxydant (**Palici, 2016**).

3. Evaluation de l'activité antiinflammatoire

Le Tableau 12 ci-dessous montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'EMEA et EAEA qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA.

Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA

Echantillon	PI%
EAEA	84.4±10.7
EMEA	/
Diclofénac	89.66 ±9.77

D'après les résultats obtenus on constate que l'extrait aqueux de la plante *Ephedra alata* a une activité anti inflammatoire légèrement efficace et leur PI%(84.4 ±10.7) est comparable a ceux obtenus pour le Diclofénac Sodium ; un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce une inhibition de (89.66±9.77).

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Yrjönen, 2004 ; Mizushima et Kobayashi, 1968**).

La production d'auto-antigènes dans les maladies anti-inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines *in vitro*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (**Yrjönen, 2004 ; Sangeetha et al., 2011**).

En effet, la présence des flavonoïdes dans les plantes est en partie responsable de cet effet anti-inflammatoire (**Park et al., 2001**).

Chapitre II : Résultats et discussion

4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait, comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 13 :

Tableau 13: Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne

Souches	Diamètre de zone	
	Méthanolique	Aqueux
<i>Echerichia coli</i>	22.667±10.3 ⁽⁺⁺⁾	11.33±8.74 ⁽⁺⁾
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.00	0.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	11.33±5 ⁽⁺⁾	7.33±5.9 ⁽⁻⁾

Diamètre : $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++)

Chapitre II : Résultats et discussion

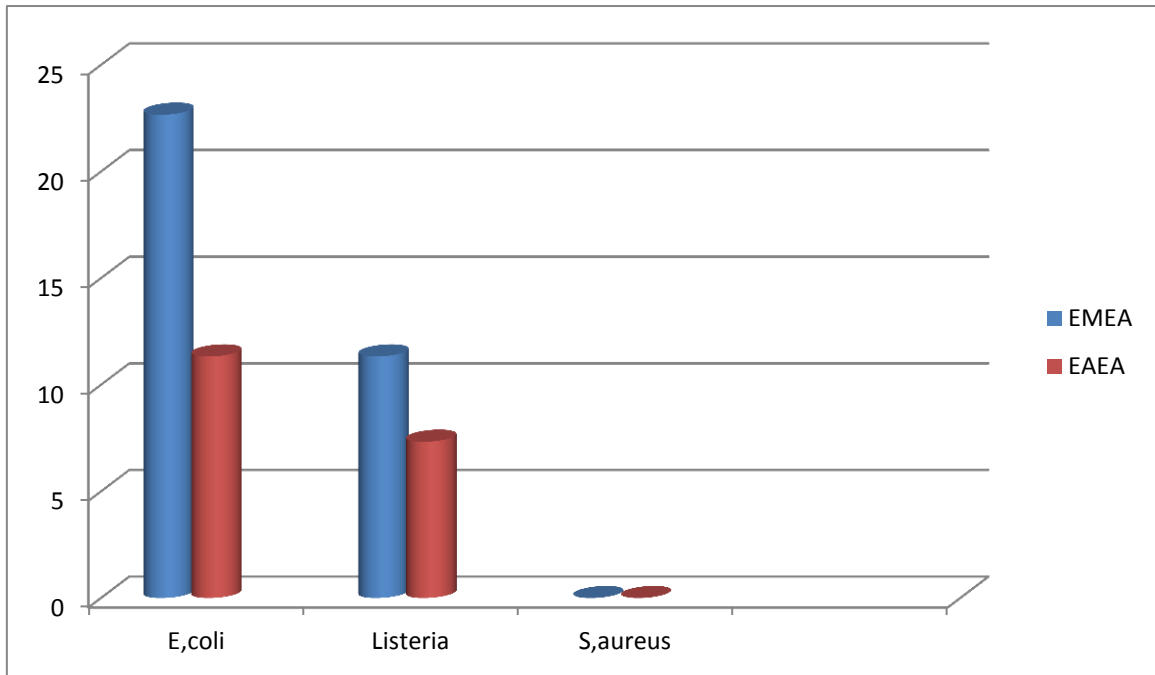


Figure 30 : Représentation graphique de l'activité antibactérienne de EMEA et EAEA

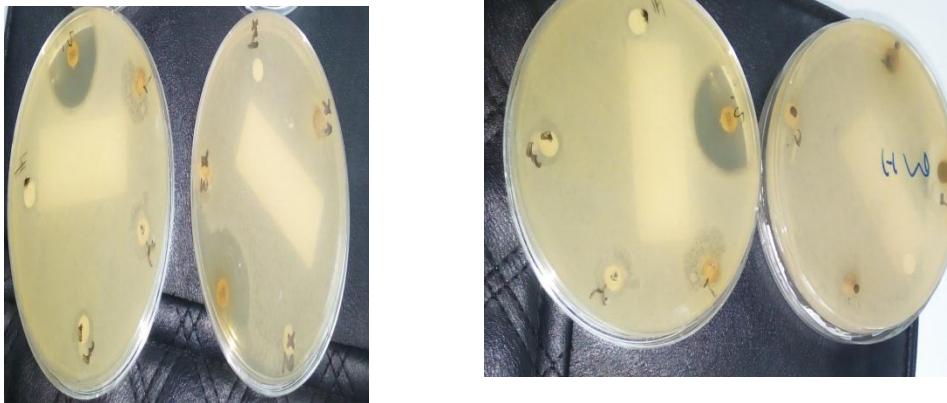


Figure 31 : Résultats de l'activité antibactérienne d'EMEA et EAEA

Les mesures sont représentées dans le tableau 13 qui nous révèlent que les deux extraits de la plante étudiée sont réagis seulement avec les deux souches *E.coli* et *L. monocytogenes* n'ont pas réagi avec *S.aureus*.

Nos résultats illustrés par la figure 30, indiquent que l'effet de l'extrait d'*E. alata* est varié d'une souche à l'autre dont *E.coli*, bactéries à GRAM négatif, est plus sensible de façon très hautement significative dans les deux extraits EMEA et EAEA que la souche souche *L. monocytogenes* à GRAM positif. La souche bactérienne *S. aureus*, bactérie à GRAM positif n'a aucune activité dans les deux extraits.

Chapitre II : Résultats et discussion

Les résultats montrent donc la résistance des bactéries à GRAM positif à nos extraits par rapport à la bactérie à GRAM négatif ciblée.

Selon **Kessal et Bouafia (2003)**, l'extrait méthanolique de la plante entière de l'*E. alata* de la région de Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 9.63 mm, et 15.320mm contre *E.coli* et *S. aureus* respectivement.

La sensibilité des souches utilisées traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. En fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libres (**Zeghad, 2009**). **Cowan, (1999)** supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus.

Notre extrait méthanolique est constituée principalement des flavonoïdes, qui sont théoriquement pourraient exercer des effets antibactériens important puisqu'ils sont des inhibiteurs puissants *in vitro* de l'ADN gyrase (**Akroum, 2011 ; Madjour, 2014**), donc l'ADN est incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement, donc les mécanismes de résistance qui reposant sur différent facteur génétique devenu inactive (**Akroum, 2011 ; Paulette et al., 1998**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Le présent travail avait pour but de fait une étude comparative entre les deux extraits, méthanolique et aqueux de la plante *Ephedra alata alenda* qui a été testée pour sa composition chimique, et ses activités biologiques telles que, l'activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antioxydante.

L'extrait méthanolique de *Ephedra alata alenda* ayant un meilleur rendement par rapport à l'extrait aqueux. Aussi, dans le test phytochimique, nos résultats indiquent la présence des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs et quinones libres dans les deux extraits et les alcaloïdes dans l'extrait méthanolique. L'analyse du contenu des métabolites par la CCM a montré que l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes plus que l'extrait aqueux. L'extrait méthanolique possède une teneur en polyphénols et en flavonoides plus élevée par rapport à l'extrait aqueux.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons dire que : l'extrait méthanolique donne une bonne activité antioxydante pour la capacité de piégeage de radicaux libres (DPPH) par rapport à l'extrait aqueux. Concernant l'activité anti-inflammatoire des deux extraits: l'extrait aqueux présente un meilleur pouvoir dénaturation de la protéine BSA.

L'activité antimicrobienne des extraits végétaux sur trois souches bactériennes s'est avérée importante, vu que cette plante a révélé une activité remarquable sur que deux souches testées.

Cependant, ce travail reste préliminaire. Il serait beaucoup plus intéressant de compléter ce travail pour utiliser de divers techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à Haute performance (HPLC), chromatographie en phase gaz (CPG) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale des métabolites qui sont responsables de ces activités biologiques

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités biologiques des extraits de cette plante.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abbal M., Alric L., Cantagrel A., Delisle B. (2019).** Réaction inflammatoire : aspects biologiques et cliniques. Conduite à tenir.
- **Aboughe Angone S., Aworet Samseny R.R.R., Eyele Mve Mba C. (2014).** Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. Lavoisier SAS: 1-5.
- **Abourached E., El-Alfy A., Khan I., Walker L. (2003).** Ephedra in perspective- a current review. 17 : 703-712.
- **Adouane S. (2016).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Thèse de magistère en sciences agronomiques. Université Mohamed Khider – Biskra. Algérie p 5-6.
- **Akroum S. (2011).** Étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine. 18 p.
- **Alibert G., Rangiva R., Boudet M.A. (1997).** Organisation subcellulaire : voies de synthèse des composés phénoliques ; *Physiol.* 15 : 279-301.
- **Al-Qarawi A.A., Abd Allah E.F., Hashem A. (2012).** Effect of Ephedra alata on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus*. *Pak. J. Bot.* 44(1) : 425-428.
- **Al-Rimawi F., Abu-Lafi S., Abbadi J., Alamarneh A.A., Raneen A., Sawahreh A., Odeh I. (2017).** Analysis of phenolic and flavonoids of wild Ephedra alata plant extracts BYLC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. 14(2) : 130-141.

B

- **Bagheri-Gavkosh S., Bigdeli M., Shams-Ghahfarokhi M., Razzaghi-Abyaneh M. (2009).** Inhibitory Effects of Ephedra major Host on *Aspergillus parasiticus* Growth and Aflatoxin Production. 168 : 249–255.
- **Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T.C., Truck M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45. 493 p.
- **Belkhiri F. (2009).** Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tamuscommunis L.* et *Carthamuscaeruleus L.* Mémoire de Magister, option microbiologie appliquée. Université Farhet Abbes-Sétif. 108 p.
- **Belfekih F., El Yahyaoui O., Chleh M., Ould Abdellahi L., Sammama A., Lrhorfi I.A., Bengueddou R. (2017).** Screening phytochimique d'*Arbutus unedo L.* *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences.* 237-245.

Références bibliographiques

- **Benariba N., Djaziri R.W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W.J., Sener A. (2013).** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed*; 3(1):35–40.
- **Benkiki N. (2006).** Etude phytochimique des plantes médicinales algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat en chimie. Université El-Hadj lakhdhar-Batna-Algérie. 18p.
- **Benhamou J.P. (1998).** *Hépatologie Clinique*. Flammarion. Paris. 566:597.
- **Bidie A.D.P., N'guessan B.B., Yapo A.F., N'guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature* Vol. 8(1): 1 – 11.
- **Boisdunal M.J.A. (1828).** *Flore française*. Paris.
- **Boizot N., Charpentier J-P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*. p79-82.
- **Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E. (2004).** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 50 : 120-123.
- **Botineau M. (2010).** *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. P 661.
- **Bouhrara B. (2016).** Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêt thérapeutiques et nutritif de parc nationale El-kala. Thèse de doctorat : phytochimie. Université Badji Mokhtar- Annaba.136p.
- **Bouakrif N. (2016).** Qui fait quoi. SIPHAL : salon international de la pharmacie. 10^{ème} édition. Safax-Algérie. 14p.
- **Boucherit A. (2018).** Etude des activités biologiques de « *Senecio cineraria* ». Mémoire de master en biochimie appliquée. Université Abbès Laghrour Khenchela-Algérie. 1p.
- **Boudjad R. (2009).** Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* asso chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par Streptozotocine. de magistère en Biologie moléculaire et cellulaire. Université des Frères Mjentouri Constantine,2.
- **Boulberhane S., Nabti H. (2017).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des deux plantes : *Artemisia campestris L.* et *Ephedra alata alenda staph*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine-Algérie. p24, 69.

Références bibliographiques

- **Bourmita Y., Belboukhari N., Cheriti A., Ould el Hadj M.D. (2013).** Recherche préliminaire des sources végétales sahariennes à alcaloïdes pour usage bio-insectides.1 : 98-101.
- **Bousta D., Ennabili A. (2011).** L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc. 9 : p298-303.
- **Bouزيد W. (2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit *Crataegus monogyna* Jacq. Thèse de magister, option biochimie appliquée. Université El Hadj Lakhder-Batna-Algérie.62p
- **Bouzouita K. (2016).** Phytovigilance : enquête auprès des pharmaciens officinaux d'Oujda. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed v-Rabat, Maroc. 23p.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R. (2008).** Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chemistry ; 111(4) : 925-929.
- **Braithwaite A., Smith FJ. (1999).** Chromatographic Methods. 5 ème Ed Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3ème éd) Tec&Doc, Paris.
- **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4eme Ed.), 1268 p.
- **Bruneton J. (2010).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (5^e ed).
- **Bryskier A. (1999).** Antibiotiques et agents Antibactériens : classification et relation structure activité. In : Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ed. Ellipses, Paris. pp. 54-57.
- **Buchanan B., Gruissem W., Jone R. (2000).** Biochemistry & Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiologists. 1250-1318.

C

- **Calvet R. (2003).** Le sol: propriétés et fonctions,tome 2 . éd ; France agricole Paris. p 55.
- **Caveny S., Charlet D.A., Freitqg H., Maier-Stolette M., Starratt A.N. (2001).** New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). American Journal of Botany. Vol.88(7) : 1199–1208.
- **Charles N., Serhan N., Peter A., Ward G. (2010).** Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press. 2-3.
- **Chemat F. (2014).** Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs. Coll. Technique et ingénierie, Paris, 336p.

Références bibliographiques

- **Clément O.E.L. (2009).** Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de Quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou. 7p.
- **Cohen Y., Jacquot C. (2001).** Pharmacologie. 5 ème Ed. Masson. Paris. 350p.
- **Cohn Y., Jacquot C. (2008).** Pharmacologie. 6eme édition.
- **Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013).** Composition chimique des huiles essentielles. 525 : 22-25.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clinicalmicrobiologurev12(4).
- **Crosier A. (2016).** Flavonoïdes. Centre d'information sur les micronutriments. Institut Linus Pauling.

D

- **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.
- **Dangoumau J. (2006).** Pharmacologie générale. Edition 2006 Département de pharmacologie. Université Victor Segalen. Bordeaux. 2.
- **Debuigne G., Cauplan F. (2013).** Larousse des plantes qui guérissent: 500 plantes et leurs remèdes. Ed. Larousse.
- **Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. (2003).** Natural product: their chemistry and biological significance. Journal of the American Oil Chemistry Society. 80:65-70.
- **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Radicaux libre et stress oxydant, aspects biologiques et pathologique. P 1-23.
- **Delaunay J. (1988).** Biochimie. Hermann éditeurs des sciences et des arts, paris, 733p.
- **Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, Food Chem; 97 (4): 654-660.
- **Duret X. (2013).** Liquéfaction d'écorces en vue de leur valorisation pour le développement de nouveaux produits de traitement du bois. Thèse du doctorat. Université de Lorraine « Ecole doctorale RP2E »-France. 14p.

Références bibliographiques

E

- **Ekoumou C. (2003).** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako. 145 p.
- **Eurotext J.L. (2002).** Progrès en Dermato- Allergologie

F

- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique. 108-117.
- **Ferhat A., Belhadi M. (2016).** Evaluation de l'activité cicatrisante et de l'effet anti-inflammatoire de *Carthamus caeruleus L.* Thèse de master. Université M' Hamed Bougara-Boumerdes-Algerie. 19p.

G

- **Gahbiche S. (2009).** La phytothérapie. Ecole supérieure des sciences et techniques de la santé de Sousse.
- **Ghalem M. (2014).** Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen-Algérie. 27p.
- **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. 4 : 162-169.
- **Ghosh D. (2015).** Tannins from Foods to Combat Diseases. International Journal of Pharma Research & Review. 4(5): 40-44.
- **Gilbert B.L., Norris D.M. (1968).** A chemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. J. Insect physiol. 14 : 1063-1068.
- **Ghourri M., Zidane L et Douira A (2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). Journal of Animal & Plant Sciences. 17 : 2388-2411.
- **Gorai M., Laajili W., Santiago L., Neffati M. (2014).** Rapid recovery of photosynthesis and water relations following soil drying and re-watering is related to the adaptation of desert shrub *Ephedra alata* subsp. *Alenda* (Ephedraceae) to arid environments. 1-32.

Références bibliographiques

- **Guédé-Guina F., Vangah-Manda M., Harounad D., Bahi C. (1996).** Potencies of MISCA a plant source concentrate against fungi J. of Ethnopharmacol . 14(2): 45-53.
- **Guillaume D., Charrouf Z. (2005).** Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). 14(6) : 509-516.

H

- **Habibur R., Chinna Eswaraiah M., Dutta A.M. (2015).** In-Vitro anti inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). American-Eurasian J Agric Environ Sci. 15 (1): 115-121.
- **Habibur R., Chinna Eswaraiah M., Vakati K., Madhavi P. (2012).** In Vitro studies suggest probable mechanism of Eucalyptus oil for antiinflammatory and anti-arthritic activity. Int J Phytopharm. 2(3): 81-83.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., CHARlier C., Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant. 62 (10) : 628-638.
- **Hani K., Abdessalam F.Z. (2015).** Etude des activités biologiques des plantes médicinales : *Onopordum acanthium L* et *Spartium junceum* sur les rats Albinos wistar. Thèse de master en biochimie appliquée. Université Abbes Laghrour-khrnchele-Algérie. 29-30p.
- **Harbone J. (1998).** Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis 3eme Ed.: chapman and hill: 303.
- **Harkati B. (2011).** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille ASTERACEAE : *Scorzonera Undulata* ». thèse de doctorat Université Mentouri Constantine.
- **Hennebelle T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (lamiacées) et *Lippia alba* (verbénacées), Thèse de Doctorat, Univ. de Lille-lille1. 27p.
- **Hensel W. (2008).** Les indispensables natures de Delachaux : 350 plantes médicinales. Ed, Delachaux et Niestlé SA, Paris. 256p.
- **Hoffman L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg. 245p.
- **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris. p514

Références bibliographiques

I

- **Ibragic S., Sofia E. (2015).** Chemical composition of various *Ephedra* species.
- **Ikan R. (1991).** Natural Products: a laboratory guide. Academic Press (2e Ed.), pp 357.
- **Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins. Ed, Dorling Kindersiey Limeted, Londres. 335p

J

- **Jain P.K., Joshi H. (2012).** Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 02 (06): 236-240.
- **Jaradat N., Hussenf., Al Ali A. (2015).** Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne.6(6) : 1771-1778.
- **Jerbi A., Zehri S., Abdnnabi R., Gharsallah N., Kammoun M. (2016).** Essential oil composition, free-radical-scavenging and antibacterial effect from stems of *Ephedra alata* alenda in Tunisia. Journal of Essential Oil Bearing Plants.

K

- **Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R. Xin H. (2014).** Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology vol 7(2) : 377-392.
- **Kada S. (2018).** Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques. Thèse du doctorat en sciences. Université Ferhat Abbas Sétif 1- Algérie. 3p.
- **Kansole M. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucasmartinicansis*(Jacquin).
- **Kebili Z. (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Mémoire du magister en Biochimie et Analyse des Bioproduits. Université Ksdi Merbah-Ouargla. 3p.
- **Kessal A., Bouafia O. (2003).** Phytoscreening and antibactériel of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah.

Références bibliographiques

ℒ

- **Lavigne J.P. (2007).** Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- **Lee J. (2003).** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem.* 51: 7292-7295.
- **Lozniewski A., Rabaud C., Nancy C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.
- **Lauri Aesoph M. (2019).** Naturopathic medicine : Aide pour votre Rhume Des foins.
- **Létard J.C., Canard J.M., Costil V., Dalbiès P., Grunberg B., Lapuelle J. (2015).** Phytothérapie – Principes généraux. Vol. 5 (1) : 29-35.
- **Loomis D., Croteau R. (1980).** Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. *Stumpf and E. E. Conn (eds.)*. Academic Press, San Francisco, pp. 364-410.
- **Lutge U., Klug M., Bauer G. (2002).** Botanique 3éme Ed : Technique et documentation. Lavoisier. Paris, 211p.

ℳ

- **Macheix J.A., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed, presses polytechnique universitaires romandes, Italie. 6 p.
- **Mac Laren D. (2007).** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxydants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- **Madjour S. (2014).** Etude pharmacologique et évaluation de l'activité antibacterienne d'une labiée *Rosmarinus officinalis*. Master en Chimie pharmaceutique. Université Med Khider-Biskra. 51 p.
- **Madi A. (2010).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques, mémoire de doctorat, université de Mentouri, Constantine. 107p.
- **Manallah A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europea L.* Mémoire de Magister. Option biochimie appliquée. Université Farhat Abbes-Sétif-Algérie.
- **Mann M.I. (1962).** Méthode artisanale de tannage. 53p.
- **Mardaga P. (1985).** La forêt wallonne. Bruxelles-Belgique. p 174.

Références bibliographiques

- **Marfak A. (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187p.
- **Marouf A, Reynaud J (2007).** La botanique de A à Z, Ed, Dunod, Paris, p177.
- **Mehrotra M, Dougherty J etPoppe C. (2003).**La resistance aux antimicrobiens : De quoi s'agit il ? Recherche sur les politiques de santé (Canada). 6 p.
- **Menard C. (2016).** Quelle alimentation pour l'excès de cholestérol.
- **Merghem R. (2009).** livre des éléments de biochimie végétale.
- **Meziani K., Boussaada L. (2018).** Etude phytochimique et activité biologique de la plante médicinale : *Artemisia campestris L.* Mémoire de master. Université Abbas Laghrour-Khenchela-Algérie. 29p.
- **Middelton Jr.E., Kardasnam C. (1993).** The flavonoides, advances in research since. ed.J.B.Harborn, London. 617-652.
- **Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. Food chemistry, 85.
- **Mizushima Y., Kobayashi M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 20(3), 169-173.
- **Moghimpour E., Handali S. (2015).** Saponin : properties, methods of evaluation and applications. Science domain international. 5(3) : 207-220.
- **Mogode J. (2005).** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans Vahl* (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad », Thèse de Doctorat (Université de Bamako). P 25-P 33.
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister Tlemcen, p : 49-50.
- **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 26(2). 211 P.
- **Monassier L. (2005).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale « chapitre 22 ».
- **Muylaert A., Mainil J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». 156 : 109- 123.

Références bibliographiques

N

- **Najjaa H., Zouari S., Arnault I., Auger J., Ammar E., Neffati M. (2011).** Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum L.* et *Allium ampeloprasum L.* 158 (1) : 111-123.
- **Nathalie G., Bedossa P. (2015).** Inflammation chronique/Fibrose. Université Paris-Diderot. 1-3.
- **Nawwar M.A., EL-Sissi H.I., Barakat H.H. (1984).** Flavonoid Constituents of *Ephédra alata*. 23(12) : 2937-293.
- **Novelli G. P. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* 48 : 517-527.

O

- **Ouédraogo N., Lompo M., Sawadogo R.W., Tibiri A., Hay A.H., Koudou J., Djibou M.G., Guissou L.P. (2012).** Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). 1-7p.
- **Ould El Hadj M.D., Hadj -Mahammed M., Zabeirou H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir.* 3 : 47-51.
- **Ouattara L.H., Kabran G.R.M., Kadja A.B., Tano M.B., Mamyrbekova-Bekro J.A. Bekro Y.A. (2016).** Etude phytochimique et activité anti-oxydante d'extraits de la plante de Cote d'ivoire utilisées dans le traitement traditionnel des hémorroïdes. 15 : 881-893.
- **Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Centre national de la recherche scientifique. Paris (3^{ème} Ed). 662 p.

P

- **Pandian B.R., Afridah A.R., Qureshi A.K., Awang K. (2014).** Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. 32(3) : 408-413.
- **Park Y.K., Matias de Alencar S., Zima de Agenar C., Scamparini R.P., Ganzalez M., Maria A.A. (2001).** Comparação Das características fisicoquímicas das propolis produzidas na região subtropical da America Do Sud : Evidencia fitoquímica de sua origem botânica, *Mensagem Doce*, 61.

Références bibliographiques

- **Paulette C., Jacque C., Dominique D., Georges D., Colette D., Jean D., Eviline F., Claudine F., Jean M.F., Moreno G., Colette G., Bernard J.J., Lamotte B.M., Nguyen D. (1998).** Résistance bactérienne aux B-lactamine. médecine/science n°5. vol 14. 544 p.
- **Perronne C. (1999).** Maladies infectieuses, volume 1. pp65.
- **Pillon F. (2014).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Actualités pharmaceutique. n° 534 : 43-46
- **Poblocka-Olech L., Glód D., Żebrowska M E., Sznitowska M., Krauze-Baranowska M. (2016).** TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. Acta pharmaceutica.
- **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C.E., Roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie, 36:679–684.

R

- **Ribereau-gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed, Dunod. 128p.
- **Rispail N., Robert N., Jodith K. (2005).** Secondary métabolite profiling. Lotus japonicas, Handbook. 341-348.
- **Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet F.P. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire. 1-75.
- **Rwangabo P.C. (1993).** La médecine traditionnelle au Rwanda.

S

- **Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A., Perry G. (2008).** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. Ann Ist Super Sanità. 41(2) : 143-164.
- **Sangeetha M., Kousalya K., Lavanya R., Sowmya C., Chamundeeswari D., Reddy C.U.M. (2011).** In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity of leaves of *Cleodendron inerme*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical sciences, 2(1), 822-827.
- **Sebai M., Boudali M. (2010).** La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel « infirmier de la santé ». Institut de formation paramédical Chettia-Algerie. 6p.
- **Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., Nacro M. (2008).** Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Borkina Faso. 15 : 41- 49.

Références bibliographiques

- **Sofowora A. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed N2, KARTHALA, paris. 22p.
- **Soni M.G., Carabin I.G., Griffiths J.C., Burdock G.A. (2004).** Safety of ephedra: lessons learned. 150 : 97-110.
- **Soulère L., Viodé C., Périé J., Hoffmann P. (2002).** Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50,pp.578-582.
- **Souris C., Delphine J. (2015).** Les terpènes naturels: usage et synthèse en chimiothérapie anticancéreuse.
- **Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat M., Jeanmonod D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs. 3ème édition.
- **Stocklet J.C., Schini-Kerth V. (2011).** Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. 69 : 78-90.



- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M et Telser J (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1) : 44-84.
- **Vermerris W., Nicholson R. (2006).** Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht
- **Vilain R (2012).** La thérapie par les plantes. 49p.
- **Vinay K., Abbas A.K., Fausto F., Mitchell R. (2007).** Robbins Basic Pathology, 8th Edition, 20-60.
- **Vincken J.P., Heng L., De Groot A., Gruppen H. (2007).** Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 68 : 275–297.



- **Wareham D.W., Wilson P. (2002).** Chloramphénicol in 21st century. 63 : 157-161.
- **Weill B., Batteux F. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris). 12-23p.
- **Wertz J.L. (2010).** La lignine. Document ValBiom – Gembloux AgroBio Tech.
- **Wichtl M., Anton R. (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. p38, 41.

Références bibliographiques

- **Williams L.A., O'Connar A., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J.A., Conrad J., Vogler B., Rosner H., Kraus W. (2008).** The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *WestIndian Med* ; 57(4): 327-31.
- **Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen. F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food cChem.*; 97 (4) : 705-711.

Υ

- **Yahaioui A., Silat L. (2018).** Contribution à l'étude des extraits de l'espèce *Ephedra alata* Alanda de la région de Sigus. Mémoire de Master en biologie. Université Larbi Ben Mhidi Oum El bouaghi-Algérie. p6, 29.
- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar korich M.N. (2001).** Resistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* 91 : 6-14.
- **Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y. (2009).** Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *70(15-16) : 1739-1745.*
- **Yoshida H., Kajimoto G., Emura S. (1993).** Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 989-995.
- **Yrjönen T. (2004).** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products,64.

Z

- **Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri-Constantine.
- **Zakkad F(2017).** Etude phytochimique et évaluation de quelques propriétés biologiques de trois espèces de l'*Euphorbia*. Thèse de doctorat en Synthèse et développement des molécules bioactives. Univ Badji Moukhtar-Annaba-Algérie. P10, 17.

Références bibliographiques

Site électroniques

Site web 1 : <http://www.lecolebuissoniere.eu/page200.html> par Juventino (consulté le 14/03/2019).

Site web 2 : <http://www.If-medecinenaturelle-fitness.over-blog.com> (consulté le 04/04/2019).

Site web 3 : <http://www.plantefleur.fr> (Consulté le 05/04/2019).

Site web 4 : <file:///C:/Users/Toshiba/Documents/15.pdf>

Site web 5 : <https://www.creapharma.ch/glossaire/chimie-biochimie/saponines.htm> par Raffa (2005) (consulté le 10/04/2019).

Site web 6 : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloides/lite> par Poisson J.E (consulté le 10/04/2019).

Annexes

Préparation du Tampon phosphate salin (pH 6.3)

Pour la préparation du Tampon phosphate salin à pH égale à 6.3 on a besoin de :

-1.725g de NaH_2PO_4

-2.225g de Na_2HPO_4

Dissoudre chaque comptant dans 250ml de l'eau distillé, en agitant jusqu'il s'homogénéise à l'aide d'un agitateur. Il se prépare en mélangeant 20ml de NaH_2PO_4 et 100 ml de Na_2HPO_4 dans un bécher. Après la préparation de la solution, on doit vérifier le pH de la tampon phosphate salin par un pH mater pour obtenir une pH est égale à 6.3 avec l'ajoute de quelques gouttes de la solution Hcl.

Préparation de la gélose de Muller Hinton Agar

Pour la préparation du la gélose de Muller Hinton (milieu 02), on a besoin :

-19g de la poudre du Muller Hinton agar

Les étapes de préparation sont :

1. Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un 500 ml de l'eau distillé, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant.
2. Porté à ébullition environ une minute
3. Met dans des flacons de verre bien fermé pour stériliser à l'autoclave pendant 30 min à 121°C .

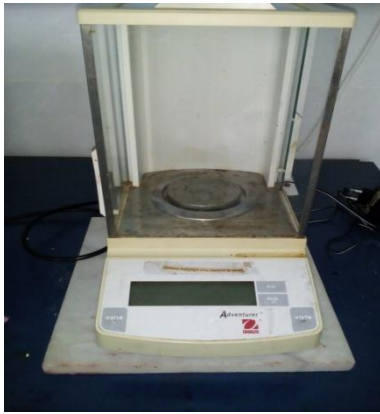
Pour l'utiliser, laisser le refroidir, puis couler en boite de pétri (25ml par boite) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prête à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2°C à 8°C pendant une semaine au plus



Bain Marie (nive bath, MEMMERT)



Etuve universelle de 5 à 220°C
avec ventilation (MEMMERT)



Balance analytique (OHAUS)



Vortex (VELP)

Présenté par :
MEBARKIA Ouafa et OUADAOUI Hayette

Encadré par :
Mme. KRIM Meriem

Thème : Etude comparative de deux extraits de la plante *Ephedra alata*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Ephedra alata alenda est une plante qui appartient à la famille des Ephedraceae, et représente l'une des plantes médicinales les plus anciennes connues par l'être humain. Notre travail a eu pour objectifs de comparer entre les deux extraits, méthanolique et aqueux de la plante *Ephedra alata alenda*.

Le screening phytochimique a montré la présence des : flavonoïdes, tanins, composés réducteurs et des quinones libres, dans les deux extraits et les alcaloïdes dans l'extrait méthanolique. Les résultats de l'étude qualitative par CCM a montré que l'extrait méthanolique est riche en flavonoïdes plus que l'extrait aqueux

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$. Les teneurs les plus importants en polyphénols et en flavonoïdes enregistrées sont celles de l'extrait méthanolique de ($50.18 \pm 3.29 \mu g \text{ EAG/mg}$) et ($14.35 \pm 0.79 \mu g \text{ EQ/mg}$) respectivement.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH. L'extrait méthanolique a une activité antioxydante plus importante (74.71 ± 6.1) que l'extrait aqueux (33.77 ± 6.02). Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par l'évaluation de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que l'extrait aqueux de la plante inhibe la dénaturation de Bovin Sérum Albumine avec des pourcentages d'inhibition de 84.4 ± 10.7 .

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur trois souches bactériennes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Les extraits testés ont un effet sur seulement les deux souches *E.coli*, et *L. monocytogenes*.

Mots-clés: *Ephedra alata alenda*, activité antibactérienne, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes, activité antiinflammatoire.

Jury de soutenance :

Président : Mr. MAAMAR Hichem

(M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela

Promotrice : Mme. KRIM Meriem

(M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela

Examinatrice : Mme. DJEMII Randa

(M.C.B) U Abbes Laghrour – Khenchela