



République Algérienne Démocratique Et populaire

Ministère De L'enseignement Supérieure Et De La Recherche
Scientifique



Université Abbès Laghroure-Khenchela

Faculté De Science De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Mémoire

Présentation en vue de l'obtention du diplôme de master académique

FILIERE : Sciences Biologique

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

**Investigation phytochimique et étude -in vitro- de l'activité anti-
oxydante, l'activité antimicrobienne et l'activité anti-
inflammatoire de la plante médicinale récoltée dans la région –
*Khenchela-(Ephedra alata,alanda)***

Présenté par:

- GROUNE Remaisa
- OUADAOUI Oumaima

Encadré par:

HABIBATNI .S

Soutenu le : 06/07/2019

Membres du jury :

Président : Dr. BOUAKKZ Amel MAA . Univ. Abbés Laghroure Khenchela

Promoteur : Dr. HABIBATNI Sofian MAA . Univ. Abbés Laghroure Khenchela

Examineur : Dr. DJEMIL Randa MAA . Univ. Abbés Laghroure Khenchela

Promotion : 2018/2019





Remerciements

*Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de mon avoir donné la patience, la santé et pour mon avoir accordé la volonté et le courage pour élaborer ce travail.*

Car sans lui rien n'est possible.

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mon profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué mon promoteur **Dr.HABIBATNI SOFIAN**, qu'a accepté de m'encadrer et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, ses encouragements.sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout le long de mon mémoire et ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques et ses orientations, sa patience et sa correction sérieuse de ce travail.*

mes vifs remerciements s'adressent aux membres de jury ; d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

*Je adresse mes plus sincères remerciements à, **Dr. BOUAKKAZ AMEL** Maitre Assistante à l'université Abbès Laghrour d'avoir accepté de présider le jury.*

*J'offre mes plus sincères remerciements à **Dr DJEMIL RANDA**. pour ses précieuses remarques qui j'ai permet de corriger ce travail et pour l'assistance par des conseils objectifs et éclairés.*

*J'adresse mon profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoire de la faculté des SNV surtout **souad.B**. Pour leur aide qu'ils j'ai donné et les efforts déployés pour faciliter mon travail et surtout pour leur gentillesse*

Enfin je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie mon modeste travail

A Mes parents

A ma famille

A mes amis

Remaïsa et Oumaima

Résumé

La présente étude visait à étudier l'effet de différents solvants à savoir l'méthanol, l'éthanol et l'eau sur les propriétés phytochimique, antibactérienne, antioxydant et anti-inflammatoire de *Ephedra alata, alanda*.

L'étude phytochimique a permis d'isoler les principaux métabolites notamment ceux majoritaires, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus via l'évaluation *in vitro* de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines montrent que les extraits ont une activité anti-inflammatoire remarquable.

Les tests de l'activité antimicrobienne ont permis d'évaluer la puissance antibactérienne. L'effet bactéricide varie selon la nature de la souche et de la substance testée.

L'activité anti radicalaire a montré que pouvoir antioxydant est en fonction du solvant utilisé dans la macération de la plante étudiée.

- **Mots clés** : *Ephedra alata, alanda*, solvant, screening, antioxydant, antibactérienne, anti-inflammatoire.

Abstract

This study was designed to investigate the effect of different solvents namely methanol, ethanol and water on the phytochemical, against properties and antioxidant of *Ephedra alata, alanda*.

The phytochemical study to isolate the major metabolites such as majority, falconoid, alkaloid and tininess.

The results of the anti-inflammatory activity obtained via the *in vitro* evaluation of percent inhibition of protein denaturation show that the extracts have remarkable.

The antimicrobial activity tests were used to assess the antibacterial power. The bactericidal effect depends on the strain and the tested substance.

Anti-radical activity showed that antioxidant power is depende on the solvent used in the maceration of the studied plant.

- **anKey words:** *Ephedra alata* solvent, screening, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory.

المخلص

دراستنا تهدف الى تحديد تاثير المذيبات المختلفة وهي الميثانول و الايثانول و الماء على خصائص الكيمياء النباتية، ضد البكتيريا و ضد الاكسدة و ضد الالتهاب لنبتة العلندة

دراسة كيمياء النبات تسمح بعزل الايضات الرئيسية، بما في ذلك الفلافونيدات، التانينات و الالكالويدات. اختبر و تقييم القوة المضادة للجراثيم. تأثير مبيد الجراثيم يتغير حسب طبيعة السلالة و طبيعة المركب المعابر

اختبار نشاط مكافحة الراديكالية أظهر أن القدرة تعتمد على المذيب المستخدم في نقع النبات المدروس

نتائج الدراسة الفيتوكيميائية المتحصل عليها سمحت بعزل الايضات الثانوية الاساسية مثل الفلافونيدات و الالكالويدات

نتائج النشاط الحيوي المضاد للالتهابات التي تم الحصول عليها عن طريق التقييم في المختبر لنسبة تثبيط تخريب البروتينات تبين أن هذه المستخلصات لها نشاط حيوي مضاد للالتهاب ملحوظ.

الكلمات المفتاحية: النشاط الحيوي مضاد للالتهاب، مضاد للبكتيريا، مضادة للأكسدة، عزل الايضات الثانوية.

Liste des figures

Figure 1: Distribution de la plante <i>Ephedra alata</i> (alanda) dans le monde	3
Figure 2: <i>Ephedra alata</i>	4
Figure 3 : Répartition d' <i>Ephedra alata</i> dans la région de chechar (Khenchela)	6
Figure 4 : structure simple d'un polyphenol.	9
Figure 5: Principales classes de flavonoïdes.....	12
Figure 6: Différentes structures des tanins.....	13
Figure 7: Structure d'une molécule de coumarine.	14
Figure 8 : divers propriétés des coumarines.....	14
Figure 9: structure des alcaloïdes.....	15
Figure 10: Structure de la molécule d'isoprène.....	17
Figure 11 : Quelques maladies liées au stress oxydatif.	23
Figure 12: formation de radicaux libre.	24
Figure 13: Les principales sources des ERO).....	25
Figure 14: Radicaux libres : métabolites dérivés de l'oxygène.	26
Figure 15: différents antioxydants naturels enzymatique et non enzymatique	28
Figure 16: la forme générale de la bactérie.....	29
Figure 17: Protocole d'extraction solide liquide.	36
Figure 18 : Histogramme d'effet de la plante <i>E. alata</i> sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figure 19 : Histogramme d'effet de la plante <i>E. alata</i> sur la souche bactérienne <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	48
Figure 20 : Histogramme d'effet de la plante <i>E. alata</i> sur la souche bactérienne <i>Listeria monocytogenes</i>	49
Figure 21 Histogramme d'effet de la plante <i>E. alata</i> sur la souche bactérienne <i>Escherichia coli</i>	49
Figure 22: Histogramme représente le pourcentage d'inhibition de la Diclofinac et l'extrait méthanolique des fleurs.	51

Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine en $\mu\text{g/ml}$	52
Figure 24 : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/mg).	53
Figure 25 : les tests d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique.	53
Figure 26 : CI_{50} des extraits et des standards DPPH.	54
Figure 27 : IC_{50} des extraits et des standards ABTS.	54
Figure 28 : CI_{50} des extraits et des standards de teste CUPRAC.	55

Liste des tableaux

Table 1: Classification botanique de <i>Ephedra alata</i>	4
Table 2: Nom vernaculaire d' <i>Ephedra alata</i>	5
Table 3 Principaux types de coumarines	14
Table 4 Molécules du stress oxydatif.....	21
Table 6: Les souches bactériennes utilisées.	40
Table 7 : le rendement d'extrait méthanolique de <i>Ephedra alata alanda</i>	45
Table 9 : zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des fleurs, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur le milieu MH (mm).....	47
Table 10 : les différentes absorbances des différentes solutions à 416 nm.....	50
Table 11: les différents pourcentages de l'inhibition de la dénaturation des protéines par les fleurs de l' <i>Ephedra alata</i> , <i>alanda</i> et le Diclofenac sodium	51

Liste des abréviations

- **ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
- **AlNO₃** : Nitrate d'aluminium.
- **ATCC**: American type culture collection.
- **AW**: Acidsacitique/Water.
- **ADN**: Adénosine désoxyribonucléique.
- **AG**: Acide gallique.
- **AlCl₃**: Trichlorure d'aluminium.
- **ATB**: Antibiotique.
- **BHA** :Hydroxyanisol butylé.
- **BHT** : ButylHydroxytoluène.

- **BWA**: Butanol/Water/Acid acitique.
- **BM**: BSA +Medicament.
- **BE**: BSA+ L'extrait.
- **EE**: extrait+ eau distillé
- **BSA**: Bovine Sérine Albumine.
- **CHCl₃**: Chloroforme.
- **CH₃COOK** : Acétate de potassium.
- **COOH**: Carboxylique.

- **cm** : centimètre.
- **°C** : Degré Celsius.

- **D control** : diamètre de la boîte de pétri.
- **D test** : diamètre de la zone d'inhibition.
- **D**: Diamètre.
- **Da**: Dalton.
- **DO**: Densité optique.
- **DPPH**: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle).
- **EA** : Extrait aqueux.
- **EAG**: Equivalent acide gallique.
- **EM**: Extrait Méthanoïque.
- **EtOH**: Ethanole.
- **FeCl₃** : Trichlorure de fer.
- **g** : gramme.
- **GN**: Gelose nutritif.
- **GSH-peroxydase** : glutathion peroxydase
- **H₂O**: Eau distillée.
- **H₂SO₄**: Acide Sulfurique.
- **HCl** :Acide chlorhydrique.
- **IC₅₀** : la concentration inhibitrice à 50%.
- **I(%)** : Inhibition (pourcentage).
- **Me-OH** : Méthanol.
- **mg** : milligramme.
- **MH**: Mueller Hinton.
- **ml** : millilitre.
- **m**: Masse d'extrait brut.

- **mo** : Masse de la plante sèche en poudre.
- **Mg**: Magnésium.
- **MH**: Muller Hinton.
- **MS**: Matier sèche.
- **N** : Normalité.
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium.
- **Na₂CO₃**:Carbonate de sodium.
- **NDF** :Fibre Détergent Neutr.
- **NH₄OH** :Ammoniaque.
- **NADP** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
- **NADPH** :Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate.
- **NO•** : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique.
- **NO₂**: Dioxyde d'azote.
- **NOS**: NO Synthases.
- **O₂**: Oxygène.
- **O₂•-** : anion superoxyde.
- **O₃**: Ozone.
- **OH•**: Radical hydroxyle.
- **ONOOH**: Nitroperoxyde.
- **nm** : nanomètre.
- **OH**: Alcoolique.
- **Pp** : poly phénols.
- **RL** : Radicaux Libres
- **ROS** : Espèces réactives oxygénées

- **SM** : Solution mère
- **SOD** : superoxyde dismutase
- **UV** : Ultra-violet.
- **µl** : microlitre.
- **%** : Pourcentage
- **°C** : Degré Celsius
- **µg** : Microgramme
- **µM** : Micromole
- **µm** : Micromètre

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales ont été identifiées et utilisées tout au long de l'histoire de l'humanité pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures, car elles ont la capacité de synthétiser une grande variété de composés chimiques qui sont utilisés pour exécuter des fonctions biologiques importantes et de défense contre les radicaux libres, les bactéries et les champignons (**Tabutiet al, 2003**). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (**Benkhniq, 2010**).

En Afrique, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique (**Koffi et al, 2009**).

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (**Merzoug, 2009**).leur utilisation d'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique (**Hadjer et al 2015**).

Dans ce contexte et notamment dans le cadre du programme de recherche sur les plantes médicinales, nous sommes intéressées à l'étude d'espèces médicinales, appartenant au genre Ephedra.

Nous avons organisé nos travaux en trois parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique .Nous avons entamé cette partie par une enquête ethnobotanique, en vue d'évaluer l'intérêt et l'usage de ces plantes chez la population sur les aspects botaniques et phytochimiques de la plantes. Des généralités, sur les alcaloïdes et les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes,

tannins, saponines, anthraquinone...etc. ainsi que sur les activités antibactériennes, antioxydants et anti-inflammatoire.

- Elle contient trois chapitres :

- ❖ Chapitre 1 : est consacré l'étude ethnobotanique de l'ephedra ainsi que leur utilisation dans la médecine traditionnelle dans la région de khenchela (est de l'Algérie).
- ❖ Chapitre 2 : Différent métabolites secondaires.
- ❖ Chapitre 3 : leurs activités biologiques.

La deuxième partie : étude expérimental illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail : Des tests phytochimiques préliminaires sont ensuite effectués sur la partie aérienne (les fleurs) de la plante, justifiant notre choix porté sur les alcaloïdes et les composés phénoliques de la plante, en vue de leur extraction et de leur analyse. Et enfin l'application des extraits de l'Ephédra alata alanda. est testé pour leur activité antioxydants, antibactériennes et anti-inflammatoire.

- Elle contient deux chapitres :

- ❖ **Chapitre 1** : Matériel et méthode.
- ❖ **Chapitre 2** : Résultats et discussions.

Enfin, notre travail est ponctué d'une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Première Partie:

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I :

Présentation Du Plant

Etudiée

La famille des

Ephedraceae

I. Généralités sur la plante

La famille des Ephedraceae ne renferme qu'un seul genre « Ephedra », composé d'une cinquantaine d'espèces que l'on rencontre essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales. Elle est rencontrée souvent dans une région désertique, sèche et caillouteuse autour de la Méditerranée et en Californie.

Depuis des siècles ! Ephédra est considérée comme une plante médicinale recherchée pour ses effets sur les affections des voies respiratoires, employée sous le nom d'éphédrine dans les médicaments. Elle pousse en Europe centrale et sur le pourtour Méditerranéen. (Pellay Maryvonne., 2011).



Figure 1: Distribution de la plante Ephedra alata (alanda) dans le monde

I.1. Description botanique

Arbuste ou lianes dioïques, rarement monoïques, cet arbuste de 1 à 3 mètres de haut (Ozenda, 1991).

-Tige : la forme de ses tiges rameuses et cylindriques à coloration vert-jaunâtres, portent des nœuds, des feuilles opposées alternant d'un nœud à l'autre (Derbel et al., 2010) réduites, soudées en gaine à la base (Ozenda, 1991).

-Fleurs : les fleurs, de couleur jaune ressemblent à des petits cônes s'accroissant durant la maturation (Lonut, 2016), sans odeur et à saveur astringente (Derbel et al., 2010) . La plante contient des fleurs femelles regroupées en 2 à 3, ou de manière coopérative, entourées de 2 à 4 paires de bractées, les fleurs mâles en petits chatons axillaires, 2 à 6 anthères sur un filet commun. La floraison a lieu en hiver et au printemps, leur conservation se fait de préférence à l'état frais.



Figure 2: *Ephedra alata*

I.2.systematique

Table 1: Classification botanique de *Ephedra alata* (Ozenda, 1991).

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

1.1.Composition chimiques de la plante :

La Plante *Ephedra alata* est riche en constituants phytochimiques, d'après les recherches de M.peronnet et J.chatin en 1941 sur l'*Ephedra* de l'Afrique du nord dans

lequel découvrir la présence de l'Ephédrine dans les tiges séchées (Ozenda, 1991; Derbel et al., 2010), des alcaloïdes de structure voisine de l'adrénaline et de l'amphétamine, (Derbel et al., 2010) des tanins, des anthocyanes, des flavonoïdes, des cardinolides, des terpènes des stérols et des huiles essentielles (Hegazi et El-Lamey, 2011).

I.3. Les propriétés médicinales d'Ephedra alata :

- Ephedra alata figure parmi les plantes les plus utilisées dans la médecine moderne et ancienne que l'on a trouvé sur le site archéologique datant Neandertal (il ya 60 000 ans).
- Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (Abou rashed et al., 2003).
- Ephedra alata traite plusieurs maladies en Algérie comme la coqueluche, la grippe et la faiblesse générale sous forme de tisane et par inhalations (Ould El Hadj et al., 2003). C'est aussi un décongestionnant employé en usage externe sous forme de gouttes nasales contre les rhumes et en usage interne, comme broncho-dilatateur (Ozenda, 1991).
- Utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par des arômes en Arabie Saoudite (AL-Qarawi et al., 2012).
- Utilisée pour lutter contre le diabète au Maroc (Ghourri et al., 2013).
- En Egypte, Ephedra alata est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatiques et agent astringent (Nawwar et al., 1984) et, aussi dans les maladies diurétiques et vasoconstricteur (Derbel et al., 2010).
- L'Ephédrine est utilisée en oto-rhino-laryngologie et en ophtalmologie (Derbel et al., 2010).

I.4. Nom vernaculaire d'Ephedra alata :

Du grec Ephedros : plante ressemblant aux prêles (Ozenda, 1991)

Table 2: Nom vernaculaire d'Ephedra alata

• Nom arabe	• Alenda • Adam
• Nom Targui ou Berbère	• Timaiart • Arzoum ou Alelga
• Nom Allemand	• Walliser meerträubchen

• Nom Français	• Ephédra
• Nom Anglais	• Ephedra

I.5.Répartition géographique :

L'Ephedra est un petit arbuste originaire d'Asie centrale (chine, Mongolie) y compris l'Arabie Saoudite (**Al-Qarawi et al., 2011**) que l'on trouve aujourd'hui en Europe. Elle est commune dans l'Égypte, Libye et aussi Sahara de Maroc (**Ozenda, 1991**). Cette plante pousse dans les zones désertiques et certaines zones côtières, car elle affectionne les sols sablonneux.

En Algérie, Ephedra alata se trouve au niveau 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**). La wilaya de khenchela, plus précisément la municipalité de Chechar, est riche de la plante médicinale E.alata



Figure 3 : Répartition d'Ephedra alata dans la région de chechar (Khenchela)

I.6.Activités biologiques antérieures

L'Ephedrine constitue la principale substance active d'Ephedra pour traiter plusieurs maladies graves à savoir : cancer, chutes de tension artérielle, maladies inflammatoires, asthme, maladies viralesetc.

L'espèce *Ephedra* renferme des métabolites secondaires, principalement des flavonoïdes qui constituent la catégorie la plus importante de polyphénols, qui sont des molécules très réputées pour leurs vertus antioxydants.

La pseudoéphédrine, un autre constituant présent dans cette plante est encore de nos jours utilisés pour la préparation de médicaments en vente libre destinés à combattre la congestion nasale.

I.7.Toxicologie

Selon **Ma et al., (2007)**, les espèces de l'Ephédra présentent des effets bénéfiques et néfastes. Cette plante est contre-indiquée chez les personnes atteintes de sympathicotomie (sensibilité anormalement élevée du système nerveux sympathique), hypertension ou de la maladie de Basedow (maladie de la thyroïde d'origine auto-immune).

Selon **Peters et al., 2005**, l'utilisation de l'Ephédra est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques.

Les Apiacées (Apiaceae) anciennement appelées Ombellifères, comprennent plus de 3000 espèces réparties dans près de 450 genres. C'est une famille cosmopolite, très commune en montagne mais toutefois assez rare dans les régions tropicales. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres.

Les plantes de la famille des Apiacées sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces, plus rarement des arbustes (**Adida H, 2015**).

Chapitre II :

Métabolites secondaires chez les plantes

II Généralités

Les êtres vivants ont le métabolisme primaire qui fournit les molécules de base tel que : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. ; Les plantes accumulent aussi un grand nombre de composés qui n'y sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel (**Herbert, 1989**).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisés et accumulés en petites quantités par les plantes autotrophes. Beaucoup de métabolites secondaires constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales.

Les métabolites secondaires sont dotés d'une grande diversité structurale et dépassent actuellement 5000 identifiées (**Macheix et al., 2005 ; Ngene et al., 2015**).

La plante Ephédra est une source naturelle de nombreux phytoconstituants incluant des alcaloïdes, des tanins, des saponines, des acides phénoliques, des flavonoïdes et des huiles essentielles (**El-Lamey, 2011**).

II.1.Classification

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (**Hartmann, 2007**) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes: polyphénols; terpénoïdes ; stéroïdes et alcaloïdes (**Hennebelle et al, 2004**).

II.1.1.Polyphénols:

Les composés phénoliques sont des compositions chimiques diverses et sont abondants dans les plantes ; ils se composent d'un ou plusieurs cycles aromatiques à savoir en C6 (les composés phénoliques les plus simples .) en C6_C1(acides hydroxybenzoïques et leur dérivés), en C6_C3 (phenylpropanoïdes, acides hydroxycinnamiques,umbelliferone et ligands) en C6_C3_C6 (flavonoïdes y compris flavonones, flavones, flavonoles ,catéchols,leuco antocyanidines, anthocyanines, anthraquinones, etc) et de composés phénoliques polymériques (les tannins) (**Laid, 2016**).

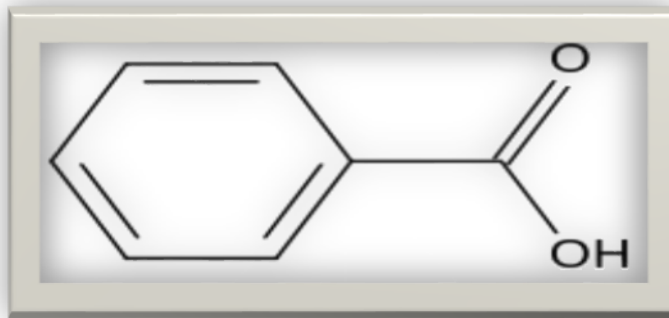


Figure 4 : structure simple d'un polyphenol (Chebrouk, 2009).

II.1.1.1. Classification des polyphénols:

Les composés phénoliques peuvent être classés en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. On distinguera :

- Les dérivés en C₆C₁
- Les dérivés en C₆C₃ sont phenylpropanoïdes.
- Les composés en C₆_C₃_C₆ sont les plus importants (Merghem, 2009).

On distingue les acides phénoliques (phénols simples), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les tannins (Glombitza, 1985; Harborne, 1980; Goodwin, 1988; Porter, 1989; Boros, 2010).

II.1.1.1.1 Les polyphénols monomériques (PPM) :

II.1.1.1.1. Acides phénoliques:

Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (Haslam, 1994). Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (Pandey et Rizvi, 2009).

II.1.1.1.2. Acides phénols dérivés d'acide benzoïque :

Sont des hydroxybenzoïques et ont une structure générale de base de type (C₆- C₁), ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar, 2012). Les plus répandus sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

II.1.1.1.3.Acides phénols dérivés d'acide cinnamique :

- **Acides chlorogéniques :**

Les acides chlorogéniques sont identifiés essentiellement chez: les artichauts, café, pomme de terre..., sont caractérisés par des propriétés antioxydantes et anti radicalaires, comme ils jouent un rôle dans la prévention in-vitro des maladies cardiovasculaires et du diabète type II (**Yeza. S et Bouchama. S ; 2014**).

II.1.1.2.Intérêt thérapeutique des poly phénols :

- ❖ Les poly phénols, groupe de molécules de structures variées, trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie.
- ❖ Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de bénéfices qu'il pourraient apporter en terme de prévention des maladies liées au vieillissement : infarctus du myocarde, cancer, maladies neurodégénératives (**hennebelle T et al., 2004**).
- ❖ Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésique (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (**Iserin et al., 2001**).

II.1.1.3Activités biologiques des polyphénols

Chez les plantes, les polyphénols ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement, en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance ; ils protègent la plante contre les radiations UV et participent à deux principaux processus : la photosynthèse et la respiration.

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent les insectes pollinisateurs, ou servent au contraire pour éloigner les prédateurs (**Merghem, 2009 ; Bouguendoura, 2011 ; Khelfallah, 2013**).

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

Selon **Khelfallah, (2013)**; la consommation d'aliments riches en polyphénols réduit l'incidence de nombreuses pathologies, telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999 ; Hanhineva, 2010**).

II.1.2. Les flavonoïdes

Ce sont les groupes les plus représentatifs des composés phénoliques. Ces molécules ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbone qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (**Yao et al., 2004**), (**Figures 2 et 3**). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux. Actuellement, environ de 4.000 composés flavoniques sont connus (**Edenharder et Grünhage, 2003**).

En se fondant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes: Anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronnes (**Havsteen, 2002; Edenharder et Grünhage, 2003**).

II.1.2.1. Certaines propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé.

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 antioxydants, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives(

- Protéger les plantes contre les radiations UV.

- Sont à l'origine des goute amer (**Yang.R.Y.,Lin.S., et Kuo.G., 2008**).

- Réguler l'élongation des tiges.

- Intervenir dans la maturité des fruits.

- Ce sont des éléments essentiels dans le processus de la défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.

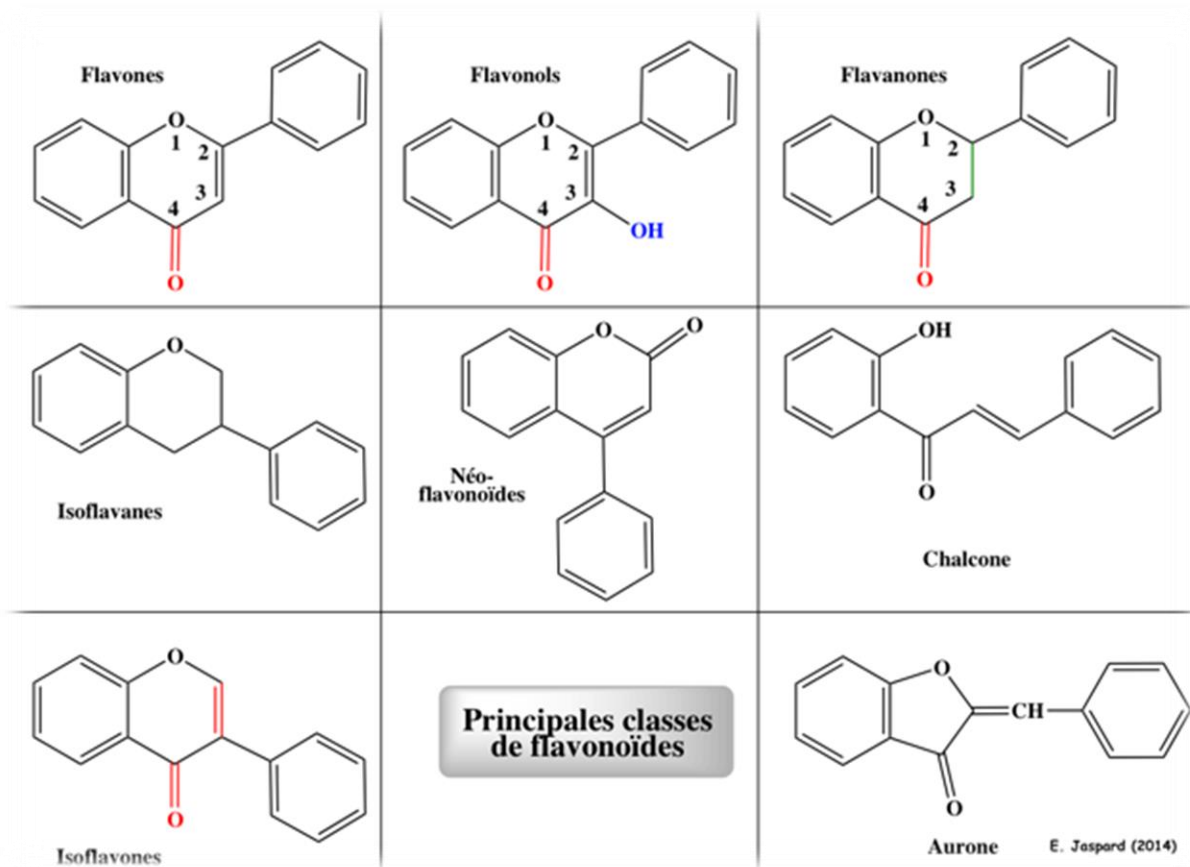


Figure 5: Principales classes de flavonoïdes (Rice-Evans et Miller, 1996).

II.1.3. Les tannins

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques très répandus dans le règne végétal, (Ghestem *et al*; Khanbabae et Ree, 2001), hydrosolubles de masse molaire entre 500-2000D. Sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes distincts : Les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Mueller- Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999; Hagerman, 2002). Sont présents dans les plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales, légumineuses et les fruits (Peronny, 2005).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes et les animaux herbivores (Khanbabae et Ree, 2001) en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes (Peronny, 2005). Les tannins jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agressions (Khanbabae et Ree, 2001).

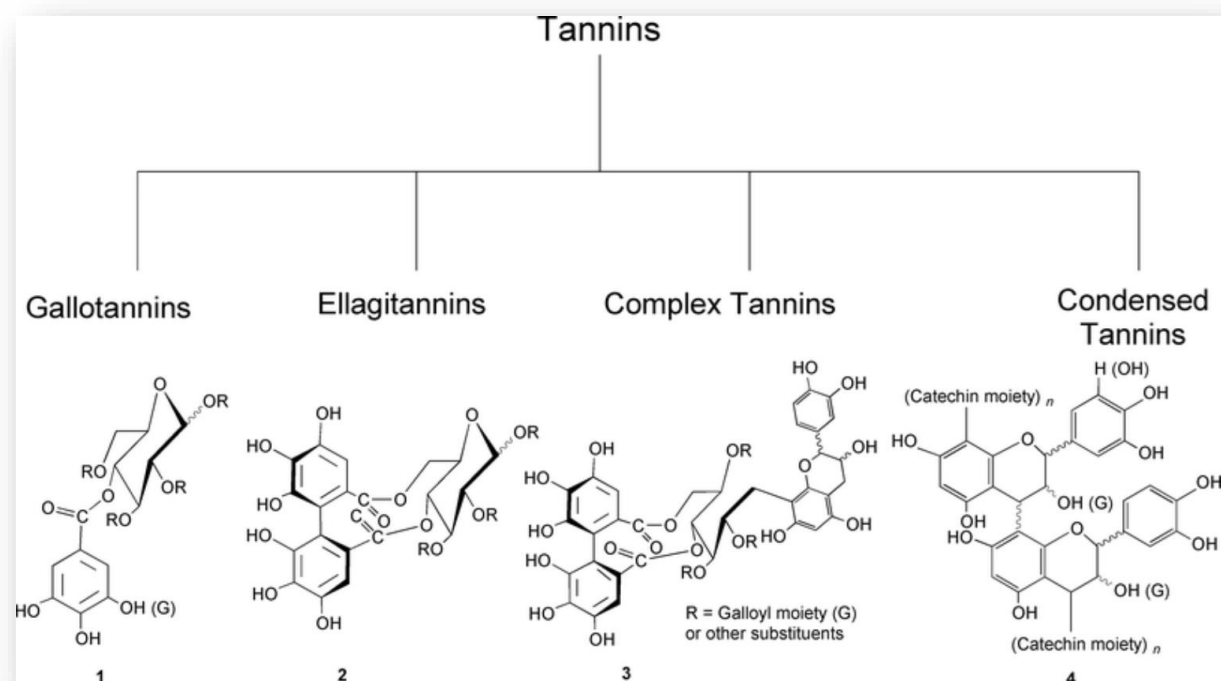


Figure 6: Différentes structures des tanins (Karamali et Teunis., 2001).

II.1.4. Les coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles aromatiques, dotées d'une odeur qui se rapproche de la vanilline, elles sont utilisées surtout en parfumerie. Elles sont présentes sous forme libre ou hétéroside dans la plupart des familles de dicotylédones. Elles préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson et al., 1996).

On trouve des coumarines simples chez les Oléacées, Loganiacées et Solanacées, et des coumarines complexes chez les Apiacées, Fabacées, Astéracées, Moracées, Rosacées, Rubiacées et Rutacées (Bruneton, 2009).

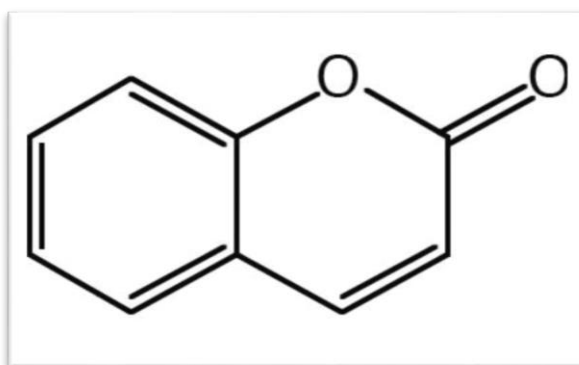


Figure 7: Structure d'une molécule de coumarine (Cowan, 1999).

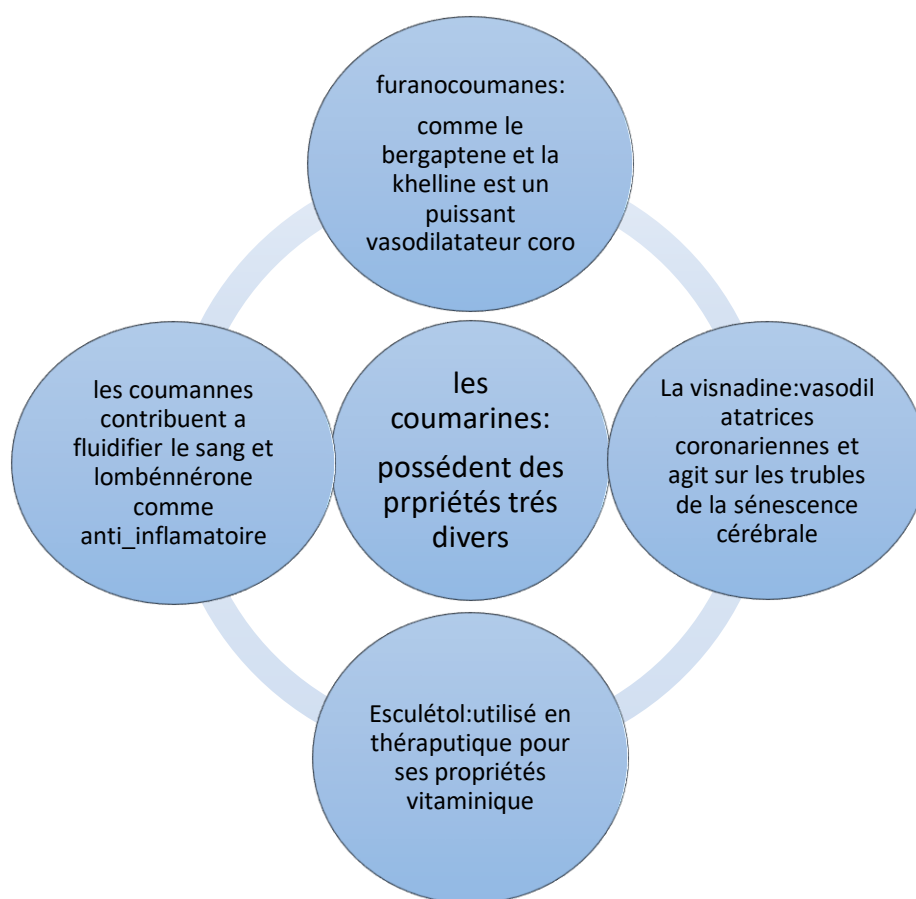
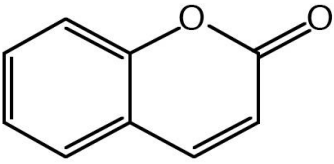


Figure 8 : divers propriétés des coumarines.

Table 3 Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

structure	R6	R7	R8	Acide phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aesccultol

	OCH ₃	OH	H	Scopolétol
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

II.1.5. Les alcaloïdes

Le terme « alcaloïde » a été introduit par W. Meissner au début de XIX^e siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, et fournissent, avec les acides, des sels.

Ce terme provient de la combinaison de « al kali » (la soude) et de « eidos » (l'aspect). Les alcaloïdes sont nommés, d'après la plante qui les a fournis, avec une terminaison en « ine » (**Bruneton, 1999 ; Bougandoura, 2011**).

On trouve les alcaloïdes principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et certains microorganismes. Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté, sauf pour quelques substances dans lesquels l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine) (**Judd et al., 2002**), plusieurs classes sont définies selon leur biogénèse et la position de l'azote.

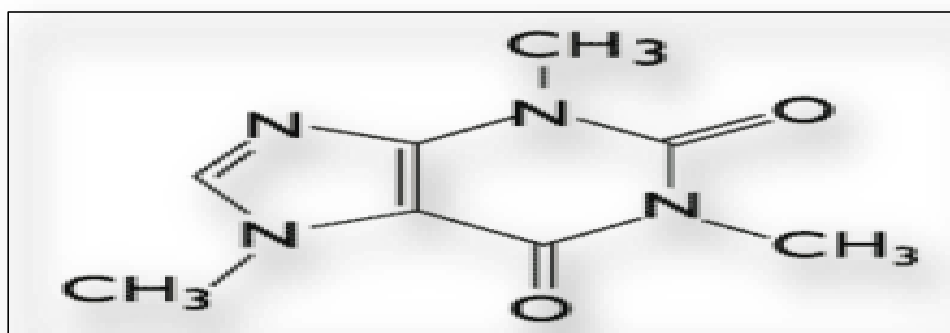


Figure 9: structure des alcaloïdes (**Chebrouk, 2009**).

II.1.5.1. Biosynthèse des alcaloïdes

La synthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, les alcaloïdes se concentrent ensuite dans la vacuole. De façon générale, la production d'alcaloïdes s'observe dans les tissus en voie de croissance (jeunes racines, jeunes feuilles ...).

Selon **Kebili (2016)**, le précurseur des alcaloïdes vrais est un acide aminé : histidine, ornithine, lysine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, acide anthranilique. La formation de l'alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé (hygrine), de deux molécules de même acide aminé

(quinolizidines), plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé (spartéine). Les réactions d'oxydation, d'estérification, d'alkylation, d'éthérifications, etc., justifient la diversité structurale des alcaloïdes. Dans le cas particulier des alcaloïdes terpéniques, les précurseurs ont une origine terpénique (**Bruneton, 2009**).

5.3. Propriétés physicochimiques selon (Fabre et truhaut, 1961 ; Bruneton, 1999 ; Axel et al., 2001).

- PM inférieur à 1.000.
- Les alcaloïdes non oxygénés et de faible masse moléculaire sont des liquides entraînés à la vapeur d'eau, les alcaloïdes oxygénés ou de masse moléculaire élevée sont généralement des solides cristallins.
- Rarement colorés (berbérine de couleur jaune).
- Leur saveur est amère.
- En générale, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (chloroforme, alcools, acétone).
- Capable de dévier la lumière polarisée.
- Peuvent être fixés sur certains agents adsorbants tels que les charbons actifs ou les argiles du type bentonite.

II.1.5.2. Activités biologiques des alcaloïdes

Les plantes utilisent les alcaloïdes dans leur système de défense contre les herbivores et les prédateurs à cause de leur amertume et toxicité ; ils pourraient être des produits d'excrétion du métabolisme azoté, et jouent un rôle de l'urée (**Guignard et al., 2002 ; Merghem, 2009**).

Chez l'homme, les alcaloïdes ont un rôle très important dans la stimulation du rythme cardiaque (le sel de sulfate de spartéine, isolée de *Cytisus scoparius*), ils sont également utilisés pour provoquer la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement, dans le traitement de l'asthme bronchique et comme médicament analgésique et antiallergique (l'éphédrine, isolée d'*Ephedra alata*), ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (La berbérine, isolée de *Berberis vulgaris*), et sont utilisés dans

le traitement de la maladie d'Alzheimer (la galanthamine agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinesterase) (Mauro, 2006).

II.1.6.les terpènes et stéroïdes:

II.1.6.1.Les terpènes

Les terpènes sont des substances de consistance huileuse ; c'est une vaste famille de composés naturels (près de 15.000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles), leurs grandes diversités sont dues au nombre de base qui constituent la chaîne principale de formule $(C_5H_8)_n$ selon la variation de nombre n, dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes (Wchtil, M. & Anton, R. 2003).

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, et possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique (hopkins, W. G 2003). Ces molécules présentent en forme d'huiles essentielles, parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (hopkins, W. G 2003).

Les terpénoïdes constituent une classe importante de plus 10.000 composés qui déterminent également l'activité pharmacologique des plantes médicinales (Zian, 2016). Ce sont hydrocarbonés naturels, formé de l'assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques (Merghem, 2009).

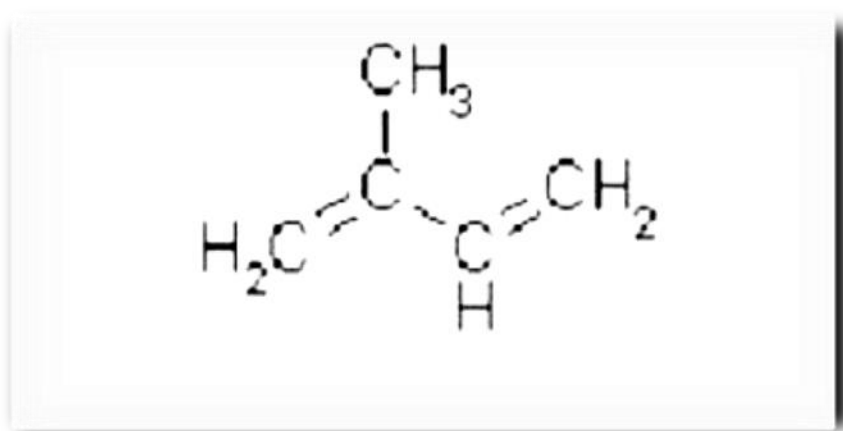


Figure 10: Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia et al., 2007).

II.1.6.1.1. Classification des terpènes.

II.1.6.1.1.1. Les monoterpènes.

Ils comportent dix (10) atomes de carbone et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage «tête-queue» (Ayad, 2008).

II.1.6.1.1.2. Les diterpènes:

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C₂₀) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène (Malecky, 2005).

II.1.6.1.1.3. Les sesquiterpènes:

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones (Malecky, 2005).

II.1.6.1.2. Les triterpènes et stéroïdes:

Ces composés en C₃₀ (n=6) sont très répandus (Merghem, 2009), issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du scalène (Krief., 2003).

II.1.6.1.3. Les polyterpènes:

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène (plus de C₄₀). Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans, Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien (Malecky, 2005).

II.1.6.2. Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques. Ils sont synthétisés à partir d'un triterpène acyclique, le squalène, bien qu'ils soient généralement modifiés et qu'ils possèdent moins de 30 atomes de carbone (Gerhenson et Croteau, 1991).

II.1.7. Saponosides

Le terme de saponoside est dérivé de la saponaire (*Saponaria*) qui était jadis utilisée comme substitut du savon, les saponosides sont des terpènes glycosylés, ils peuvent être des stéroïdes glycosylés ou des hétérosides triterpéniques, comme ils peuvent être trouvés sous forme d'aglycones (ou génines; ce sont des composés terpéniques ne possédant pas de glucides) appelés **sapogénines**.

La combinaison d'un triterpène hydrophobe et d'un glucide hydrophile confère aux saponosides des propriétés tensioactives ou de détergent, qui lorsqu'ils sont agités avec de l'eau produisent une mousse savonneuse (**William, 2003**).

Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens. Les interactions mises en jeu avec les stérols de la membrane ont pour conséquence des propriétés hémolytiques et une activité spermicide de certaines molécules.

Elles sont toxiques pour les animaux à sang froid et en particulier pour les poissons et les mollusques. Certaines drogues à saponosides sont utilisées pour leurs propriétés antitussives (rhizome de la réglisse), mais aussi anti-oedémateuses (cotylédons de la graine de Marronnier d'Inde) ou encore analgésiques (*Platycodon grandiflorum*) (**Sabrina, 2003**).

II.1.8. Les anthocyanes

Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits soit en bleue, rouge, violette, rose. (**Yarnell, E., 2006**) sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire, mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires (**Hennebelle et al., 2004**).

II.1.8.1. Utilisation thérapeutique des anthocyanes

Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, et vasoprotectrices.

Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leurs résistances. (**Yarnell, E., 2006**).

Chapitre III:

Les activités

biologiques

III. Les activités biologiques

III.1. Activité antioxydant

III.1.1. Stress et radicaux libres

III.1.1.1. Le stress oxydatif

L'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit à des dégâts structuraux et fonctionnels. Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées tels que les radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe (Jan, 2004).

Table 4 Molécules du stress oxydatif

Nomenclature	Structure	principales réactions
Superoxyde	$\bullet\text{O}=\text{O}-$	Catalyseur de la réaction de Haber-Weib par recyclage de Fe^{2+} et Cu^{+} ; formation du peroxyde d'hydrogène et peroxydinitrite
Peroxyde d'hydrogène	$\text{HO}=\text{OH}$	Formation du radical hydroxyle ; inactivation d'enzymes ; oxydation de biomolécules
Ozone	$-\text{O}=\text{O}+=\text{O}$	Oxydation de biomolécules, spécialement celles contenant des doubles liaisons, formations des ozonides et des aldéhydes cytotoxiques
Radical hydroxyle	$\bullet\text{OH}$	abstraction de l'hydrogène, production de radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols
Oxygène singulet	$\bullet\text{O}=\text{O}$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides
Oxyde nitrique	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formation de peroxydinitrite, réaction avec autres radicaux

Peroxynitrite	O=N=O=O-	Formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques, conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, oxydation des biomolécules
Hypochlorite	ClO-	Oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore
Radical	R•	abstraction de l'hydrogène, formation des radicaux peroxy et autres radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules
Radical peroxy	R=O=O•	abstraction de l'hydrogène, formation des radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules
Hydroperoxyde	R=O=OH	Oxydation de biomolécules, destruction de membranes biologiques
ions fer et cuivre	Cu²⁺, Fe³⁺	Formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et Haber-WeiB

III.1.1.1.1. Les conséquences du stress oxydant

La production de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

III.1.1.1.1.1. peroxydation lipidique

III.1.1.1.1.2. peroxydation lipidique :

Les lipides, et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical pyroxydé.

III.1.1.1.3. Les maladies liées au stress oxydatif : (Favier, 2003)

Le stress oxydatif est impliquée dans des plusieurs maladies lorsque il apparaît des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, donc il sera le principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdèmes pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydatif aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Il joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes: augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (prostacycline, cytokine, facteur de fibrinolyse, superoxyde, NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses.



Figure 11 : Quelques maladies liées au stress oxydatif (2).

III.2.1.2 Radicaux libres

Les radicaux libres sont produits dans le cadre de processus métaboliques normaux sous les conditions physiologiques. Le système antioxydant est un système de défense responsable de contrôler

étroitement la production de ces radicaux au niveau cellulaire. Cependant, une surproduction de radicaux libres d'un côté et (ou) une déficience du système antioxydant de l'autre côté, conduira à une augmentation significative de la production de ces radicaux, qui submergent la défense (Sies, 1997) antioxydant et imposent un stress oxydatif pour le système physiologique (Martínez-Cayuela, 1995).

Il existe deux types de radicaux libres

1. Radicaux primaires

Sont des composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} .

.D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène (ERO)**.

2. Radicaux secondaires

Ils sont formés par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier., 2003).

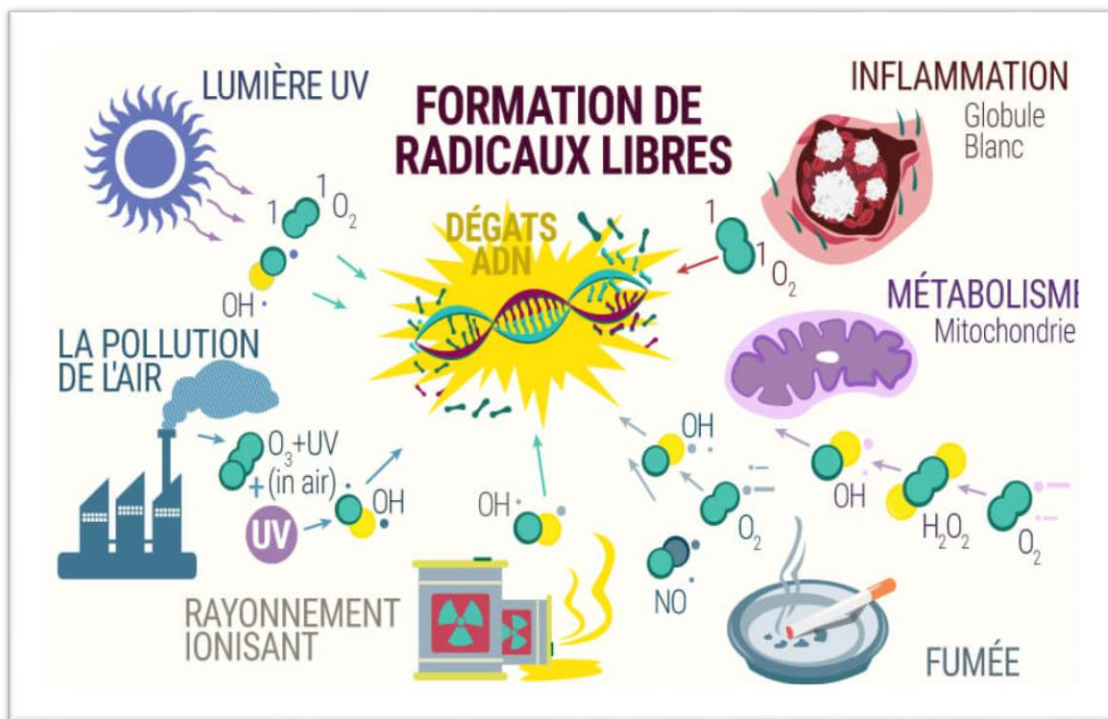


Figure 12: formation de radicaux libre (3).

III.1.1.2. Les sources importantes des radicaux libres

Les sources des radicaux libres soit endogènes ou exogènes sont les suivantes :

- ✓ **mécanismes de cycles redox** : que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines.
- ✓ **Les métaux toxiques** (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 , par une réaction appelée **réaction de Fenton**. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer.
- ✓ **Les rayonnements** : sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photo sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions super oxydes et de l'oxygène singulet (**Alain Favier. ,2003**).

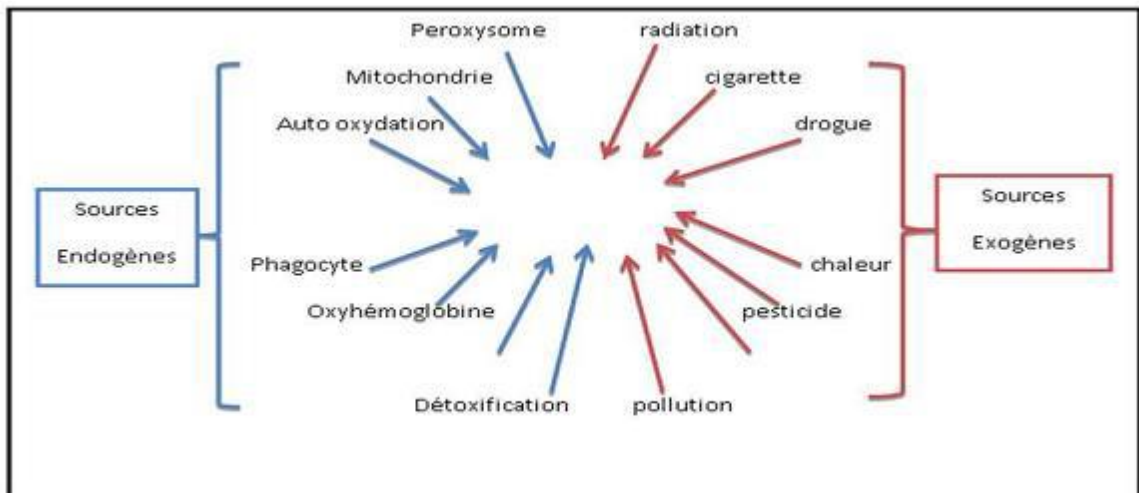


Figure 13: Les principales sources des ERO (**Humblert ; Godeau, 2005**).

III.1.1.3. Comment et par qui contrôlé les radicaux libres :

Comme tous les mécanismes consomment beaucoup d'énergie et passent vers plusieurs stratégies, la cellule va contrôler le niveau d'espèces réactives de l'oxygène.

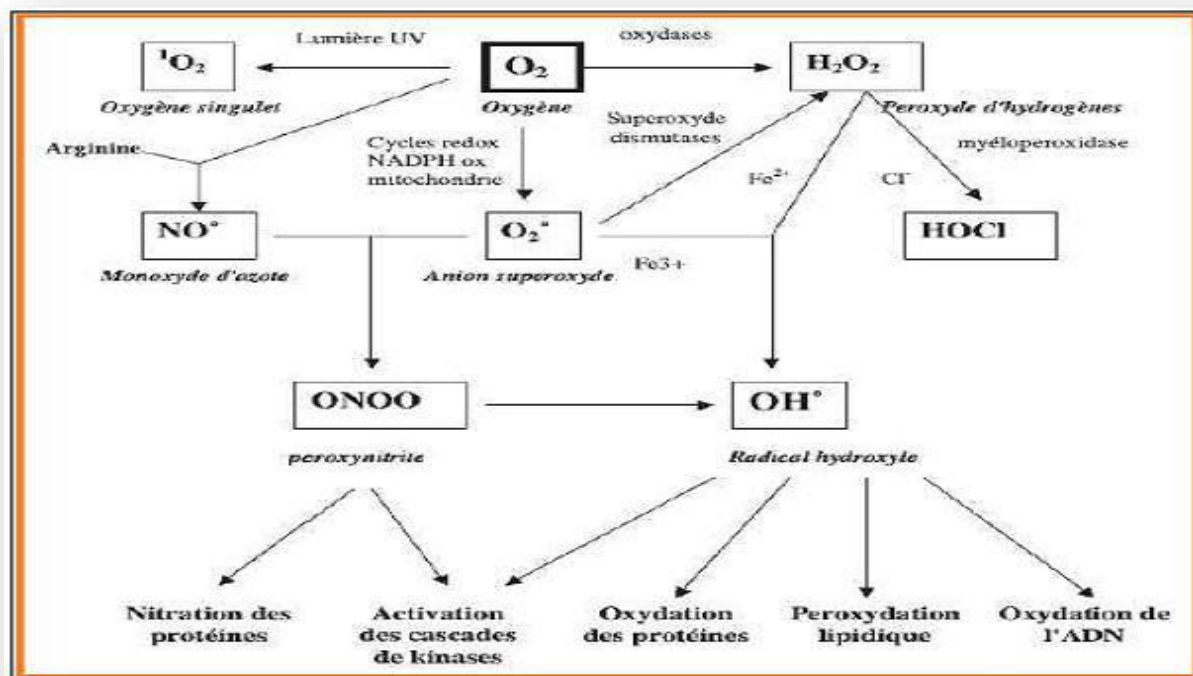


Figure 14: Radicaux libres : métabolites dérivés de l'oxygène (Favier, 2003).

III.1.2. Différentes formes des antioxydants :

III.1.2.1. Antioxydants synthétiques :

Selon Safer et Al-Nughamish, 1999 et Lisu *et al.*, (2003) , les antioxydants de synthèse (butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone TBHQ) sont très utilisés notamment en industrie alimentaire dans le but de prolonger la durée de conservation.

Des études ont montré que les antioxydants synthétiques doivent être remplacés par des antioxydants naturels, parce que certains antioxydants de synthèse ont montré des effets néfastes pour la santé, et plus particulièrement des effets cancérogènes possibles. Par conséquent, il est impératif de trouver une alternative pour pallier ce problème ; en cherchant de nouvelles sources d'antioxydants sains et peu coûteux d'origine naturelle dans le but de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques pour remplacer les antioxydants de synthèse (Safer et Al-Nughamish, 1999).

L'intérêt croissant pour la substitution des antioxydants alimentaires synthétiques par des matières naturelles favorise le dépistage de nouveaux antioxydants à identifier dans les sources végétales (Moure *et al.*, 2001).

III.1.1.2 Les antioxydants naturels :

Ce sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (**Diplock, 1991**). Ils sont classés en deux : anti oxydant naturel enzymatique et anti oxydant naturel non enzymatique.

III.1.1.2.1. Anti oxydant enzymatique :

C'est la première ligne de défense de notre organisme contre les dommages ROS, cette défense permet de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elle possède une grande affinité pour les ROS, avec laquelle elle réagit très rapidement pour les neutraliser (**Hamadi, 2009**). Antioxydant enzymatique : la glutathion peroxydase et réductase (GSHPX), L'hème oxygénase, les catalases, les superoxydes dismutases (SOD), les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR).

III.1.1.2.2. Anti oxydant non enzymatique :

L'organisme utilise des substances pour se protéger contre les radicaux libres ; tel que la vitamine C, la vitamine E, Glutathion, les oligoéléments, acide urique, les caroténoïdes et les composés phénoliques.

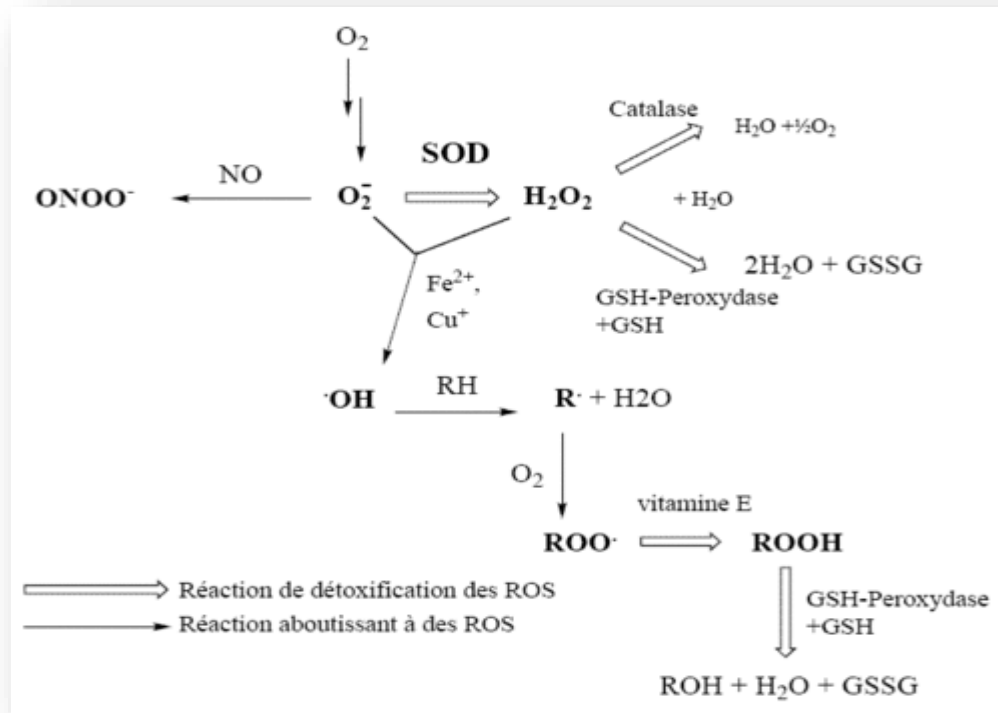


Figure 15: différents antioxydants naturels enzymatique et non enzymatique (1).

III.2. L'activité anti bactérienne

III.2.1. Généralités sur les bactéries

L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries. Sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas des membranes nucléaire. Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent au régné Bactéria

Les bactéries sont, en général, divisés en deux : bactéries proprement dites (Bactéria) et bactéries primitives. On peut avoir au microscope optique à l'état frais ou après coloration et en détaille sur microscope électroniques (**Boulberhane Saoussene, Nabti Hichem., 2017**).

Généralement le diamètre des bactéries est inférieur à $1\ \mu\text{m}$.il y a plusieurs formes : sphérique (cocci), bâtonnets (bacilles), incurvées (vibrions) et spiralées (spirochètes).

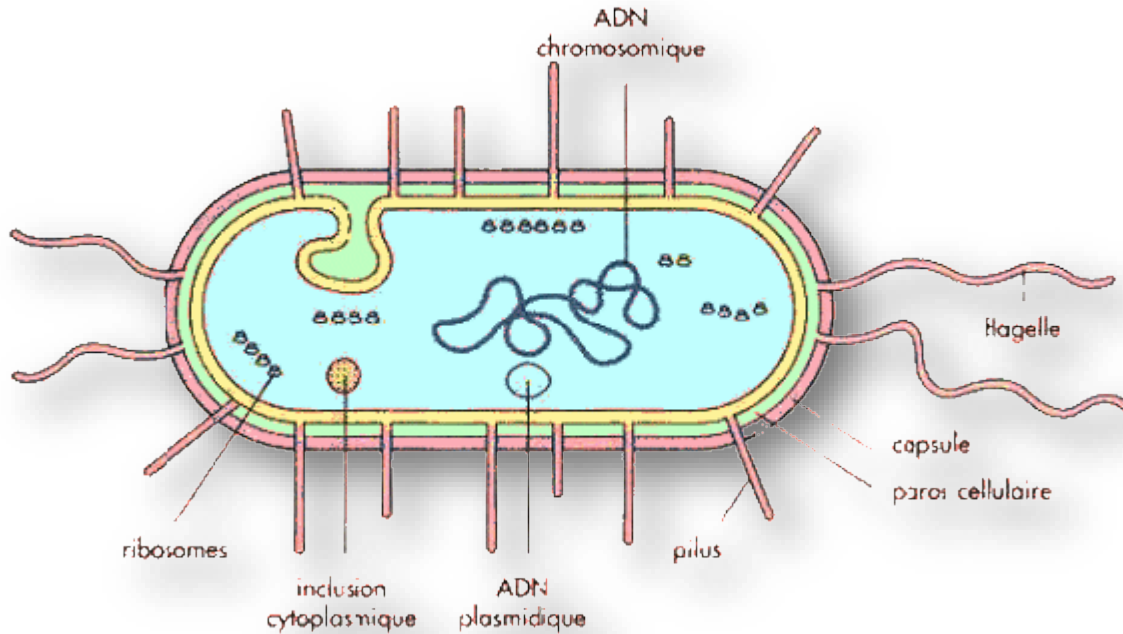


Figure 16: la forme générale de la bactérie.

III.2.2. Les milieux de culture des bactéries :

Pour cultiver les bactéries on a deux milieux différents, liquide ou solide

- **Milieu liquide :**

Par exemple le bouillon, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble.

- **Milieu solide :**

Comme l'agar sont solidifiés à des températures inférieure à 40°C et à la propriété de fondre à l'ébullition.

III.2.3. Description des quelques bactéries étudiées.

III.2.3.1. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus gram positif) (Boulberhane Saoussene, Nabti Hichem., 2017) Sont des bactéries qui habitent soit dans l'être humain soit dans les animaux Les staphylocoques impliquées dans des plusieurs pathologies variées et de gravité diverse : soient des commensaux occasionnels, permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, peuvent causer des infections (intestinales, des

plaire et de sang).Elles sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (eaux non traitées, sols, objets souillés).

- Elles peuvent être contractées en dehors de l'hôpital.
- Elles acquièrent facilement des résistances aux antibiotiques, en particulier à la méthicilline et à la pénicilline (Avril J.L et al., 2000; Ibiri P .M. 2005).

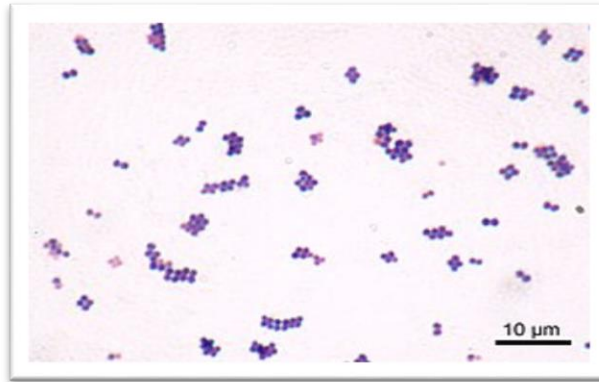


Figure18 : Staphylococcus aureus.

III.2.3.2 Escherichia coli

(gram négatif) (Boulberhane Saoussene, Nabti Hichem., 2017)

C'est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. Appelée également colibacille et abrégée en E.coli, elle compose environ 80% de notre flore intestinal aérobie. Ce microorganisme peut devenir pathogène et peut provoquer des infections urinaires, biliaires, intestinales et génitale (Flandrois J.P. 1988 ; Leclerc H. 1993).

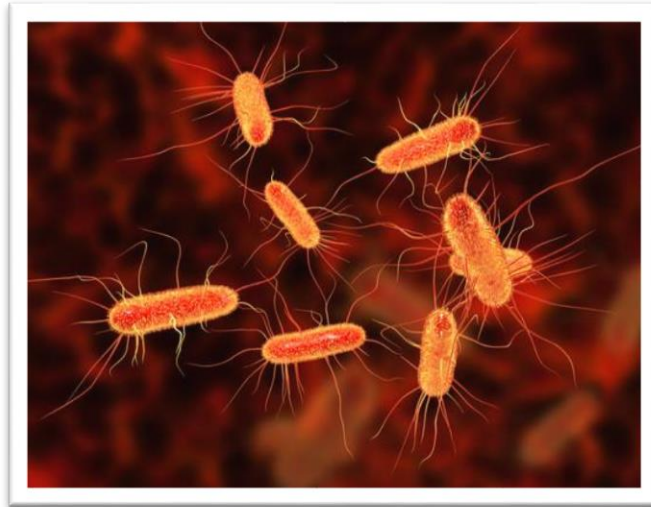


Figure19 : Escherichia coli.

III.2.3.2. Pseudomonas aeruginosa :(A. Chaibdraa et al., 2008).

- Les pseudomonas est un agent pathogène à l'origine d'infections nosocomiales graves dans les centres brûlés (Avril J.L et al., 2000).
- Chef de file des bacilles à gram négatif non fermentant, aérobies strictes, il se développe plus facilement dans un environnement humide (Hamad E. 2002 ; Plotowski M. C. 1987).
- Le pseudomonas est naturellement résistant à nombreux antibiotiques.
- Il possède également la capacité d'acquérir très rapidement d'autres résistances soit par mécanisme enzymatique (imipénémase) soit non enzymatique (impermeabilité) (Ibiri P .M. 2005).

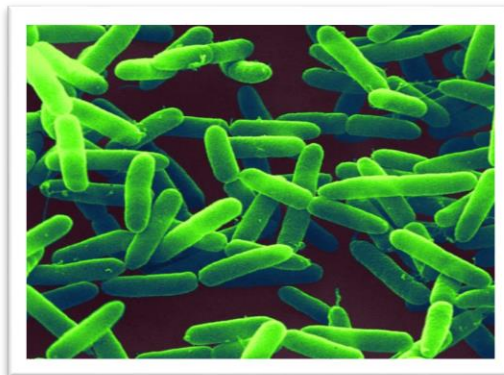


Figure 20 : pseudomonas aeruginosa.

III.3 Activité anti-inflammatoire :

III.3.1. Définition de l'inflammation :

Les réactions inflammatoires sont induites par les infections microbiennes et virales; l'exposition aux allergènes, les radiations et les produits chimiques toxiques, les maladies auto-immunes et chroniques, l'obésité, la consommation d'alcool, l'utilisation de tabac, et une alimentation riche en calories (**Bayala, 2014**).

L'inflammation est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression d'origine exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) ou endogène (cellule cancéreuses ou pathologies auto-immunes), dont le but d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires et favoriser le retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Ryan et Majno, 1977 ;Iwalewa et al., 2007 ;Barton,2008**).

D'une autre part l'inflammation est considérée comme une source importante des radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, au cours de la phagocytose (**Barton, 2008**).

III.3.2. Type d'inflammation

III.3.2.1. Inflammation aigue

- L'inflammation aigue est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle dure de quelques semaines.
- Il peut être divisé en trois grandes phases :
 - ✓ Phase vasculaire immédiate.
 - ✓ Phase cellulaire consécutive.
 - ✓ Phase de résolution et de cicatrisation (**Weill et al., 2003 ; Charles et al., 2010**).

III.3.2.2 Inflammation chronique :

Définie par la présence de cellules immunitaires (**Iwalewa et al., 2007 ; Charles et al., 2010**).

III.3.3 La réponse inflammatoire :

C'est un processus habituellement bénéfique, son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires (**Weill et al., 2003**).

III.3.4. Activité anti-inflammatoire**III.3.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens(AINS) sont des médicaments aux propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (**Cuvillon et Viel., 2009**).

III.3.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucorticoid Response Element) (**Barnes, 1998 ; Rhen et Cidlowski 2005**).

III.3.3.3. Anti-inflammatoires naturel :

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans les plantes médicinales est très vaste, et leurs spectre d'activité est tout aussi grand (**Barnes, 1998**).

Deuxième Partie:

Étude

Expérimentale

Chapitre I:
Matériels Et
Méthodes

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des feuilles de l'espèce *Ephedra alata*.

La récolte s'est effectuée le 01/04/2019 au niveau de la localité Chechar. Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures.

Après séchage, les fleurs de la plante ont été broyées et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leur analyse.



Figure21 : Carte géographique représente la localisation d'obtention de plante *Ephedra alata* (Chechar - Khenchela).

I.1.1. Matériels et produits

a) Matériels et appareillages

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

b) Solvants utilisés

- Méthanol
- L'eau distillée

I.1.1.1. Mode opératoire

100g de la matière végétale (l'éphédra alata) est soumise à une extraction par macération dans le mélange :

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

I.1.1.1.1. La macération

Les fleurs séchées (100 g) ont été, acérées dans une solution hydroalcoolique à raison de 7/3 pendant 24 heures ; cette opération est répétée trois fois jusqu'à épuisement de la matière végétale.

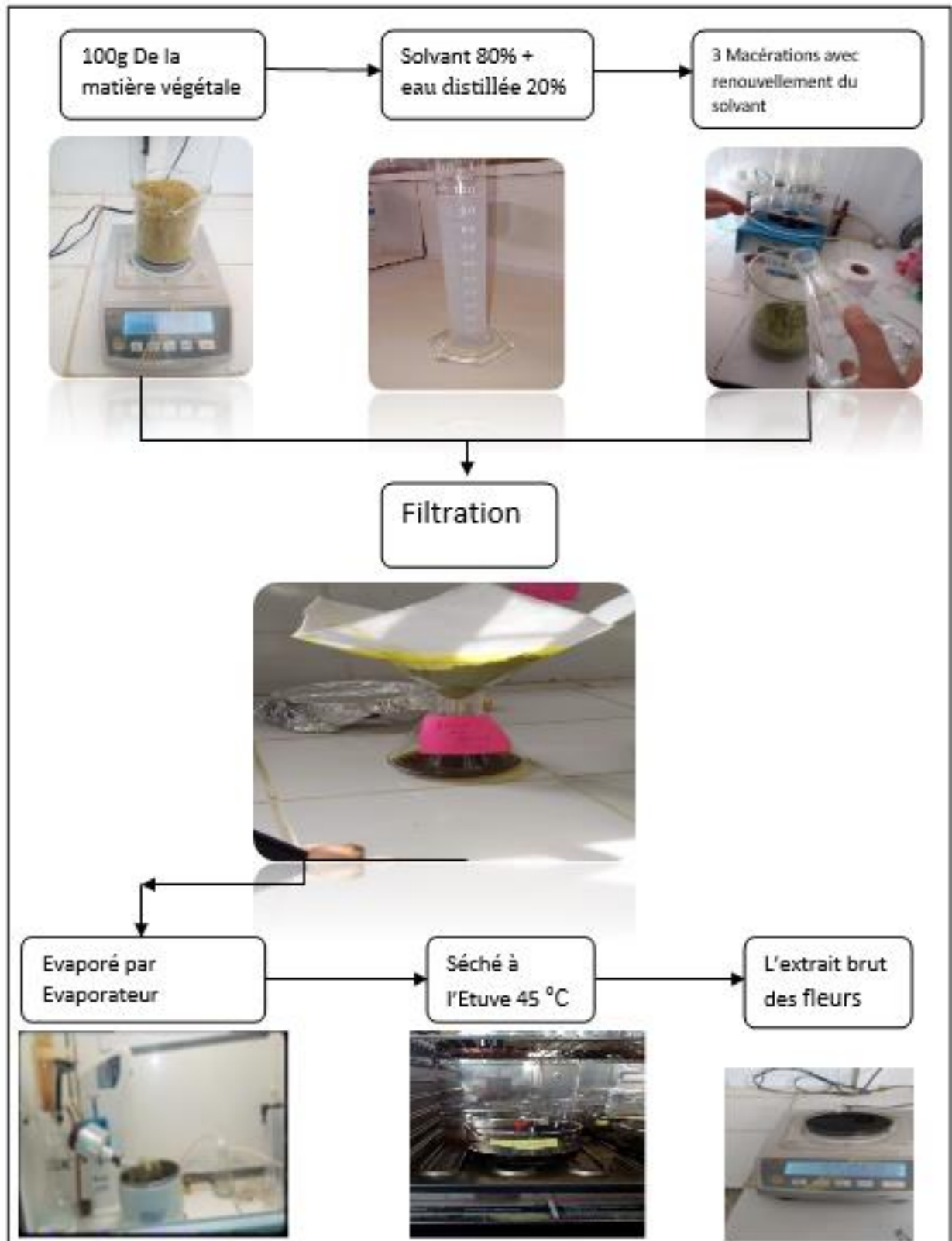


Figure 17: Protocole d'extraction solide liquide.

I.2. Analyse qualitative :

I.2.1. Etude phytochimique :

L'extrait visqueux des fleurs d'*Ephedra alata* a subi différentes tests chimique afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des principales familles de métabolites secondaires.

I.2.1. test des flavonoïdes

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

I.2.2. test des alcaloïdes : test de Mayer

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

I.2.3. test des triterpènes et stéroïdes

100 mg d'extrait ont été dissouts dans 3ml de chloroforme et 5 gouttes d'anhydride acétique et acide sulfurique concentré y ont été ajoutées. La formation d'une phase rouge-violacée a indiqué la présence des triterpènes, alors que le développement d'une coloration bleue à l'interface a indiqué la présence des stéroïdes (**Bruneton, 1999**).

I.2.4. test des composés phénoliques

0.1g de l'extrait a été dissout dans 3 ml d'éthanol et 5 gouttes de FeCl₃ y on été ajoutées. Le développement de la coloration verdâtre a indiqué la présence des phénols. La présence des composés phénoliques a été marqué par l'apparition de la coloration bleue-verdâtre (**Bruneton ,1990**).

I.2.5. test des saponines

100 mg d'extrait ont traduit dans un tube é essai contenant 5 ml d'eau distillée, l'ensemble a été chauffé pendant 5 min. Après refroidissement et filtration, 10 ml de filtrat a été introduit dans un second tube à essai et agités pendant 1 min. Après 15 min de repos l'épaisseur de la mousse a été mesuré là l'aide d'une règle graduée. Une hauteur de mousse d'au moins un centimètre a indiqué la présence des saponines (**Bruneton ,1990**).

I.2.6. test des tanins

100 mg d'extrait ont été dissouts dans 5 ml d'eau distillée et la solution a été chauffée pendant 5 min . Après refroidissement et filtration, 4 gouttes de chlorure de fer 0.5 % ont été ajoutés à 2 ml de filtrat. La présence des tanins a été indiquée par la formation d'un précipité bleu (Bruneton ,1990).

I.2.7. test des anthraquinones

0.1 g d'extrait a été ajouté à 4 ml du mélange éther-chloroforme. La solution ainsi obtenue à été avec 4 ml de soude 10 % et l'apparition d'une coloration rouge a indiqué la présence des anthraquinones (Bruneton ,1990).

I.2.8. test des anthocyanines

0.1 g a été ajouté à 5 ml d'une solution d'acide sulfurique 10 %. L'apparition de coloration orange a montré la présence des anthocyanines (Bruneton, 1990).

I.2.9. test de coumarines

100 mg d'extrait ont été dissouts dans 3 ml de méthanol contenu dans un tube à essai, puis le tube a été recouvert d'un morceau de papier imbibé d'une solution de soude 10 %. La présence de la fluorescence jaune-vert à l'UV (254 nm) a révélé la présence des coumarines (Bruneton, 1990).

I.3. Les activités biologiques

I.3. tests anti inflammatoire

I.3.1.préparation des 4 solutions

➤ Solution 1

- Dans un 1^{er} tube

$$\left\{ \begin{array}{l} 450 \mu\text{l de BSA}(5\%= 0.5 \text{ g de BSA dans } 5 \text{ ml d'eau distillée}) \\ + \\ 50\mu\text{l d'extrait (0.25 mg /ml)} \end{array} \right.$$

➤ Solution 2 : contrôle test

- Dans un 2^{ème} tube

$$\left\{ \begin{array}{l} 450 \mu\text{l de BSA}(5 \%) \\ + \\ 50 \mu\text{l d'eau distillée} \end{array} \right.$$

➤ **Solution 3 : contrôle produit**

- **Dans un 3^{ème} tube**
- | | |
|---|------------------------------|
| { | 450 µl d'eau distillée |
| | + |
| } | 50 µl d'extrait (0.25 mg/ml) |

➤ **Solution 4 : standard**

- **Dans un 4^{ème} tube**
- | | |
|---|------------------------------------|
| { | 450 µl de BSA |
| | + |
| } | 50 µl de médicament « Diclofenac » |
- tel que : (0.25 mg de médicament diluée dans 1 ml d'eau distillée)

2-incubation, refroidissement, et lecture des absorbances

- les 4 tubes qui contiennent les solutions préparées ont été incubées à 37 °C pendant 20 min ;
- une deuxième incubation a été effectuée à 57 °C pendant 3 min ;
- le refroidissement des 4 tubes a été réalisé;
- un volume de 2.5 ml de la solution phosphate buffer saline a été ajouté dans les 4 tubes ;
- l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre UV-visible à 416 nm ;

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - [(DO \text{ de la solution essai} - DO \text{ de la solution contrôle produit}) / DO \text{ de La solution essai} * 100]$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le Diclofenac de sodium (250 µg/ml).

I.3. L'activité antibactérienne**I.3.1. Les souches testées**

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

Table 5: Les souches bactériennes utilisées.

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

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

I.3.2. Matériels et produits

a) Matériels et appareillages

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

b) Produits Chimique

- Miller Hinton
- Agar
- L'eau physiologie

I.3.3. Mode opératoire

➤ Stérilisation du matériel

a) Four pasteur

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

b) L'autoclave

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

I.3.4. L'antibiogramme :

❖ Repiquage des souches bactériennes

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

❖ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler Par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile (Annexe 2) à 0.9 %, bien homogénéiser la suspension bactérienne , son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland(**Bouchouka,2016**).

❖ Préparation les boîtes de pétri

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

❖ Ensemencement

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

❖ Préparation des dilutions de l'extrait

une série de dilutions ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$) de l'extrait méthanolique (MeOH) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée à partir d'une solution mère 200mg d'E-MOH préalablement dissouts dans un 1 ml DMSO (**Benzeggouta, 2005**).

❖ Dépôt 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 15 µl de DMSO est utilisé comme témoin négatif.
- ✓ Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.
- ✓ Chaque test est réalisé en deux répétitions (**Benzeggouta, 2005**).

❖ Incubation et Lecture

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

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

- Non sensible pour un diamètre inférieur à 7mm ;
- 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.
- **Expressions des résultats**

Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues ± l'écart type (SD).

I.4. Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)

1- Principe de la réaction

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al³⁺ et les flavonoïdes. La méthode de (**Topu et al., 2007**) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

2- Procédure

50 µl (S2) [extrait de plante] + 130 µl [MeOH] + 10 µl (S1) [CH₃COOK] + 10 µl [Al(NO₃)₃ · 9H₂O] + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol [50 µl extrait + 150 µl méthanol].

3-Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin

I.5. Activité antioxydante

I.5.1. Test du DPPH radical libre

1- Principe de la réaction

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958), le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

2- Préparation du DPPH

Dissoudre 6 mg dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

3- Procédure

A 160 μl (DPPH) rajoutez 40 μl (extrait) puis lecture 517nm.

I.5.2. Test de l'ABTS (scavenging activity)

1- Principe de la réaction

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

2- Procédure

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12-16 h ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

(ABTS) □r 19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 ml H_2O + □r 3,3 mg (2.45mM) ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)

+ 5ml H_2O + attendre 16 heure à l'abri de la lumière.

$M(\text{ABTS}) = 548,68 \text{ g/mol}$

$M(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 270,32 \text{ g/mol}$

$A = 0.70-0.75 \text{ nm de l'ABTS}$

3- Procédure

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

I.5.3. Test du CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

1- Principe de la réaction

Le Cupric Reducing Antioxidant Capacity est déterminé par la méthode CUPRAC, (Apak et al., 2004).

2- Procédure

- **Préparation des solutions**

- $m=1.927$ g Acétate d'ammonium (ACNH_4) + 25 ml (H_2O) → S1 transparent (pH=7.0).

- $m=0.042625$ g ($\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) + 25 ml (H_2O) → S2 bleu.

- $m=0.039$ g (Neocupronin) + 25 ml (EtOH) → S3.

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

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

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

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

$M(\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}) = 170.50$ g/mol

$M(\text{ACNH}_4) = 77$ g/mol

$M(\text{Neocupronin}) = 208.27$ g/mol

Chapitre II :

Résultats Et

Discussion

II.1. Détermination du rendement d'extraction

II.1.1. 1Résultat

Les rendements d'extraction ont été déterminés par la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \left[\frac{Ps}{Pp} \right] \times 100$$

Ps : poids de l'extrait sec en (g).

Pp: poids de la poudre en (g).

L'extrait a été préparé à partir de la poudre des fleurs de la plante *Ephedra alata alanda*.

Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Table 6 : le rendement d'extrait méthanolique de *Ephedra alata alanda*.

La plante	Le poids de matériel végétal en (g)	Le poids d'extrait en (g)	Le rendement en (%)
Ephedra alata alanda (fleurs)	100 g	37.6 g	37.6(%)

II.1.2. Discussion

Au vu des résultats rapportés dans le tableau montrent que l'extrait méthanolique a donné un meilleur rendement d'extraction avec un taux d'environ 37.6% ; ainsi que les résultats obtenus sont comparés avec les résultats de l'autre binôme qui a travaillé sur les tiges de la même plante *Ephedra alata,alanda* et dans les mêmes conditions où le rendement a donné 21%.

II.2. Screening phytochimique

II.2.1. Résultat tests phytochimique

Les tests phytochimique consistent à détecter les différentes familles de composés qui existent dans la partie des fleurs d'*Ephédra alata alanda*, par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. D'après toutes ces étapes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau

Table: résultat des tests Phytochimique.

Tests phytochimiques		EQ	Observation	
Les composés phénoliques	-FeCl ₃	Développement de la coloration verdâtre.		+++
Les Flavonoïdes	-AlCl ₃	Apparition d'une coloration jaune		++
Les stéroïdes	- Anhydride acétique - L'acide sulfurique	Anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert		+
Les saponines	-Test de la mousse	Formation d'une mousse persistante après 15 min		++
Tanins Condensés	-Chlorure de Fer	-Couleur vire au bleu noir - ou bleu verdâtre		++
Les Alcaloïdes	- Test Mayer	Précipitation		+
Les coumarines	Méthanol	Présence d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV		+
Les anthraquinones	KOH	Coloration rouge ou rose		++
Les anthocyanes	-Acide sulfurique	Coloration rouge ou brune		-

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

II.2.1. Discussion

Après avoir examiné les résultats obtenus par l'examen phytochimique de la plante étudiée, il a trouvé que la plante *Ephedra alata alanda* de la région chechar « khenchela » est riche en métabolites secondaires, cette abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables (Konkon et al, 2006), ce qui justifient les différents indications thérapeutiques. Où les résultats obtenus par l'autre binôme qui a analysé les tiges de la plante *Ephedra alata,alanda* sont presque les mêmes .

Selon kbili zohra (2016), qui a étudié toute la partie aérienne de la plante *Ephedra alata, alanda* et confirmé la présence de diverses métabolites secondaires dans les deux parties de la plante.

II.3. L'activité antibactérien

II.3.1. Résultat

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de l'*Ephedra alata alanda* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton.

L'activité antimicrobienne d'extraits méthanolique des fleurs a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de (04) bactéries et le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO).

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne sont présentés dans le tableau suivant :

Table 7 : zone d'inhibition d'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des fleurs, le témoin positif (Gentamicine) et témoin négatif (DMSO) sur le milieu MH (mm).

	Témoin positif	Témoin négatif	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	-	8	7	7	-
<i>Escherichia coli</i>	14	-	9	8	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	-	-	-	-	-

(-) : absence d'activité.

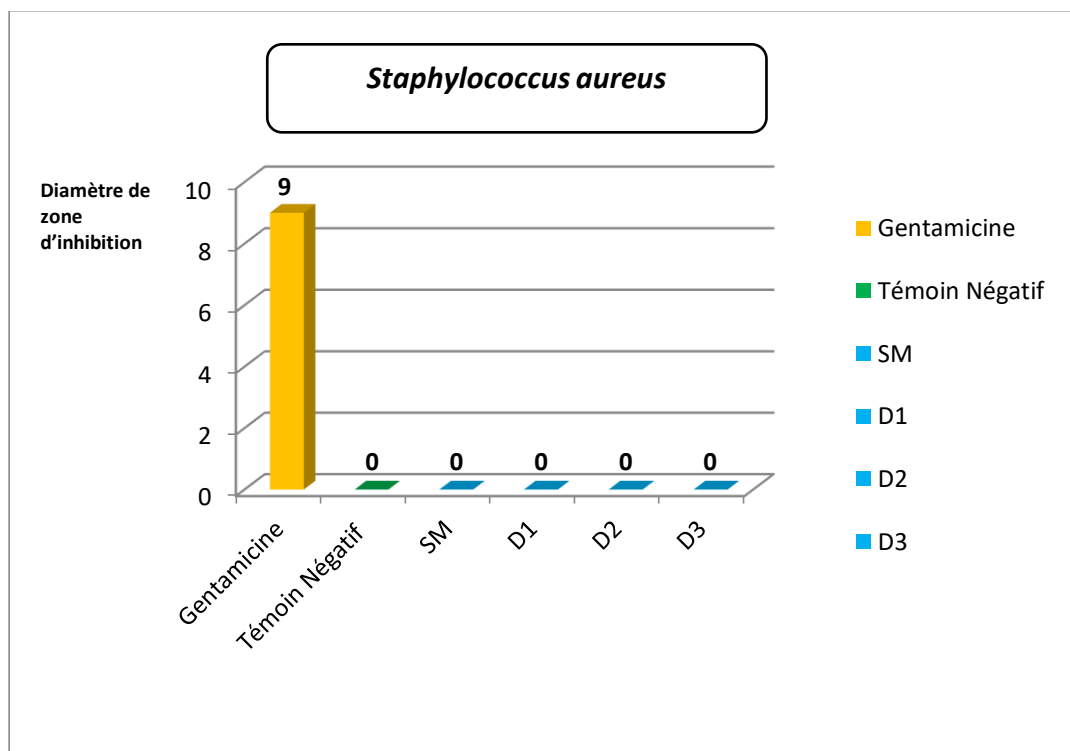


Figure 18 : Histogramme d'effet de la plante *E. alata* sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*

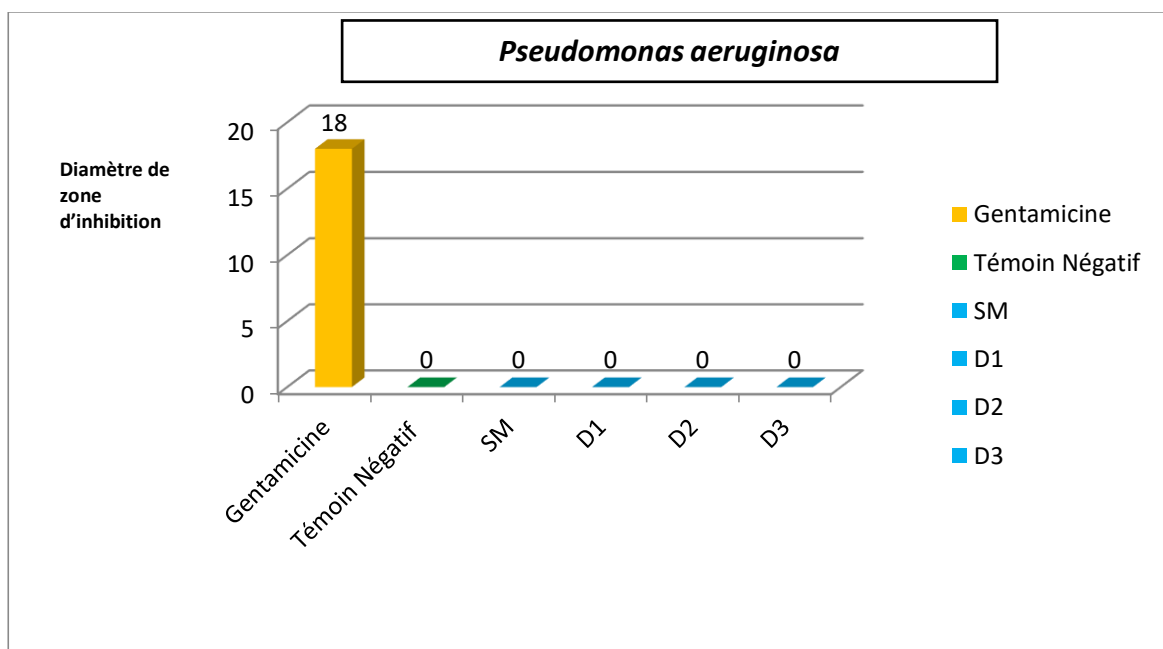


Figure 19 : Histogramme d'effet de la plante *E. alata* sur la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*

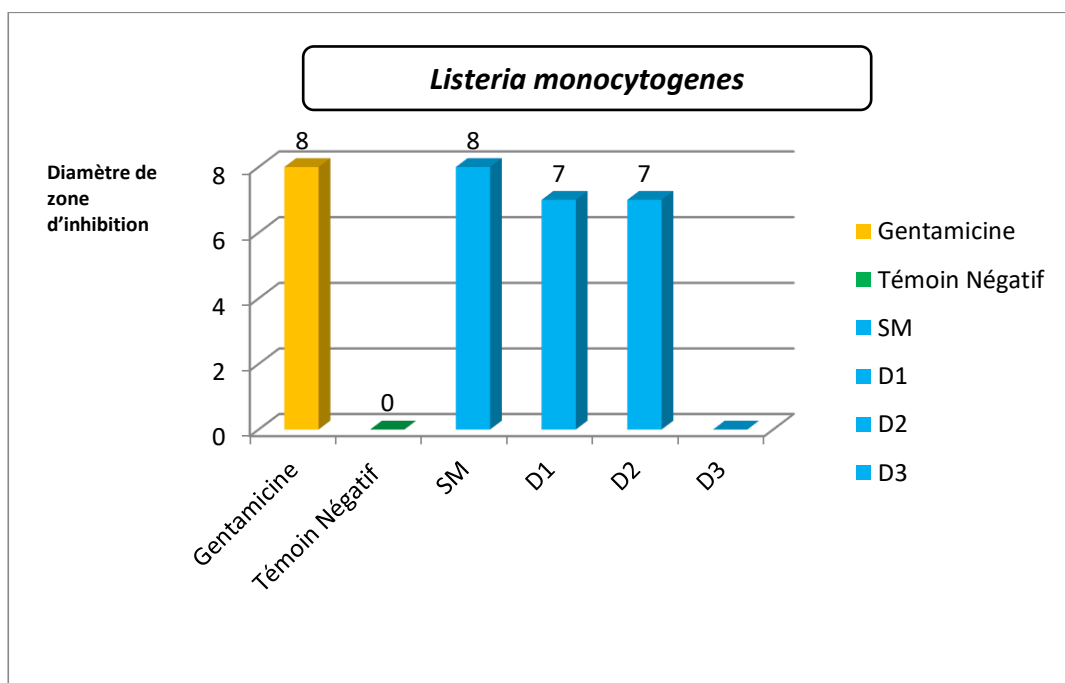


Figure 20 : Histogramme d'effet de la plante *E. alata* sur la souche bactérienne *Listeria monocytogenes*

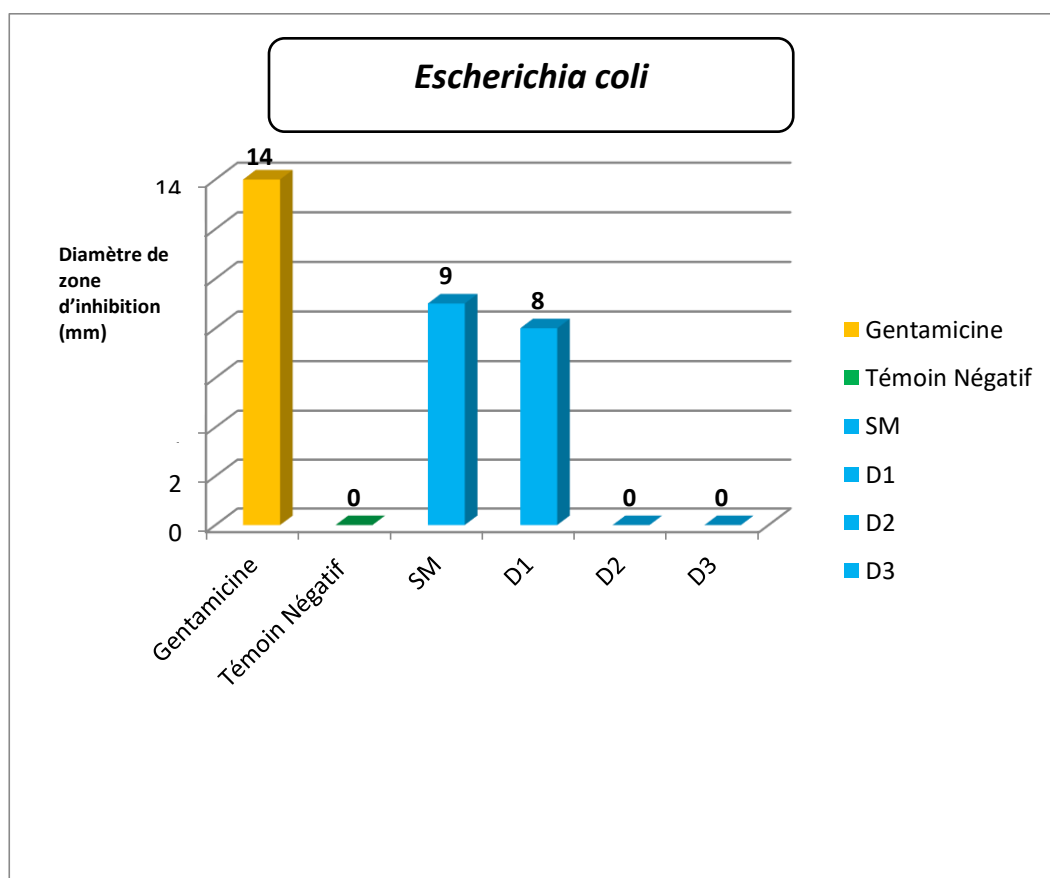


Figure 21 Histogramme d'effet de la plante *E. alata* sur la souche bactérienne *Escherichia coli*.

II.3.2. Discussion

Nos résultats montrent que la bactérie *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* la bactérie est sensible à l'extrait de méthanolique, ce qui explique que l'extrait de méthanol à des concentrations (10^{-1} mg/ml et SM) inhibe la croissance de ces bactérie, que le même extrait ne montre aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Selon **Kessal et Bouafia (2003)**, l'extrait méthanolique de la plante entière de *E.alata* de la région de Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 9,63 mm; 7,31mm et de contre *E.coli*, *P. aeruginosa* et respectivement

En général, les résultats de l'activité anti bactérienne des extraits de la plante Ephedra alata étudiée ont été comparés à ceux de la même souche pour la région d'Ouargla, Il s'avère que ce dernier ont une activité anti bactérienne plus grande que celle de la plante étudiée.

II.4. l'activité anti-inflammatoire

II.4.1. Résultat

Le test de l'activité anti-inflammatoire par la méthode d'inhibition de la dénaturation de la protéine bovine sérine albumine (BSA) à différentes (n= 3 ; les absorbances) concentrations à été réalisé en triple, dont les absorbances sont mesurés à 416 nm.

Table 8 : les différentes absorbances des différentes solutions à 416 nm.

La solution	Solution 1	Solution 2 Contrôle tes	Solution 3 Contrôle produit	Solution 3 Standard
Absorbance	0.175	0.127	0.139	0.153

Pourcentage d'inhibition = $100 - (\text{ABS de la solution test} - \text{ABS de la solution contrôle produit}) / \text{ABS de la solution contrôle test} * 100$

Pourcentage d'inhibition = $100 - (0.175 - 0.127) / 0.139 * 100 = 65.5\%$

Pourcentage d'inhibition (Diclofenac) = $100 - (0.153 - 0.127) / 0.99 * 100 = 97.37 \%$

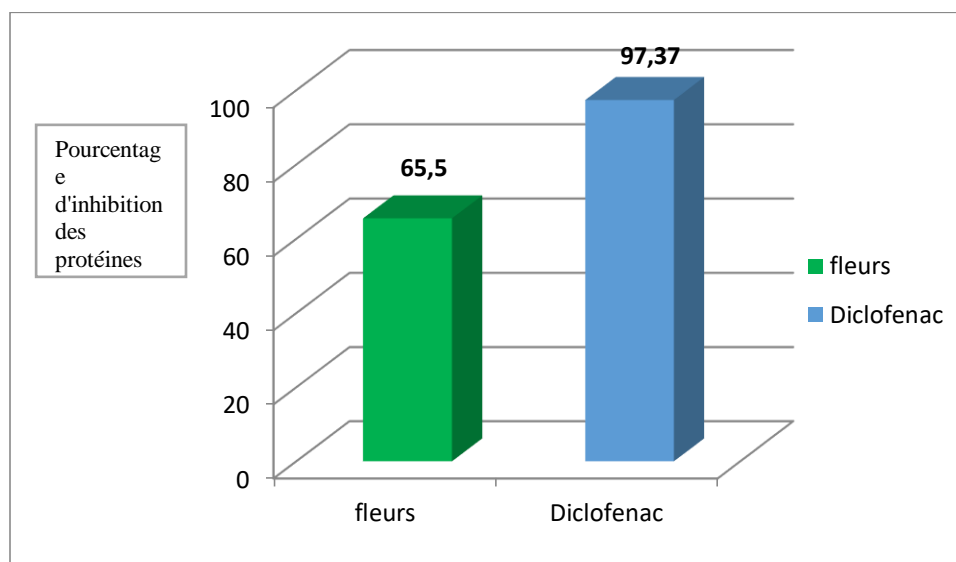


Figure 22: Histogramme représente le pourcentage d’inhibition de la Diclofinac et l’extrait méthanolique des fleurs.

II.4.2. Discussion

Les résultats de la présente étude montrent que l’extrait aqueux de l’*Ephedra alata, alanda* possède une un effet anti-inflammatoire in vitro, l’effet anti-inflammatoire de l’extrait est observé à partir de des résultats obtenus de l’absorbance par comparaison avec l’absorbance de l’anti-inflammatoire non stéroïdien le Diclofenac sodium ; où l’extrait aqueux *Ephedra alata, alanda* a la capacité à protéger le sérum albumine bovine (BSA) contre la dénaturation thermique et inhibe significativement la dénaturation du BSA par rapport au Diclofenac sodium .

Table 9: les différents pourcentages de l’inhibition de la dénaturation des protéines par les fleurs de l’*Ephedra alata, alanda* et le Diclofenac sodium .

Extraits	% Inhibition de la dénaturation des protéines
Diclofenac sodium	97.37%
Fleurs de la plante <i>ephedra alata, alanda</i>	65.5%

Les résultats obtenus de cet extrait est comparable aux résultats obtenus pour le Diclofenac sodium; un médicament anti-inflammatoire présenté comme standard qui a exercé un pourcentage d’inhibition de 97.37% à la même concentration.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l’inflammation (Djeridane, A. 2006) , la production d’auto-antigène dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines in vivo. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l’altération des liaisons électrostatiques,

hydrogènes, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnel des protéines (Sangeetha, M. 2011)

D'après les résultats on pourrait dire que l'activité anti-inflammatoire d'extrait aqueux *Ephedra alata, alanda* serait due aux flavonoïdes et les tanins qu'il contient .Il a été apporté que les flavonoïdes joueraient un rôle important dans le traitement des inflammation (Nassis et al ,1992).

Selon Hikino et al (1980) ont prouvé que le pseudoehedrine est le principe actif responsable de l'activité anti-inflammatoire montrée par la plante *Ephedra alata, alanda*.

II.5 Dosage des flavonoïdes

L'estimation des flavonoïdes de l'extrait méthanolique et acétate de *J.phoenicea* a été effectué par la méthode (Top u et al., 2007) en utilisant le réactif nitrate d'aluminium. La quercétine est le standard le plus souvent employé dans cette méthode.

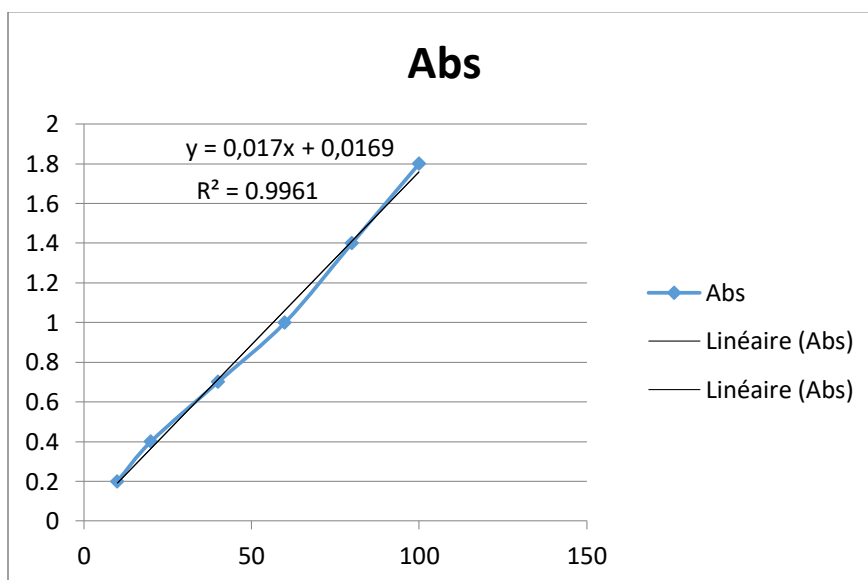


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine en µg/ml.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine et exprimé en milligramme équivalent de quercétine par milligramme du poids d'extrait (mg EQ/mg).

Le taux des flavonoïdes totaux a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage d'équation (Figure 23), D.O = 0,0171 [flavonoïdes] + 0,0169 ; avec un coefficient de détermination R² égal à 0,996.

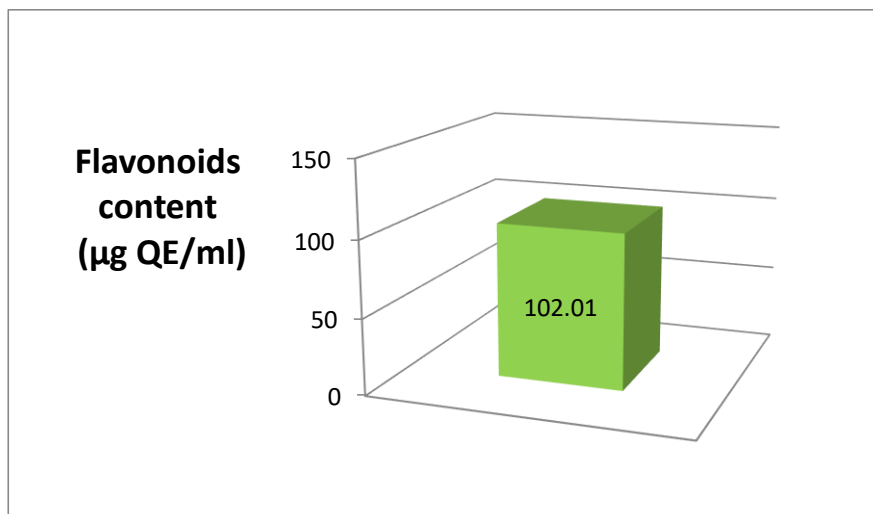


Figure 24 : Teneur en flavonoïdes (mg EQ/mg).

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode utilisée se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 415 nm, cette méthode révèle que l'extrait méthanolique a montré un taux d'environ (102,01±1,17) mg EQ/mg d'extrait qui est plus élevé.

Les résultats obtenus par **kebili (2016)** pour la même souche de la région d'ouargla montrent que la valeur la plus élevée est notée pour l'extrait dichlorométhanolique de la partie aérienne (128.69 EAG/mgE)

II.6 L'activité antioxydante

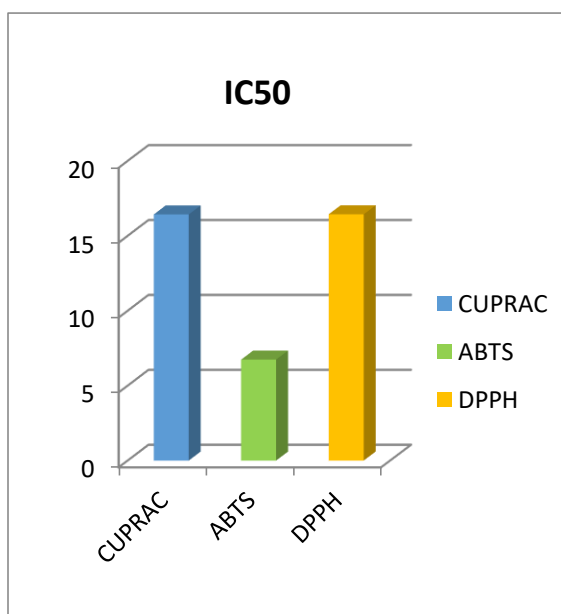


Figure 25: les tests d'activité antioxydante de l'extrait méthanolique.

Les résultats montrent que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique, sont obtenus avec trois techniques d'activité antioxydante à savoir : DPPH, ABTS et CUPRAC.

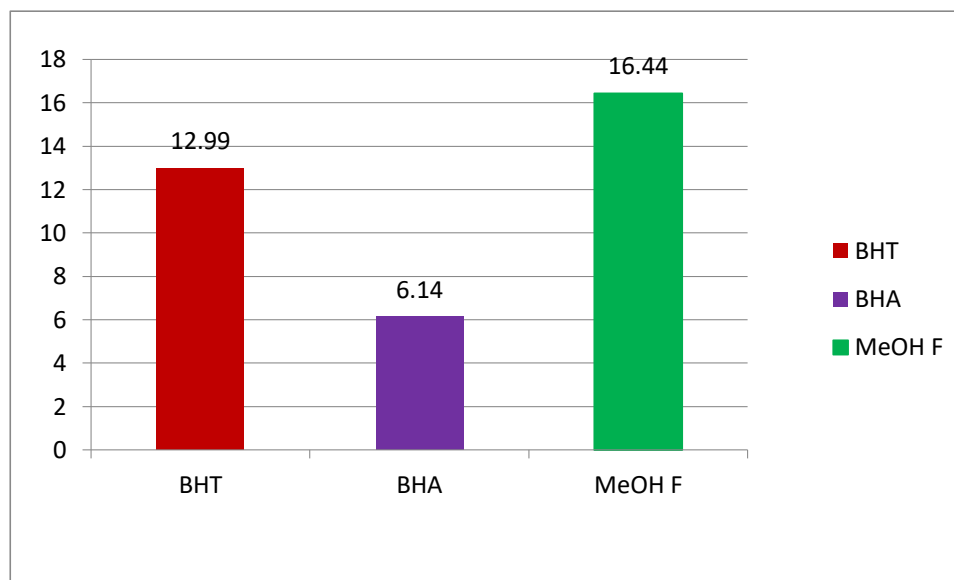


Figure 26: IC₅₀ des extraits et des standards DPPH

Le test DPPH a donné une valeur d'IC₅₀ (16,44±0,31µg/ml) tandis que ceux du standard BHA égale 6,14±0,41 µg/ml et BHT égale 12.99±0.41 µg/ml ; cet extrait possède un pouvoir de piégeage du DPPH plus fort que les standards.

L'étude réalisée par **kebili (2016)** montre une IC₅₀ de 0.32/l pour l'extrait méthanolique.

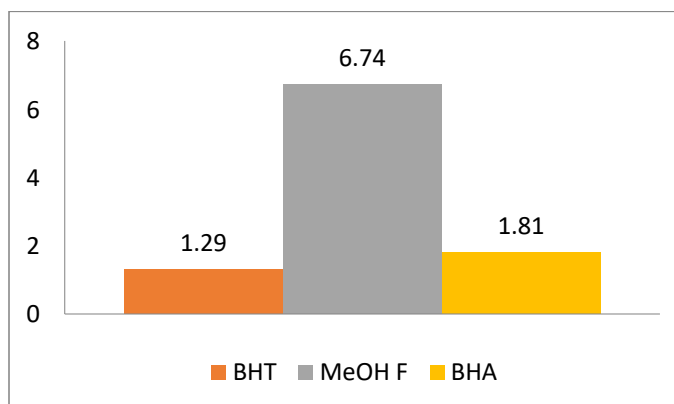


Figure 27: IC₅₀ des extraits et des standards ABTS.

Dans le test ABTS, on a trouvé une IC₅₀ (6,74±0,27µg/ml), cette valeur supérieur à celles des standards BHA (1,81±0,10 µg/ml) et BHT (1,29±0,30 µg/ml) ; donc plus active.

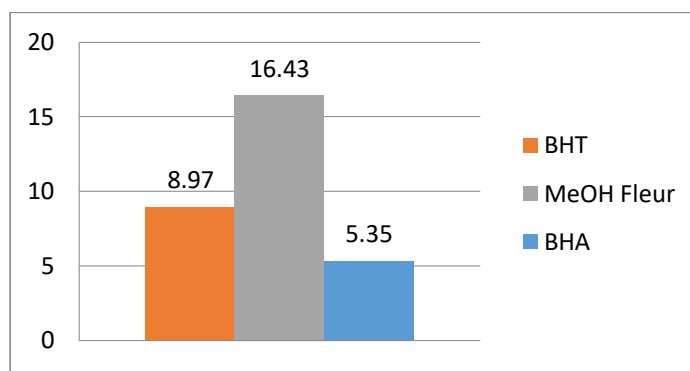


Figure 28 : CI50 des extraits et des standards de teste CUPRAC.

Le test CUPRAC indique une valeur d'A0.50 ($16,43 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$) par comparaison avec les standards BHA ($5,35 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$) et BHT ($8,97 \pm 3,94 \mu\text{g/ml}$), d'après ces résultats, l'extrait des fleurs est plus fort que les deux standards BHA et BHT.

Toutes les valeurs affichées n'excluent pas le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique, et indiquent que l'extrait présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du H_2O_2 .

Conclusion

Conclusion

L'essor de la science médicinale n'a pas empêché le recours à la phytothérapie. *Ephedra alata* a prouvé ses vertus thérapeutiques.

L'objet de notre étude a consisté à évaluer les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoire et antioxydants de cette plante.

Les tests biochimiques des extraits bruts étudiés ont mis en évidence la présence des principes actifs du métabolisme secondaire tels que : les flavonoïdes, tanins, saponifères, des coumarines et des alcaloïdes

Les résultats de la présente étude montrent que l'extrait aqueux de l'*Ephedra alata*, *aland* possède un effet anti-inflammatoire *in vitro*, cet effet de l'extrait est observé à partir de résultats obtenus de l'absorbance % par comparaison avec l'absorbance de l'anti-inflammatoire non stéroïdien le Diclofenac sodium. où l'extrait aqueux *Ephedra alata*, *alanda* a la capacité de protéger le sérum albumine bovine (BSA) contre la dénaturation thermique avec un pourcentage de 65.5% et inhibe significativement la dénaturation du BSA par rapport au Diclofenac sodium qui a la capacité de la dénaturation de la protéine BSA avec le pourcentage de 97.37% .

Les résultats obtenus ont mis en évidence une activité remarquable contre les bactéries gram(+) et gram (-), cette activité ont été réalisés sur quatre souches bactériennes (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus*), Nos résultats montrent que la bactérie *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* la bactérie est sensible à l'extrait de méthanolique, ce qui explique que l'extrait de méthanol à des concentrations (10^{-1} mg/ml et SM) inhibe la croissance de ces bactérie, que le même extrait ne montre aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Ainsi, le screening phytochimique est complété par la détermination de la teneur totale des flavonoïdes par une méthode de d'un extrait (méthanolique) qui a révélé des teneurs en flavonoïdes de $102,01 \pm 1,17$ mg EQ/mg respectivement.

L'activité antioxydante des fractions d'*Ephedra alata* a été évaluée *in vitro* par trois méthodes, la première est de réduction de radical libre DPPH pour les résultats ont montré que l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'extrait méthanolique avec une IC_{50} égale à $16,44 \pm 0,31$ /ml, la deuxième est de ABTS avec une valeur de $6,74 \pm 0,27$ et la troisième est de

CUPRAC qui est égale à $16,43 \pm 0,42$; ces tests sont comparables à des standard tel que BTH et BHA.

Ces résultats prometteurs, nous permettraient d'élargir les recherches sur des bactéries autrement plus dangereuses, tant que l'homme, le bétail et les plantes.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

• A

- **Abourashed EA, El-Alfy AT, Khan IA et Walker L. (2003).** Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res.* Vol. 17. PP 703-712.
- **Adouane Selma. (2016).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès., Mémoire de magistère en sciences agronomiques, Univ Mohamed Khider – Biskra.188 p.
- **Al-Qarawi AA, Abd Allah EF et Hashem A. (2012).** Effect of Ephedra alata on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus* . *Pak. J. Bot.* Vol. 44.N°1. pp. 425-428.
- **AL-Qarawi AA, Abd_Allah EF et Abeer H. (2011).** Ephedra alata as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold.
- **Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T., (1996).** Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.*, 28: 65-180.
- **Athamena, S. Chalghem, I. Kassah-Laouar, A. Laroui, S., & Khebri, S (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.
- **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Montiel H. (2000).** « Bactériologie clinique », 3.Ed. Ellipses, paris.
- **Ayad, R. (2008).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Zygophyllum cornutum*, Mémoire magister en Chimie Organique, Université Mentouri Constantine. p 35-39, 40, 47.

• B

- **Barton, G. M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The journal of clinical investigation*, 118(2), 413-420.
- **Barnes, P. J. (1998).** Anti- inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(5), 557-572.
- **Bayala, B. (2014).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur

des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes, Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère biologie de Physiologie et génétique moléculaire.

- **Benzeggouta Naïrouz. (2004).** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments., Mémoire de magister en pharmacologie chimie, Univ Mentouri de Constantine Institut de Chimie.,Algérie.,118p.
- **Bouchouka Elmouloud. (2016).** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes., doctorat en science, univ de BADJI mokhtar –annaba., 114P.
- **Brand-Williams, W, Cuvelier, M. E & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec and Doc, Paris. Pp 199-388.
- **Bruneton J., (2009) ;** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4e éd., revue élargie, Paris, France : Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
- **Bougandoura, (2011).** Investigation phytochimique de la phase n-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* (Compositae) (Magister dissertation, Université Mentouri, Constantine).

• C

- **C alsamiglia. S, Busquet. M, Cardzop. W, Castillejos. L., (2007),** Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*. Vol. (90): 2580–2595.
- **Cowan N. M., (1999),** Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology Reviews*. Vol. 12(4): 564-582.
- **Chebrouk, F. (2009).** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Magister. Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **Charles, N, S, Peter, A.W. & Derek, W.G. (2010).** Fundamentals of inflammation. Cambridge university press, 2-3.

- **Cuvillon, P., Viel, E. (2002).** Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti -COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë ?le courrier de l'algologie (1), 19-23.

• D

- **Derbel S., Touzard B., Triki MA. et Chaieb M.,(2010).**Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alata* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora*, Vol. 205, pp. 471–474.
- **Djeridane, A.(2006).**Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*97:654-660.
- **Diplok, A.T. (1991).** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr.*53 (suppl). 189: 150-155.
- **Duraffourd. C, D'hervicourt. L, and Lapraz J.C. (1990).** Cahiers de Phytothérapie clinique, 1.Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques Synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.

• E

- **El-Lamey, (2011).**Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*, 50: 347-352.

• F

- **Fabre et truhaut, (1961) ; Axel et al., (2001).**Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta.*613 :1-19.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique.* Pp 108-115.
- **Flandrois J.P. (1988).** « Bactériologie médicale pratique » 320 P .Ed. Monique chomarat.

• G

- **Gerhenson J, McCaskill D., Rajaonarivony J., Mihaliak C., Karp F., Croteau R., (1991).** Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Ann Biochem*, 200:130-138.
- **Ghestem , A., Segun, E., Paris, M., Orecchioni, A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris. 273p.

- **Ghourri M, Zidane L, Douira A. (2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*. Vol.17, pp 2388-2411.
- **Glombitza,(1985); Goodwin, (1988); Boros, (2010).** -Flore et végétation de sahara. 3e édition, CNRS éditions, (paris): 326-365.
- **Guignard et al., (2002)** .Abrégé de botanique .Masson(ED).Paris ,212p.

• H

- **Hanhineva, (2010).** Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* 55: 44–49.
- **Hamad E. (2002).** “Frequency of pseudomonas aeruginosa serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics” ,*BURNS*, 28: 340-348.
- **Hamadi, N. (2010).** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri, Constantine. Pp 10-20.
- **Harborne, J.B., (1980).** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series.p8, 329-402.
- **Harrar, A. (2012).** Activités antioxydantes et antimicrobiennes d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de magister, Université Ferhat Abbas de Sétif.
- **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. p68, 2831–2846.
- **Havsteen, (2002); Edenharder et Grünhage, (2003).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *pharmacol. Therapeut.* p96, 67-202.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- **Herbert R.B.,(1989)** . The Biosynthesis of secondary metabolites. 2ème edition Chapman and Halle p 2, 11-115.
- **Hegazi, G. A. E. M & El-Lamey, T. M (2011).** In vitro Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 1(8), 158-163.
- **Hichem. (2017)-** contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des deux plantes *Artemisia compestris* L. et *Ephedra alata* alenda staph.

- **Hikino. (1980).**Structure of ephedrannin a, a hypotensive principale of Ephedra Herbs. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol.28, N 10, pp.2900-2904.
- **Hopkins, W. G (2003).** Physiologie végétale. De Boeck Supérieur.
- **Humblet, M.F., Godeau, J.M. (2005).** L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë, dans l'espèce bovine, Ann. Méd. Vêt. 149: 20-33.

• I

- **Ibiri P .M. 2005.** « Assainissement microbiologique de l'air et des système de ventilation au moyen d'huiles essentielles ». Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédéral, Lausanne (suisse).
- **Iserin, P. (2008).** Larousse des plantes médicinales.
- **Ionut, 2016**
- **Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J.N.(2007).** Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of south African origin used to treat pain and inflamatory condition. African journal of biotechnology, 6(25).

• J

- **Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Steven, P. (2002).** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. Pp 369-384.

• K

- **Karamali. K, Teunis. V. R., 200,** *Tannins: Classification and Definition., Natural Product Reports.,* 18: 641–649.
- **Kebili Z ; 2016-** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de Ephedre alata dans la région de Ouargla. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de magister, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **Khelfallah, (2013).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (Nelumbo nucifeca Gertn), Journal of food and drug analysis, 11(1):60- 61.
- **Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

- **Konkon et al, 2006.** Etude phytochimique de *Mitragyna inermis*(willd) O.Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. Pharm. Méd. Trad. Afr.2006, Vol, 14, pp, 73-80.

• L

- **Laid Z, (2016).** Etude phytochimique et Evaluation biologique des extraits organiques des différents parties de LIMON ASTRIUM. Thèse de doctorat en chimie organique. pp 27-28.
- **Leclerc H. (1993).** « les Escherichia coli responsables de diarrhée », Arch. Fr, pediat. 50 :57-67.
- **Lisu, W., Jui, H.Y., Hsiao, L.L., Ming, J.W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), Journal of food and drug analysis, 11(1):60-61.
- **Luigia, L.,** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. Phytochemistry. 69(8):1732- 61.

• M

- **Ma G., Bavadekar S.A., Davis Y.M., Lalchandani S.G. Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A., et Feller D.R. ,(2007)-** Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ Adrenergic Receptor Subtypes. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Vol. 322, N°1, pp. 214- 221.
- **Macheix J., Fleuriet A., Jay–Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses poly technologiques et universitaires romandes: pp 4-5.
- **Mauro N., (2006).** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (\pm)-camptothécine, Thèse de docteur en chimie, université Joseph Fourier, Grenoble I: 15-16.
- **Malecky, M. (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.
- **Martínez-Cayuela M., (1995)-** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie, Vol. 77, pp: 147-161.
- **Merghem R; (2009)** Livre des éléments de biochimie végétale. Pp23-98-107-111-112-113-115-116-118-120-121-124-127-135-137-143-144-152-153-157-158.
- **Mueller-Harvey, I. et Mc Allan, A.B. (1992).** Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* p1, 151-217.

• N

- **Nassis et al ,(1992).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J.Clin Nutr*, 74: 418–425.
- **Nawwar M A M, El-Sissi H I, Barakat H H. (1984).**Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*.Vol. 23. N°. 12, pp 2937-2939.
- **Ngene, J.P., Ngoule, C.C., Kidik, C.P., Ottou, P.M., Dibong, S.D., Mpondo, E.M. (2015).** Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 88(1), 8194-8210.

• O

- **Obame, L. C, Koudou, J, Kumulungui, B. S, Bassole, I. H , Edou, P, OUattara, A. S & Traore, A. S (2007).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Canarium schweinfurthii* Engl. Essential oil from Centrafrican Republic. *African Journal of Biotechnology*, 6(20).
- **Ould El Hadj MD, Hadj-Mahammed M et Zabeirou H. (2003).** place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d’Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, pp 47-51.
- **Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris (3éme Ed), pp 662 *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5. N°16. pp. 2297-2303.

• P

- **Pandey KB et Rizvi SI,(2009).**Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.*Oxidative Medecine and Cellular Longevity*.Vol.2 (5):270-278.
- **Portet B., (2007).** Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise: *Piper hostmannianum* var. *berbicense* ; Thèse de doctorat."".Université de Toulouse. p:23- 25.
- **Peronny, S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI Lemur Catta Thèse de Doctorat du Muséum national d’histoire naturelle Discipline Eco-Ethologie. 151p.
- **Peters C.M., O’neill J.O. et Young J.B., (2005)-** Is there an association between *Ephedra* and heart failure? a case series. *Journal of Cardiac Failure*,Vol. 11, N°1, pp.9-11. 109- Pharmacopée française, 1989-Indice De Mousse.

- **Plotowski M. C. (1987).** “ Evaluation of technetium labelling effect on *Pseudomonas aeruginosa* surface properties”, *Ann. Ins. Pasteur/Microbiol.* 183 :415-426.
- **Popovici, C. Saykova, I & Tylkowski, B (2010).** Evaluation de l’activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- **Portet B., (2007)-** Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise: *Piper hostmannianum* var. *berbicense* ; Thèse de doctorat."".Université de Toulouse. p:23- 25.

• R

- **Rayn, G. B., & Majno, G. (1977).** Acute inflammation. A review. *The American journal of pathology*, 86(1) -183.
- **Rhen, T., & Cidlowski, J.A (2005).** anti-inflammatory action of glucocorticoids_new mechanisms for old drugs. *New England journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.
- **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. (1996).** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive Radical Research. 22: 375-383.

• S

- **Sabrina k., (2003).** métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse de docteur en écologie et chimie des substances naturelles, muséum national d’histoire naturelle:29.
- **Safer, A.M. et A.J. Al-Nughamish, (1999).** Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxyl toluen (BHT) in rats: An electron microscopical study. *Histology and Histopathology*, Vol. 14; pp. 391-406.
- **Sangeetha ,M.(2011).** In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of *Cleodendron Inerme*. *RJPBCS Volume.2 (1):* 822-827.
- **Sharma, O. P, & Bhat, T. K (2009).** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- **Sies H., 1997-** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol., Vol. 82*, pp. 291-295.

• T

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

• W

- **Wichtl, M. & Anton, R. (2003).** Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2 e édition. EMInter/Tec & Doc éditions, Paris, pp 587-589.
- **Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. Ed, De Boeck université (paris), 13-23.
- **William G., Hopkins M.,(2003)-** Physiologie végétale. Traduction de la 2ème édition américaine par serge Rambour, Bibliothèque Nationale, (Paris): pp 268-273.

• **Y**

- **Yarnell, E (2006).** Plant Chemistry in Veterinary Medicine: Medicinal Constituents and their mechanisms of action. Veterinary Herbal Medicine, p 159.
- **Yao. L .H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S.,(2004)-** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant.Food Human.Nutrition*, 59:113-122.
- **Yezza S; Bouchama S; (2014).**Index des métabolites secondaires végétaux in mémoire de l'obtention de diplôme de licence en biochimie fondamentale et appliqué pp20-25.
- **Yu-ling H. and yuan-Shiun C. (2002).** 'Studies on the antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of Isatis indigotica root'. *phytomedicine*, 9 (5); 419-424.
- **Yu, R., Mandlekar, S., and Kong, A. N. T. (2000).** Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular pharmacology*. 58(2): pp 431-437.

Site: https://fr.wikipedia.org/wiki/Stress_oxydant

Site : <https://carolinelattucanaturopathe.com/2018/07/20/le-stress-oxydant-le-vieillissement-et-problemes-de-civilisation/>

Site : <https://www.idrogen.fr/content/10-les-radicaux-libres-et-stress-oxydatif-oxydant>

Annexes

L'annexe

ANNEXE 01 : Préparation des milieux

Le milieu Muller Hinton (MH)

- Infusion de viande de boeuf 2g
- Peptone de caséine 17.5 g
- Amidon 1.5 g
- L'agar 17 g
- L'eau distillée 1000 ml
- ❖ **Eau physiologique**
- Chlorure de sodium 9g
- L'eau distillée 1000 ml

ANNEXE 02 : Préparation des réactifs

❖ **AlCl₃ 1%**

- AlCl₃ 1g
- Eau distillée 100 ml

❖ **NaOH 10%**

- NaOH 10g
- Eau distillée 100 ml

❖ **FeCl₃ 2%**

- FeCl₃ 2 g
- Eau distillée 100 ml

ANNEXE 03 :



Rotavapeur



Chambre UV

Table des matières

Résumé	I
Abstract.....	II
المخلص.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction.....	1
Première Partie: Synthèse Bibliographique	3
<i>Chapitre I : Présentation de la plante étudiée.....</i>	<i>3</i>
I. Généralités sur la plante	3
I.1. Description botanique	3
I.2. systématique.....	4
I.3. Les propriétés médicinales d'Ephedra alata :	5
I.4. Nom vernaculaire d'Ephedra alata :	5
I.5. Répartition géographique :	6
I.6. Activités biologiques antérieures	6
I.7. Toxicologie	7
Chapitre II : Métabolites secondaire chez les plantes	8
II Généralités	8
II.1. Classification	8
II.1.1. Polyphénols:	8
II.1.1.1.Classification des polyphénols:	9
II.1.1.1.1Les polyphénols monomériques (PPM) :	9
II.1.1.1.1.Acides phénoliques:	9

II.1.1.1.2.Acides phénols dérivés d'acide benzoïque :	9
II.1.1.1.3.Acides phénols dérivés d'acide cinnamique :	10
II.1.1.2.Intérêt thérapeutique des poly phénols :	10
II.1.1.3Activités biologiques des polyphénols	10
II.1.2. Les flavonoïdes	11
II.1.2.1. Certaines propriétés des flavonoïdes.....	11
II.1.3. Les tannins.....	12
II.1.4. Les coumarines.....	13
II.1.5. Les alcaloïdes.....	15
II.1.5.1. Biosynthèse des alcaloïdes	15
II.1.5.2. Activités biologiques des alcaloïdes	16
II.1.6. les terpènes et stéroïdes:	17
II.1.6.1. Les terpènes	17
II.1.6.1.1. Classification des terpènes.	18
II.1.6.1.1.1. Les monoterpènes.	18
II.1.6.1.1.2. Les diterpènes:	18
II.1.6.1.1.3. Les sesquiterpènes:	18
II.1.6.1.2. Les triterpènes et stéroïdes:	18
II.1.6.1.3. Les polyterpènes:	18
II.1.6.2. Les stéroïdes	18
II.1.7. Saponosides.....	18
II.1.8. Les anthocyanes	19
II.1.8.1. Utilisation thérapeutique des anthocyanes	19
Chapitre III:Les activités biologiques	21
III. Les activités biologiques.....	21
III.1. Activité antioxydant	21

III.1.1. Stress et radicaux libres	21
III.1.1.1. Le stress oxydatif.....	21
III.1.1.1.1. Les conséquences du stress oxydant	22
III.1.1.1.1.1. peroxydation lipidique	22
III.1.1.1.1.2. peroxydation lipidique :.....	22
III.1.1.1.1.3. Les maladies liées au stress oxydatif : (Favier, 2003).....	23
III.1.1.2. Les sources importantes des radicaux libres	25
III.1.1.3. Comment et par qui contrôlé les radicaux libres :.....	25
III.1.2. Différentes formes des antioxydants :	26
III.1.2.1. Antioxydants synthétiques :	26
III.1.1.2 Les antioxydants naturels :.....	27
III.1.1.2.1. Anti oxydant enzymatique :	27
III.1.1.2.2. Anti oxydant non enzymatique :.....	27
III.2. L'activité anti bactérienne.....	28
III.2.1. Généralités sur les bactéries	28
III.2.2. Les milieux de culture des bactéries :.....	29
III.2.3. Description des quelques bactéries étudiées.	29
III.2.3.1. Staphylococcus aureus	29
III.2.3.2 Escherichia coli.....	30
III.2.3.2. Pseudomonas aeruginosa :(A. Chaibdraa et al., 2008).	31
III.3 Activité anti-inflammatoire :.....	32
III.3.1. Définition de l'inflammation :.....	32
III.3.2. Type d'inflammation.....	32
III.3.2.1. Inflammation aigue	32
III.3.4. Activité anti-inflammatoire	33
III.3.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	33

III.3.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)	33
III.3.3.3. Anti-inflammatoires naturel :	33
Deuxième Partie: Étude Expérimentale.....	34
Chapitre I: Matériel Et Méthodes	34
I.1. Matériel végétal	34
I.1.1. Matériels et produits	34
I.1.1.1. Mode opératoire	34
I.1.1.1.1. La macération	35
I.2. Analyse qualitative :	37
I.2.1. Etude phytochimique :	37
I.2.1. test des flavonoïdes	37
I.2.2. test des alcaloïdes : test de Mayer	37
I.2.3. test des triterpènes et stéroïdes.....	37
I.2.4. test des composés phénoliques.....	37
I.2.5. test des saponines.....	37
I.2.6. test des tanins	38
I.2.7. test des anthraquinones.....	38
I.2.8. test des anthocyanines	38
I.2.9. test de coumarines	38
I.3. Les activités biologiques.....	38
I.3. tests anti inflammatoire	38
I.3.1. préparation des 4 solutions	38
I.3. L'activité antibactérienne	39
I.3.1. Les souches testées.....	39
I.3.2. Matériels et produits	40
I.3.3. Mode opératoire	40

I.3.4. L'antibiogramme :	41
I.4. Dosage du total Flavonoïdes, TFC (Total Flavonoid Content)	42
I.5. Activité antioxydante	43
I.5.1. Test du DPPH radical libre	43
I.5.2. Test de l'ABTS (scavenging activity).....	43
I.5.3. Test du CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity).....	43
II.1. Détermination du rendement d'extraction.....	45
II.1.1. 1Résultat	45
II.1.2. Discussion	45
II.2. Screening phytochimique	45
II.2.1. Résultat tests phytochimique	45
II.2.1. Discussion	47
II.3. L'activité antibactérien	47
II.3.1. Résultat	47
II.3.2. Discussion	50
II.4. l'activité anti-inflammatoire	50
II.4.1. Résultat	50
II.4.2. Discussion	51
II.5 Dosage des flavonoïdes	52
II.6 L'activité antioxydante.....	53
Conclusion	56
Références Bibliographiques.....	58
L'annexe.....	68

Noms et prénoms : GROUNE Remaisa OUADAoui Oumaima	Date de Soutenance: 06/07/2019
Master: Biochimie appliquée	
Investigation phytochimique et étude -in vitro- de l'activité anti-oxydante, l'activité antimicrobienne et l'activité anti-inflammatoire de la plante médicinale récoltée dans la région –Khenchela-(<i>Ephedra alata,alanda</i>)	
<p>La présente étude visait à étudier l'effet de différents solvants à savoir l'méthanol, l'éthanol et l'eau sur les propriétés phytochimique, antibactérienne, antioxydant et anti-inflammatoire de <i>Ephedra alata,alanda</i>.</p> <p>L'étude phytochimique a permis d'isoler les principaux métabolites notamment ceux majoritaires, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins.</p> <p>Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus via l'évaluation <i>in vitro</i> de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines montrent que les extraits ont une activité anti-inflammatoire remarquable.</p> <p>Les tests de l'activité antimicrobienne ont permis d'évaluer la puissance antibactérienne. L'effet bactéricide varie selon la nature de la souche et de la substance testée.</p> <p>L'activité anti radicalaire a montré que pouvoir antioxydant est en fonction du solvant utilisé dans la macération de la plante étudiée.</p>	
Mots clés : <i>Ephedra alata,alanda</i> , solvant, screening, antioxydant, antibactérienne, anti-inflammatoire.	