



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Safa DIGHECHE et Meriem KHALFALLAH

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

Evaluation de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits et des alcaloïdes totaux de l'*Ephedra alata alenda* de la région de Oued Souf

Jury :

Mlle. Fatima Zohra BEN ABALLAH	MAA	Université de Biskra	Président
M. Abdelouahab DEHIMAT	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Amel CHOUIA	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Allah le Tout Puissant, de nous avoir accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de notre rêve et le bonheur d'achever ce travail.

Nous tenons à présenter notre sincère et vif remerciement aux membres du jury Mme CHOUIA Amel et Mme BENABDALLAH Fatima Zohra professeur à l'Université Mohamed Khider Biskra d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Monsieur DEHIMAT Abdelouahab qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et pour ses pertinents conseils.

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements et nos profondes reconnaissances aux responsables et au personnel de l'Université de Biskra (Département de Biologie).

Nous désirons aussi remercier les professeurs de l'Université de Biskra, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires. Nous tenons à remercier spécialement Mme BENGUERAICHI Fatiha, qui a donné de son mieux pour notre réussite.

Dédicaces

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Puisse le Tout Puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher père, l'homme de ma vie

Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le Tout Puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mes chers grands parents maternels et à ma chère grand-mère paternelle

Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A mon cher grand père paternel

Que Dieu, le miséricordieux, T'accueille dans son éternel paradis.

A mes frères et sœurs

Athmane et son épouse Sarah, Djamila et son époux Makhlouf, Yakoub, Nasrrine et Assia.

A mes neveux Bachir et Nadir et A ma futur petite nièce Joury

A mon binôme, mon amies et ma sœur Safa ainsi qu'à toute sa famille

A mes très chères amies Ibtissam, Khaoula, Meryem, Romaila, Sara, Salima, Wissem

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

A mes chères amies et camarades

A tous les membres de ma famille, petits et grands

...Meriem

Dédicaces

Avant tout, nous remercions « ALLAH » le tout puissant, de nous avoir ouvert les portes du savoir et qui sans lui ce travail ne serait jamais réalisé.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et Source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive, à toi
mon père

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

A mes chers grands parents maternels et à ma chère grand-mère paternelle

Qu'Allah vous préserve au près de moi et longue vie

A la mémoire de mon cher grand père paternelle

Qu'Allah t'ouvre les portes de son Paradis

A mes très chère sœurs : Nesrine, Wissam, Manel, Marwa

A mes très cher frères: Ahmed Sami, Wassim, Imad

*A ma sœur, que ma mère n'a pas enfantée, à ma jumelle spirituelle, qui me rend heureuse dans ma douleur, qui me rend au comble de mon bonheur quand je la vois seulement, elle est mon amie, et ma jumelle, Mon Seigneur, ne me prive pas d'elle. Je t'aime ma chère...**Meriem***

A mes chères amies: Ibtissam, Romaila, Salima, Yasmine

A ma chère famille paternelle et maternelle

A tous personne qui sont trop cher pour moi

Safa☺

Sommaire

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III

Partie bibliographique

Chapitre 1 *Ephedra alata alenda*

1.1. Famille des Ephedraceae	3
1.2. <i>Ephedra alata alenda</i>	3
1.2.1. Position systématique.....	3
1.2.2. Nom vernaculaire d' <i>Ephedra alata alenda</i>	3
1.2.3. Description botanique	3
1.2.4. Répartition géographique.....	4
1.2.5. Propriétés et utilisation de la plante <i>E. alata</i>	4
1.2.6. Compositions phytochimiques.....	5

Chapitre 2 Métabolites secondaires

2.1. Métabolites secondaires.....	6
2.1.1. Polyphénols.....	6
2.1.2. Flavonoïdes	6
2.1.3. Tanins.....	7
2.1.4. Alcaloïdes	7

Chapitre 3 Activités biologiques

3.1. Activité antioxydant	9
3.1.1. Stress oxydatif.....	9

3.1.2. Radical libre	9
3.1.3. Les antioxydants	9
3.2. Activité antibactérienne	9
3.2.1. Antibiotique d'origine végétale.....	10

Partie expérimentale

Chapitre 4 Matériel et méthodes

4.1. Matériel.....	12
4.1.1. Appareillages	12
4.1.2. Matériel végétal	12
4.1.3. Matériel biologique	12
4.2. Méthodes	12
4.2.1. Préparation des extraits	12
4.2.2. Extraction des alcaloïdes.....	13
4.2.3. Screening phytochimiques	15
4.2.3.1. Caractérisation des alcaloïdes	15
4.2.3.3. Caractérisation des tanins.....	15
4.2.3.4. Caractérisation des flavonoïdes.....	16
4.2.3.5. Caractérisation des stéroïdes	16
4.3.4. Dosage des métabolites secondaires	16
4.3.4.1. Dosage des polyphénols totaux	16
4.3.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	17
4.3.5. Evaluation de l'activité antioxydant	17
4.3.5.1. Test anti radicalaire (DPPH)	17
4.3.5.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP).....	19
4.3.7. Test de l'activité antibactérienne	20

Chapitre 5 Résultats et discussion

5.1. Rendement d'extraction.....	21
5.2. Screening phytochimique	22
5.3. Résultats du dosage des métabolites secondaire.....	22
5.3.1. Polyphénols et flavonoïdes totaux	22
5.4. Activité antioxydant	24
5.4.1. Résultats du test anti radicalaire (DPPH).....	24
5.4.2. Résultat du test du pouvoir réducteur FRAP	27
5.5. Résultats du test antibactérien	31
Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	33
Annexes.....	

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification d' <i>Ephedra alata alenda</i>	3
Tableau 2. Aspect, couleur et rendement de différents extraits d' <i>Ephedra alata alenda</i>	21
Tableau 3. Mise en évidence de la présence ou absence de certaines familles de métabolites secondaires d' <i>E. alata</i>	22

Liste des figures

Figure 1. Représentation de l' <i>Ephedra alata alenda</i>	4
Figure 2. Structure du noyau phénol.	6
Figure 3. Structure de base des flavonoïdes.	7
Figure 4. Protocole de l'extraction des alcaloïdes totaux.	14
Figure 5. Mécanisme réactionnel intervenant lors du DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.	18
Figure 6. Teneur des extraits en polyphénols et flavonoïdes totaux en µg/mg d'extrait sec d' <i>E. alata</i>	23
Figure 7. Pourcentage de l'activité anti-radicalaire de l'EMet de la plante et des standards... ..	25
Figure 8. L'activité anti radicalaire de l'EAlcT et EAlcaq et de différents standards (BHA, BHT et α-Tocophérol) vis-à-vis du radical DPPH (m±SD).	26
Figure 9. IC ₅₀ des différents standards et extraits d' <i>E. alata</i>	27
Figure 10. Pouvoir réducteur du fer des standards et de l'EMet, l'EHex d' <i>E. alata</i>	28
Figure 11. Pouvoir réducteur du fer de l'EAlcT et l'EAlcaq et des standards d' <i>E. alata</i>	29
Figure 12. Le pouvoir réducteur en absorbance 0,5 des différents extraits d' <i>E. alata</i> et des standards.	30

Liste des abréviations

A0,5: Absorbance 0,5

Ac: Absorbance control

At: Absorbance test

ATCC: American Type Culture Collection

BHA: Hydroxyanisole butylé

BHT: Hydroxytoluène butylé

CAT: Catalase

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

E. coli: *Escherichia coli*

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

EMet: Extrait méthanolique

EHex: Extrait de l'hexane

EAlcT: Extrait des alcaloïdes totaux

EAlcaq: Extrait des alcaloïdes (phase aqueuse)

FRAP: Test de la réduction du fer

GPX: Glutathion peroxydase

IC₅₀: Concentration d'inhibition 50%

Mé : Masse de l'échantillon en gramme

Me : Masse de l'extrait sec en gramme

Met: Méthanol

P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa

R (%): Rendement en pourcentage

S. aureus: Staphylococcus aureus

SOD: Superoxyde dismutases

Tpm : Tour par minute

UV: Ultra-violet

V / V: volume par volume

µg EAG/mg d'extrait: microgramme d'équivalent en acide gallique par un milligramme d'extraits sec

µg EQ/mg d'extrait: microgramme d'équivalent en quercétine par un milligramme d'extrait sec

Introduction

Introduction

Depuis plusieurs années, l'homme est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires, elles constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques. Ainsi, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Jaccot et Campillo, 2003).

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets néfastes dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Haleng *et al.*, 2007). Dans certaines situations, la production des Espèces Réactives oxygénées (ERO) augmente fortement, entraînant un stress oxydatif qui est défini d'une manière concluante pour être associé au vieillissement et aux maladies relatives à l'âge, y compris les maladies inflammatoires, le cancer, le diabète et bien encore.

Dans le même sens, le traitement par les antibiotiques des infections est associé à plusieurs effets indésirables tels que l'émergence d'espèces bactériennes résistantes ainsi que les inconvénients associés au traitement avec les antibiotiques comme l'exposition aux infections nosocomiales (Song, 2010). Par ailleurs, les plantes médicinales possèdent également un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales antibactériennes.

Parmi les plantes les plus répandues dans le Sahara algérien l'espèce *Ephedra alata* est connue pour son usage en médecine traditionnelle, cependant elle reste peu étudiée dans la littérature sur le plan local.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydant et l'activité antibactérienne des quelques extraits et des alcaloïdes de la plante *Ephedra alata* afin de déterminer la teneur en métabolites secondaires.

Notre recherche sera structurée en deux grandes parties dont la première, est consacrée à une synthèse bibliographique contenant des généralités sur la plante, sa composition phytochimiques et les activités antioxydant et antibactérienne. La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail expérimental :

Nous avons entamé cette partie par la préparation des extraits de la plante, ensuite une analyse phytochimiques préliminaires de la plante a été réalisée, dans une troisième étape étant le dosage de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux et pour finir l'évaluation des activités biologiques tels que l'activité antioxydant et antibactérienne. Finalement on expose nos résultats obtenus avec discussion.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Ephedra alata alenda

1.1. Famille des Ephedraceae

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephedra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009). Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes (Limberger *et al.*, 2013) et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Hegazi et El-Lamey, 2011).

1.2. *Ephedra alata alenda*

1.2.1. Position systématique

La systématique d'*Ephedra alata*, est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification d'*Ephedra alata alenda* selon (Ozenda, 1991).

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

1.2.2. Nom vernaculaire d'*Ephedra alata alenda*

En arabe : العنبرة , en français : Ephèdre et Ephedra en anglais.

1.2.3. Description botanique

Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes, est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, avec rameaux articulés et très

ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre. Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Ozenda, 1991; Derbel *et al.*, 2010), représenté dans la figure 1.



Figure 1. Représentation de l'*Ephedra alata alenda* (Kebili, 2016).

1.2.4. Répartition géographique

L'espèce *E. alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie (Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).

1.2.5. Propriétés et utilisation de la plante *E. alata*

Les espèces du genre *Ephedra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *Ephedra sinica* est l'espèce principale qui a été utilisée en Chine depuis plus de 5000 ans. *Ephedra Gerardiana* a aussi été utilisée dans la médecine traditionnelle indienne depuis l'ancien temps. Même durant le temps de l'empire Romain,

l'*Ephedra* était bien connue (Abourashed *et al.*, 2003). En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (Ould El Hadj *et al.*, 2003). Elle est très appréciée par le dromadaire. Au Maroc, elle est utilisée pour lutter contre le diabète. Ainsi, les tiges broyées d'*E.alata* et cuites dans du beurre, seraient ingérées par les femmes du Sahara pour avorter (Bellakhdar, 1997 ; Ould El Hadj *et al.*, 2003 ; Ghourri *et al.*, 2013).

D'après Cavaney *et al.* (2001) les espèces *Ephedra* d'Asie ont été récemment utilisées dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine). En Egypte, *E. alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (Nawwar *et al.*, 1984). En Arabie Saoudite, *Ephedra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (AL-Qarawi *et al.*, 2012).

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 (Abourashed *et al.*, 2003).

1.2.6. Compositions phytochimiques

Les espèces de l'*Ephedra* sont des sources naturelles de nombreux phytoconstituants incluant des alcaloïdes, des tanins, des saponines, des proanthocyanidines, des acides phénoliques, des flavonoïdes et des huiles essentielles (Hegazi et El-Lamey, 2011).

Il est bien connu dans la littérature que les propriétés biologiques traditionnelles de l'*Ephedra* sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine, proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (Caveney *et al.*, 2001). Notons que l'éphédrine et la pseudoéphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (Caveney *et al.*, 2001; Soni *et al.*, 2004; Phinney *et al.*, 2005).

Chapitre 2

Métabolites secondaires

2.1. Métabolites secondaires

Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (Visioli *et al.*, 2000).

2.1.1. Polyphénols

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (figure 2) (Bruneton, 1999).

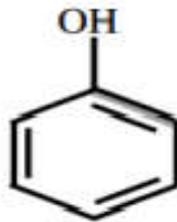


Figure 2. Structure du noyau phénol (Bruneton., 1999).

2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Tapas *et al.*, 2008) (figure 3).

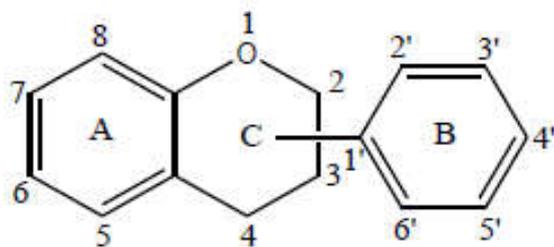


Figure 3. Structure de base des flavonoïdes (Tapas *et al.*, 2008).

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

2.1.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Paris et Hurabielle, 1981). Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Khanbabae et Ree, 2001).

2.1.4. Alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doté, à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées. Le regroupement d'un tel ensemble est par ailleurs confirmé par des réactions communes de précipitation avec les «réactifs généraux des alcaloïdes» (Bruneton, 2009).

Les alcaloïdes sont généralement classés selon leurs précurseurs biogénétiques communs et la position de l'atome d'azote, en:

a). Alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais contiennent ordinairement un azote hétérocyclique dans leurs structures qui dérivent des acides aminés.

b). Pseudo- alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ce ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoïdes et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques: monoterpéniques,

sesquiterpéniques, ou diterpéniques. Dans ce groupe on connaît également des substances issues du métabolisme de l'acétate, c'est le cas de la coniine, principe toxique de la ciguë.

c). Proto- alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'atome d'azote n'est pas inclut dans un système hétérocyclique mais forme plutôt des groupements aminés latéraux. Ils sont bio synthétisés à partir des acides aminés (Aniszewski, 2007).

Chapitre 3

Activités biologiques

3.1. Activité antioxydant

3.1.1. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Papazian et Roch, 2008 ; Poncelet et Sifer, 2011).

3.1.2. Radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudabl et Favier, 1997).

3.1.3. Les antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010). Les antioxydants se divisent en deux grandes catégories :

a). Antioxydant enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX).

b). Antioxydants non-enzymatiques

Acide ascorbique (Vitamine C), tocophérols (Vitamine E), caroténoïdes, les polyphénols naturels comme antioxydants.

3.2. Activité antibactérienne

Les infections microbiennes ont été la principale cause de maladies tout au long de l'histoire de l'humanité. Avec l'introduction des antibiotiques, on pensait que ce problème

devait disparaître. Alors que l'utilisation répandue et parfois inappropriée de ces agents, ainsi que leur utilisation extensive comme activateurs de croissance dans l'alimentation animale ont poussé les bactéries à développer des mécanismes de résistance leur permettant de survivre avec succès au cours des 50 dernières années en face d'un assaut continu d'antimicrobiens (Davies, 1994; Lowy, 2003 ; Dzidic *et al.*, 2008).

3.2.1. Antibiotique d'origine végétal

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires (Billing et Sherman, 1998). Les antimicrobiens d'origine végétale sont efficaces dans le traitement des maladies infectieuses, tout en atténuant ou en évitant un grand nombre d'effets secondaires qui sont souvent associés aux agents synthétiques (Arshad *et al.*, 2010).

Partie expérimentale

Chapitre 4

Matériel et méthodes

4.1. Matériel

4.1.1. Appareillages

Les réactifs et l'appareillage sont présentés dans l'annexe 1.

4.1.2. Matériel végétal

La plante *E. alata*, a été récoltée durant le mois de février 2019, dans la wilaya de Oued Souf, Algérie. L'identification botanique de la plante a été effectuée par Mme attaché de recherche au niveau du centre C.R.S.T.R.A (Biskra).

La partie qui a été utilisée est la partie aérienne des plantes composées de rameaux et de feuilles. Le matériel végétal a été séché à température ambiante, à l'obscurité et à l'abri de l'humidité. Après séchage, la plante est broyée et stockée soigneusement.

4.1.3. Matériel biologique

Pour étudier l'activité antimicrobienne de la plante, nous avons donc décidé de tester l'activité de différents extraits d'*E. alata* sur deux souches à GRAM négatif et une souche à GRAM positif. Les souches utilisées sont des souches de références, il s'agit de : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 5923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27852).

4.2. Méthodes

4.2.1. Préparation des extraits

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Bekheet *et al.*, (2011) avec une légère modification.

Dans une première étape l'extraction se fait avec le méthanol à 75%, 40g de la plante broyée a été soumise à une macération avec 400 ml de méthanol à température ambiante et sous agitation pendant 72 heures, après 72 heures l'extrait récupéré est filtré.

Dans une seconde étape, le macérât récupéré de la première extraction a été soumis à une seconde macération avec 400ml de méthanol à 75% avec les mêmes conditions, pendant 72 heures, le mélange et par la suite filtré.

Le filtrat récupéré subi une décantation (délipidation), un volume d'hexane (V/V) a été ajouté au filtrat, l'opération a été répétée trois fois jusqu'à épuisement total. Les deux phases (organique : extrait hexane et aqueuse : extrait méthanolique) récupérés sont évaporés dans une

rota vapeur (évaporateur rotatif) à 40°C, l'extrait est placé dans l'étuve à 37°C jusqu'à séchage.

4.2.2. Extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes se trouvent le plus souvent sous forme des sels d'acide minéraux ou organique. Leur mode d'extraction est très variable selon la nature de l'alcaloïde mais on trouve typiquement deux méthodes d'extraction par un solvant apolaire en milieu alcalin ou par un solvant polaire en milieu acide. Dans notre étude nous avons suivie la méthode décrite dans la figure 4, par Harbonne (1980) :

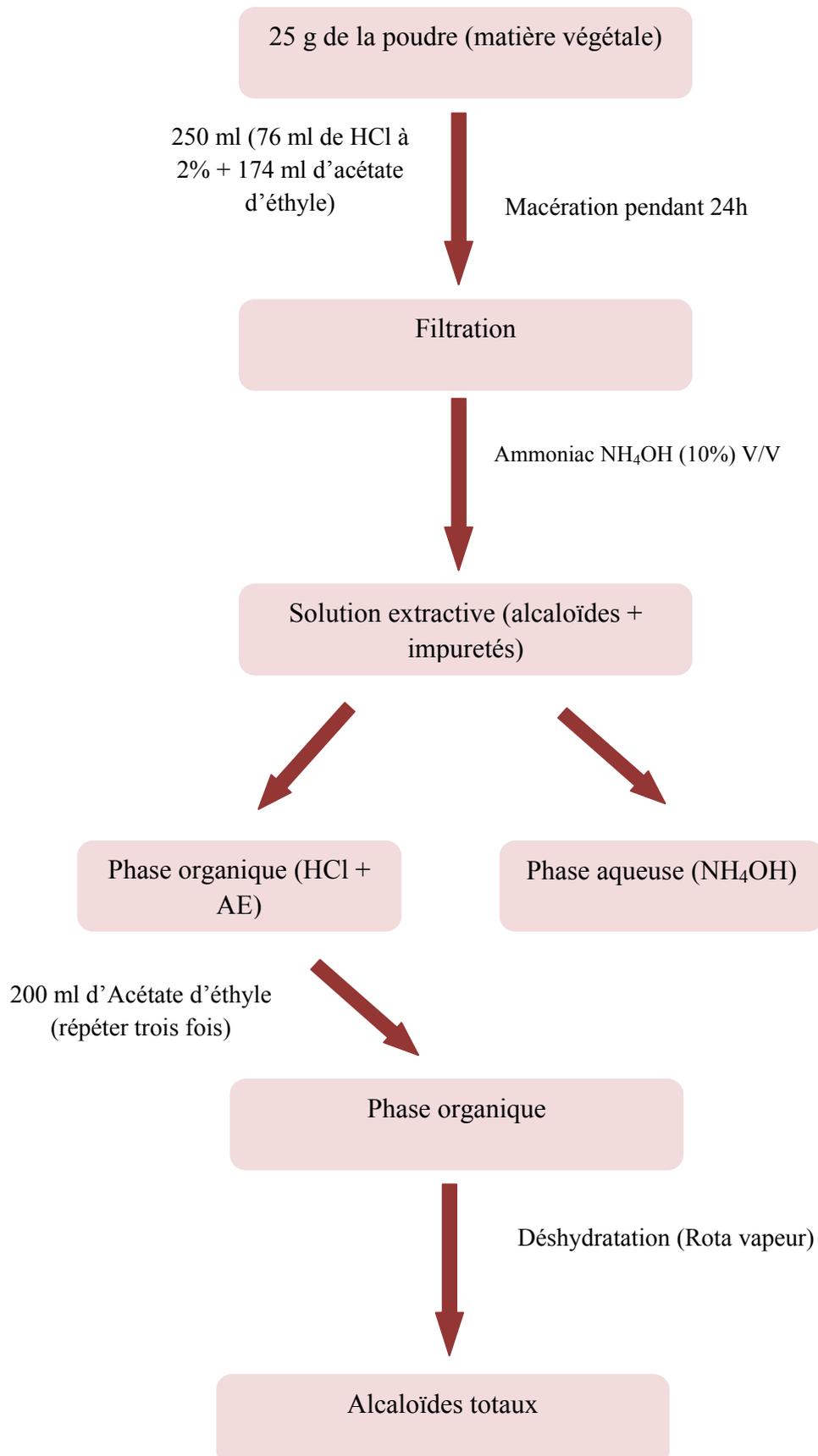


Figure 4. Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (Harbonne, 1980).

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

Les rendements des extractions (méthanolique, hexane, acétate d'éthyle) sont calculés suivants la formule ci-dessous (Boubekri, 2014).

$$R\% = Me / Mé * 100$$

R% : rendement en pourcentage.

Me : masse de l'extrait sec en gramme.

Mé : masse de l'échantillon en gramme.

4.2.3. Screening phytochimiques

La partie aérienne d'*E. alata* réduites en poudre a subi différents tests chimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des principales familles de métabolites secondaires.

4.2.3.1. Caractérisation des alcaloïdes

Dans un tube à essai, 3 ml d'extrait, auquel a été ajouté 1 goutte d'HCl concentré, et puis 2 gouttes de réactif de Dragendorff.

La présence des alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité orangé avec le réactif de Dragendorff (Koffi *et al.*, 2009).

4.2.3.2. Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃) permet de caractériser les polyphénols. A 2 ml de l'extrait, une goutte de solution aqueuse de chlorure ferrique à 5% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique la présence de polyphénols. (Koffi *et al.*, 2009).

4.2.3.3. Caractérisation des tanins

La présence de tanins est démontrée en ajoutant à 1 ml de chaque extrait 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée à 1%. L'apparition d'une couleur vert foncé ou bleu-vert indique la présence de tanins. L'apparition d'une couleur vert foncé indique la présence de tanins catéchiques. L'apparition d'une couleur vert foncé indique la présence de tanins

catéchiques. L'apparition d'une couleur bleu-vert indique la présence de tanins galliques (Boufellous *et al.*, 2017).

4.2.3.4. Caractérisation des flavonoïdes

La présence de flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé « réaction de Shinoda » (Lock *et al.*, 2006). Le test consiste à ajouter à 2ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur (Malec et Pamelio, 2003).

4.2.3.5. Caractérisation des stéroïdes

A 2 ml des différents extraits, 2ml d'anhydride acétique et 0,5ml d'acide sulfurique sont ajoutées. L'apparition d'une couleur violette, bleu puis verte indique leurs présences (Bruneton, 1999).

4.3.4. Dosage des métabolites secondaires

4.3.4.1. Dosage des polyphénols totaux

- Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965).

Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin Ciocalteu en un complexe ayant la couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés.

L'absorption est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (Charpentier et Boizot, 2006).

- Mode opératoire

Dans un tube à essai mélanger 100 µl d'extraits avec 500 µl du réactif de Folin Ciocalteu à 10 % (v/v) le mélange est incubée pendant 4 minutes, 400 µl de NaCO₃ (carbonate de sodium) à 7.5 % (v/v) est ajouté puis le mélange est soumis a une autre incubation pendant 2h à l'obscurité la lecture se fait dans la longueur d'onde 765 nm.

Le blanc du test contient 100 µl d'éthanol 500 µl de Folin Ciocalteu et 400 µl de NaCO₃. Pour chaque extrait, le test est réalisé en triplicata.

- Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent en acide gallique par un milligramme d'extraits sec ($\mu\text{g EAG/mg d'extract}$).

4.3.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

- Principe

La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon Lamaison et Carnat (Quettier-Deleu *et al.*, 2000), en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, après décomposition du chlorure d'aluminium, ayant le maximum d'absorption à 430 nm. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage.

- Mode opératoire

1 ml d'échantillon dilué a été mélangé séparément avec 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en μg par g d'équivalent en quercétine.

- Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations de la quercétine dans le méthanol.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent en quercétine par un milligramme d'extraits sec ($\mu\text{g EQ/mg d'extract}$).

4.3.5. Evaluation de l'activité antioxydant

4.3.5.1. Test anti radicalaire (DPPH)

- Principe

Le 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense (Cavar *et al.*, 2009). Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances anti oxydantes, qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune (Gadow *et al.*, 1997). Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents (Kroyer, 2003 ; Es-Safi *et al.*, 2007). La réaction peut se résumer de la façon suivante (figure 5) :

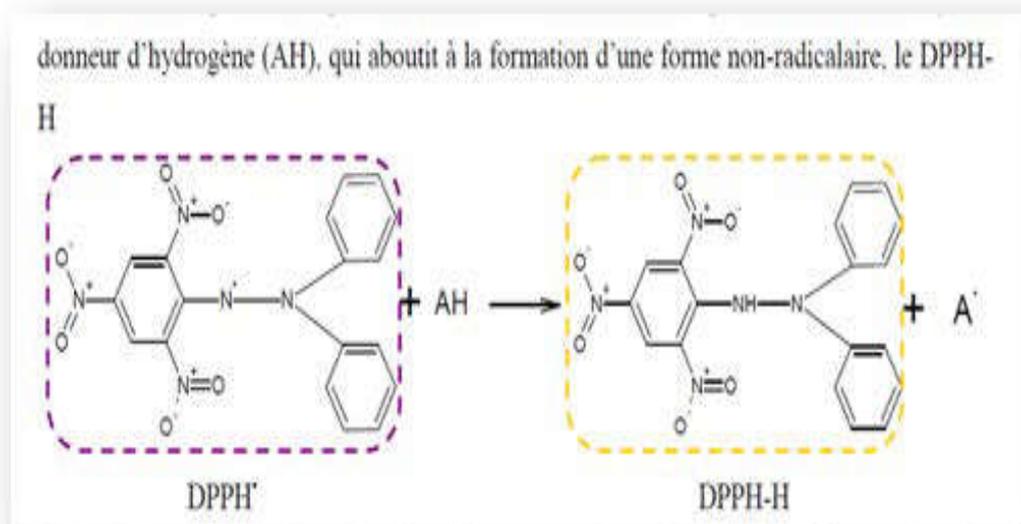


Figure 5. Mécanisme réactionnel intervenant lors du DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (Kebili, 2016).

- Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire des différents extraits a été testée par la méthode du radical libre DPPH selon Blois (1958). Pour chaque extrait et pour chaque concentration, 200 μ l d'extrait préparé dans l'éthanol est additionné à 800 μ l de solution DPPH préparée à 6 mg dans 100 ml d'éthanol. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30min à la longueur d'onde de 515 nm. Pour chaque extrait, le test est réalisé en triplicata.

Pour le blanc, l'extrait est remplacé par l'éthanol.

- Expression des résultats

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour Butyl hydroxy toluène (BHT), Butyl hydroxy anisol (BHA) et α -Tocophérol pris comme antioxydants standards.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition\%} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

Ac: Absorbance control

At: Absorbance test

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant des extraits, introduit le paramètre IC_{50} est introduit.

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

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ et les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

4.3.5.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP)

- Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti-radicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

- Mode opératoire

225 μl d'extraits de différentes concentration sont mélanger à 225 μl de tampon phosphate (pH = 6,6), par la suite l'ajout de 225 μl de K_3Fe avec agitation, le tout incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min. Après 20 min 225 μl de TCA (10%) a été immédiatement ajouter et directement centrifuger pendant 10 min à 3000 TPM. Un volume (375 μl) a été prélevé du surnageant au quel est ajouter 375 μl d'eau distillé et 75 μl de FeCl_3 . La lecture des Absorbances est réalisée à 700 nm. Contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le méthanol (Oyaizu, 1986 ; Hubert, 2006).

- Expression des résultats

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singelton et Rossi, 1995). Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

Les résultats sont obtenus en $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique et α -Tocophérol comme standards.

4.3.7. Test de l'activité antibactérienne

- Principe

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé (aromatogramme).

- Mode opératoire

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 McFarland ont été préparées, pour chaque microorganisme, dans 5 ml d'eau physiologique stérile, ce qui est traduit par une absorbance comprise entre 0.08 et 0.1 à 625 nm (Rahal, 2005). Un prélèvement à partir de cet inoculum sert à ensemercer de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par la technique d'écouvillonnage. Des disques Wattman stérile de 6 mm de diamètre sont chargés avec 10 μl des différents extraits puis placés sur les boîtes. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (Kada, 2018).

Des disques imprégnés de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs et d'autres imprégnés d'antibiotiques (Ampicilline, Amoxicilline/acide clavulanique) qui sont utilisées comme témoins positif. Toutes les déterminations sont faites en triplicata.

- Expression des résultats

L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle. Les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

Chapitre 5

Résultats et discussion

5.1. Rendement d'extraction

Les rendements et les différents aspects des extraits sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 2. Aspect, couleur et rendement de différents extraits d'*Ephedra alata alenda*.

Mode d'extraction	Aspect	Couleur	Rendement %
EMet	Poudreux	Brune	20.35%
EHex	Pâteux	Vert	0.5%
EAlcT	Pâteux	Noir	3.6%
EAlcaq	Pâteux	Marron foncé	9.84%

EMet : Extrait méthanolique

EAlcT : extrait des alcaloïdes totaux

EHex : Extrait de l'hexane

EAlcaq : extrait des alcaloïdes phase aqueuse

Après analyse des différents extraits d'*E. alata*, on note que l'EMet (20,35 %) a un rendement plus élevé que les trois autres extraits, suivi de l'EAlcaq avec un rendement de 9,84%, ensuite vient EAlcT égale à 3,6% et enfin l'EHex avec un pourcentage de 0,5%.

D'une manière générale, le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolites et dépend aussi du type de solvant utilisé, de sa polarité et de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction (Daoudi et *al.* 2015) ; La région et la période de la récolte sont aussi des facteurs déterminants du rendement (Keskes et *al.*, 2014).

Les résultats trouvés dans notre travail pour l'EMet et l'EAlcT, sont supérieur à ceux qui ont été mentionnés dans le travail de Kebili (2016), qui a obtenu un rendement de l'extrait brut méthanolique égale à 16,21 % et 0,96 % pour l'extrait des alcaloïdes totaux.

5.2. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques pour les extraits sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Mise en évidence de la présence ou absence de certaines familles de métabolites secondaires d'*E. alata*

Extractions	Extrait Méthanolique	Extrait de l'hexane
Métabolites		
Alcaloïdes	++	++
Phénols	++	-
Flavonoïdes	++	+
Tanins	++	-
Stéroïdes	++	+

Réaction fortement positive: ++ ; Réaction positive : + ; Réaction négative : -

Le test phytochimique d'*E. alata* réalisés a montré la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de stéroïdes pour l'EMet et l'EHex. Cependant il y a une différence de l'intensité, on remarque une intensité importante pour les phénols et les stéroïdes pour l'extrait méthanolique par rapport à l'EHex.

Par ailleurs, pour l'EMet on constate une présence des phénols et des tanins, mais une absence pour l'EHex.

Ces résultats sont comparés avec l'étude de Kebili, 2006 sur *E. alata* de la région d'Ouargla qui marque la présence des alcaloïdes, des phénols, flavonoïdes et tanins catéchiques.

5.3. Résultats du dosage des métabolites secondaire

5.3.1. Polyphénols et flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols se fait selon la méthode de Singleton *et* Rossi (1965) par l'utilisation de Réactif de Folin-Ciocalteu. Ainsi, la teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon Lamaison et Carnat (Quettier-Deleu *et al.*, 2000). La quantité des polyphénols totaux dans les extraits est exprimée en microgramme

équivalant d'acide gallique par un mg d'extrait sec et la quantité des flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme équivalent de quercétine par un mg d'extrait sec.

Les essais ont été réalisés en triple et les teneurs des composées phénoliques et des flavonoïdes totaux ont été estimées grâce à des droites d'étalonnages à des concentrations (25-200 $\mu\text{g/ml}$), l'acide gallique comme standard pour le dosage des polyphénols qui suit une équation de type : $Y = 0,003x + 0,104$, sachant que le coefficient de corrélation est de $R^2=0,997$.

Et avec une substance de référence, la quercétine pour le dosage des flavonoïdes qui suit une équation de type : $Y = 0,004$, sachant que le coefficient de corrélation est de $R^2=0,997$ (voir annexe 2). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.

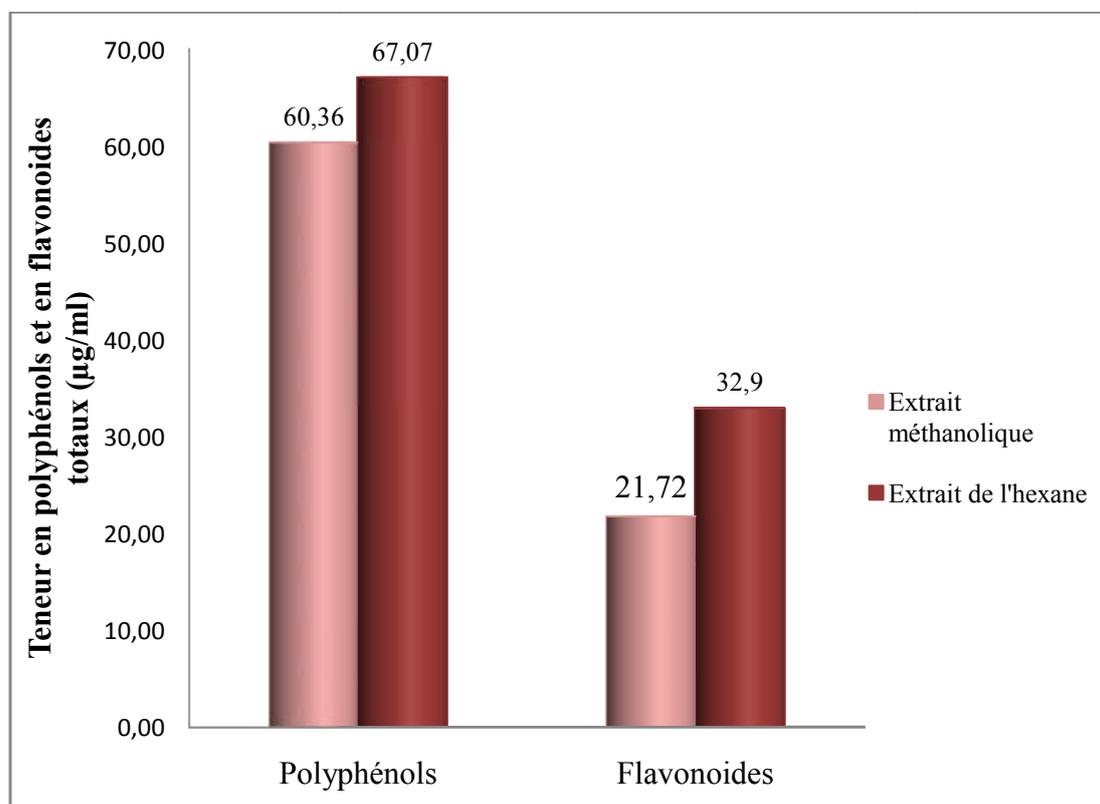


Figure 6. Teneur des extraits en polyphénols et flavonoïdes totaux en $\mu\text{g/mg}$ d'extrait sec d'*E. alata*.

Les résultats de la figure 4 ont montré que, l'EHex est plus riche en polyphénols totaux ($67,07 \pm 8,6 \mu\text{g EAG/mg}$) par rapport à l'EMet qui est de $60,36 \pm 7,60 \mu\text{g EAG/mg}$.

La différence entre la teneur en polyphénols des deux extraits s'explique par la différence en solubilité de ces composés dans les solvants extracteurs choisis (Macheix *et al.*, 2005). Elle peut aussi varier en fonction de la saison de culture et de récolte, la localisation géographique, les conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante et la durée de conservation, ainsi que les méthodes d'extraction et des dosages différents (Bentabar *et al.*, 2012).

D'après nos résultats on a remarqué que les molécules de polyphénols sont plus solubles dans l'EHex par rapport à l'EMet.

En comparant les résultats de l'espèce *E. alata*, l'EMet possède une teneur en polyphénols totaux très faible à celles étudié par Kebili, (2016), qui ont montré que la teneur en composés phénoliques totaux d'*Ephedra alata alenda* est de $291.45 \pm 4.37 \mu\text{g}$ d'équivalents d'acide galliques par milligramme d'extrait séché.

Pour les résultats de la teneur en flavonoïdes, on remarque que l'EHex est plus élevé en flavonoïdes totaux et contient une teneur de $32,9 \pm 8.66 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait sec par rapport à l'EM et qui est de $21,72 \pm 7.60 \mu\text{g EQ/mg}$.

La plante *E. alata* présente une teneur nettement supérieure en flavonoïdes dans l'EMet égale à $21,72 \pm 7.60 \mu\text{g EQ/mg}$ comparé au résultat de Kebili, (2016) qui a obtenue $11.29 \pm 0.12 \mu\text{g EQ/mg}$ pour l'extrait méthanolique.

Le facteur principal influençant sur la solubilité des flavonoïdes est leurs capacités à former des liaisons hydrogènes avec le solvant. Les flavonoïdes sont des substance moins soluble dans l'eau et dans des solvants très apolaires, mais soluble dans les solvant polaire (alcools) (Calias *et al.*, 1996).

Certains paramètres pendant la croissance de la plante telles que: la salinité, la sécheresse et l'exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires, peuvent également être la cause (Ghedadba *et al.*, 2014).

5.4. Activité antioxydant

5.4.1. Résultats du test anti radicalaire (DPPH)

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de nos extraits via le test DPPH, a conduit aux résultats illustrés par les figures 5 et 6.

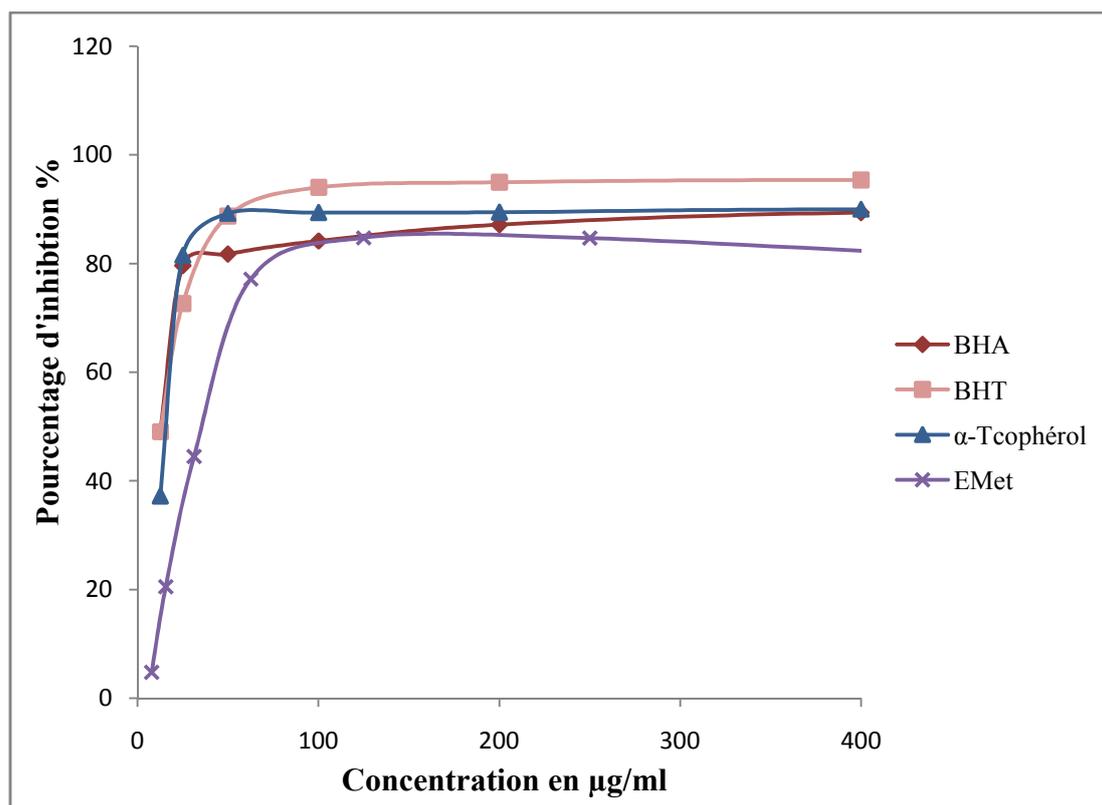


Figure 7. Pourcentage de l'activité anti-radicalaire de l'EMet de la plante et des standards

D'après ces résultats, on constate que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration.

L'EMet d'*E.alata a* enregistré un pourcentage d'inhibition de $84,77 \pm 4,30$ à une concentration de $125 \mu\text{g/ml}$, ce résultat est inférieur à ceux trouvés pour les standards. Le standard qui a le meilleur pourcentage d'inhibition est le BHT avec une valeur de $95,02 \pm 0,23$, suivie par le BHA ($90,14 \pm 0,00$), et enfin α -Tocophérol ($89,52 \pm 0,33$).

Ces résultats s'expliqueraient non seulement par la richesse des extraits en phénols totaux, mais aussi par la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles (polaires). Ces composés sont caractérisés par la présence des groupements hydroxyles qui jouent un rôle primordial dans l'activité anti radicalaire (Hamdeyazdan *et al.*, 2014).

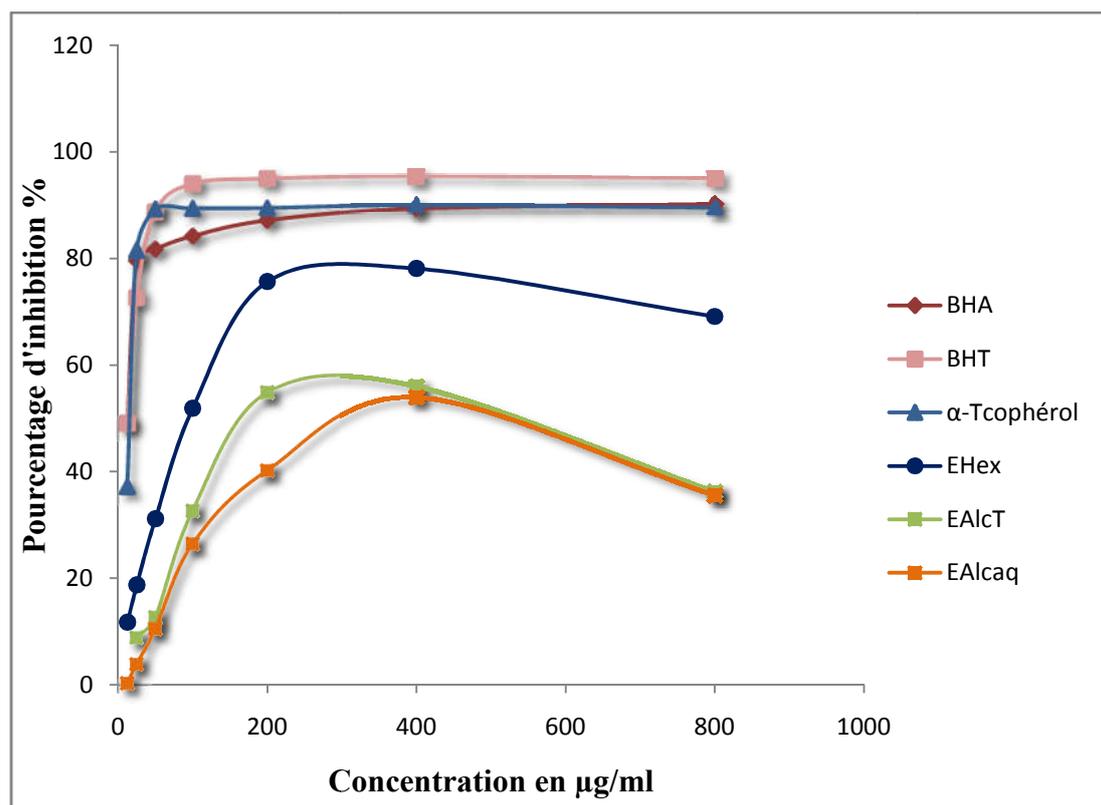


Figure 8. L'activité anti radicalaire de l'EHex, l'EAlcT et EAlcaq et de différents standards (BHA, BHT et α -Tocophérol) vis-à-vis du radical DPPH ($m \pm SD$).

Le pouvoir d'inhibition le plus élevé pour les extraits, est enregistré par l'EHex avec une valeur de $75,62 \pm 3,29$ à une concentration de $200 \mu\text{g/ml}$, suivie de l'EAlcT avec une valeur de $56,00\% \pm 0,46$ et enfin l'EAlcaq qui a manifesté une valeur de $40,15\% \pm 1,45$ à la même concentration ($200 \mu\text{g/ml}$).

Cependant, le BHA, BHT et α -Tocophérol, utilisé comme standards, semblent avoir de meilleurs pourcentages d'inhibition ($87,13 \pm 0,17$, $94,97 \pm 0,08$ et $89,45 \pm 0,22$ respectivement) à une concentration de $200 \mu\text{g/ml}$.

En comparant les quatre extraits (EMet, EHex, EAlcT et EAlcaq) et les différents standard (BHA, BHT et α -Tocophérol), on observe une augmentation de l'activité anti radicalaire proportionnel avec l'augmentation de la concentration, l'activité anti radicalaire est alors dose dépendante.

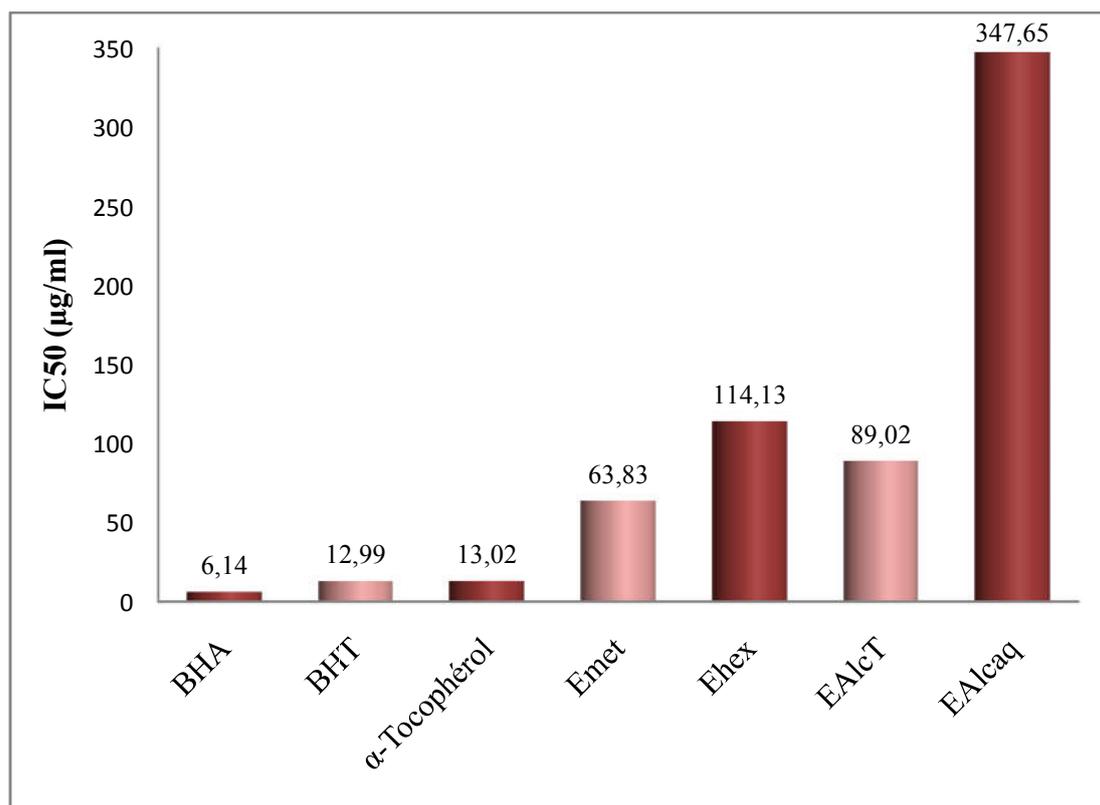


Figure 9. IC₅₀ des différents standards et extraits d'*E. alata*.

La concentration inhibitrice IC₅₀, qui assure le piégeage de 50% du radical DPPH, enregistrée par l'EMet est égale à 63,83±6,56 µg/ml, suivie par l'EAlcT avec IC₅₀=89.02±2.02 µg/ml, l'EHex avec une IC₅₀ = 114,13±8,21 µg/ml et enfin l'EAlcaq avec IC₅₀=347.65±16.94 µg/ml. Cependant, le BHA, BHT et l'α-Tocophérol, utilisé comme standards, semblent être les meilleurs agents piègeur vis-à-vis du radical DPPH, avec des valeurs d'IC₅₀ (6.14±0.41 µg/ml, 12.99±0.41 µg/ml et 13.02±5,17 µg/ml) significativement très faible en comparaison à celle des extraits.

En comparant nos résultats avec l'étude effectuée par Kebili, (2016) sur l'EMet de la partie aérienne de la plante *E.alata*, qui a montré que l'extrait méthanolique exerce un effet piègeur anti-radicalaire avec une valeur d'IC₅₀ égale à 260±0.013µg/ml. On réalise que nos résultats sont inférieur au siens, ce qui indique que l'extrait méthanolique a un important effet piègeur.

5.4.2. Résultat du test du pouvoir réducteur FRAP

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur des différents extraits augmente en fonction de la concentration, ces résultats sont représentés dans la figure 8.

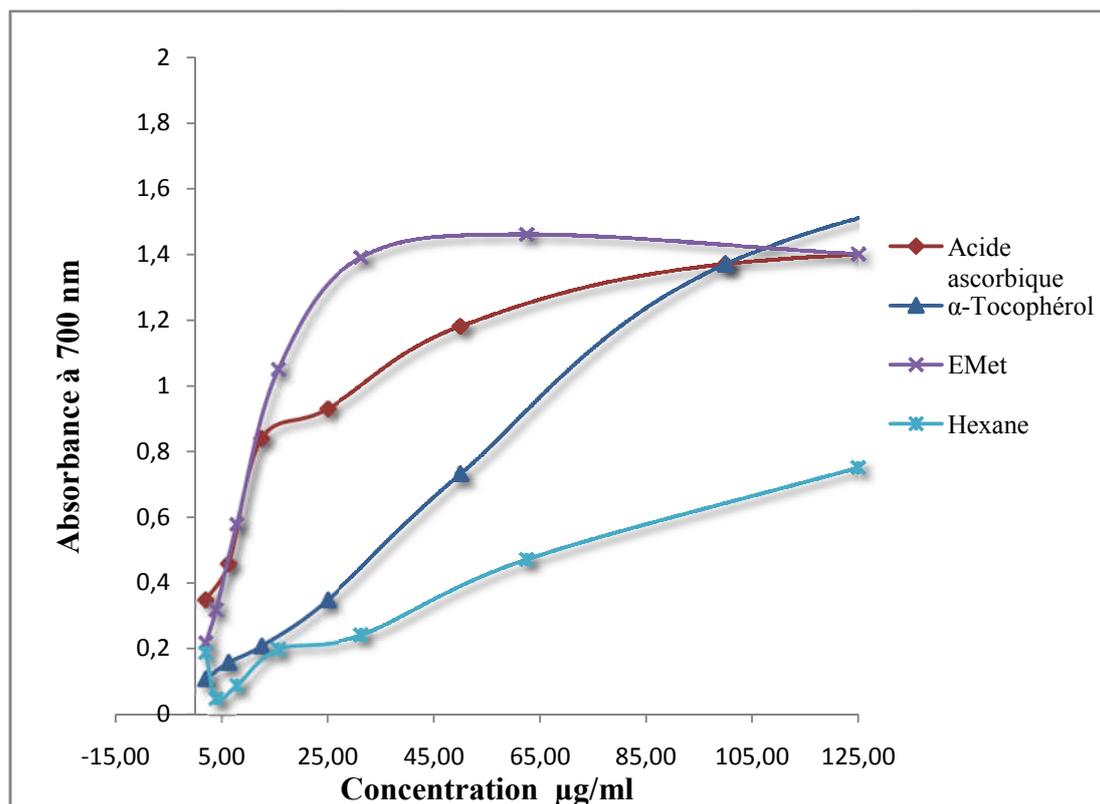


Figure 10. Pouvoir réducteur du fer des standards et de l'EMet, l'EHex d'*E.alata*.

Les résultats obtenus dans la présente étude ont montré que l'EMet et l'EHex de la plante *E.alata* possèdent une capacité réductrice concentration-dépendante. L'EMet a donné le pouvoir réducteur le plus important avec une absorbance de $1,40 \pm 0,12$ enregistrée à la concentration $125 \mu\text{g/ml}$, par la suite l'EHex qui a enregistré une absorbance de $0,75 \pm 0,03$ à la même concentration.

Par ailleurs on constate que le pouvoir réducteur de l'EMet est très proche du pouvoir réducteur exprimé par le standard acide ascorbique avec une absorbance de $1,44 \pm 0,21$ à une concentration égale à $200 \mu\text{g/ml}$. Par contre il reste inférieur au pouvoir réducteur de l' α -Tocophérol qui exprime une absorbance de $1,81 \pm 0,09$ à la concentration de $200 \mu\text{g/ml}$.

La capacité d'une plante à réduire le fer ferrique en fer ferreux peut être dû à sa richesse en antioxydants par rapport aux autres plantes. L'activité réductrice observée peut être due principalement à la présence des polyphénols qui ont des propriétés redox qui leur permettent d'agir comme étant d'agents réducteurs et/ou donneurs d'électrons (Djeridane *et al.*, 2006).

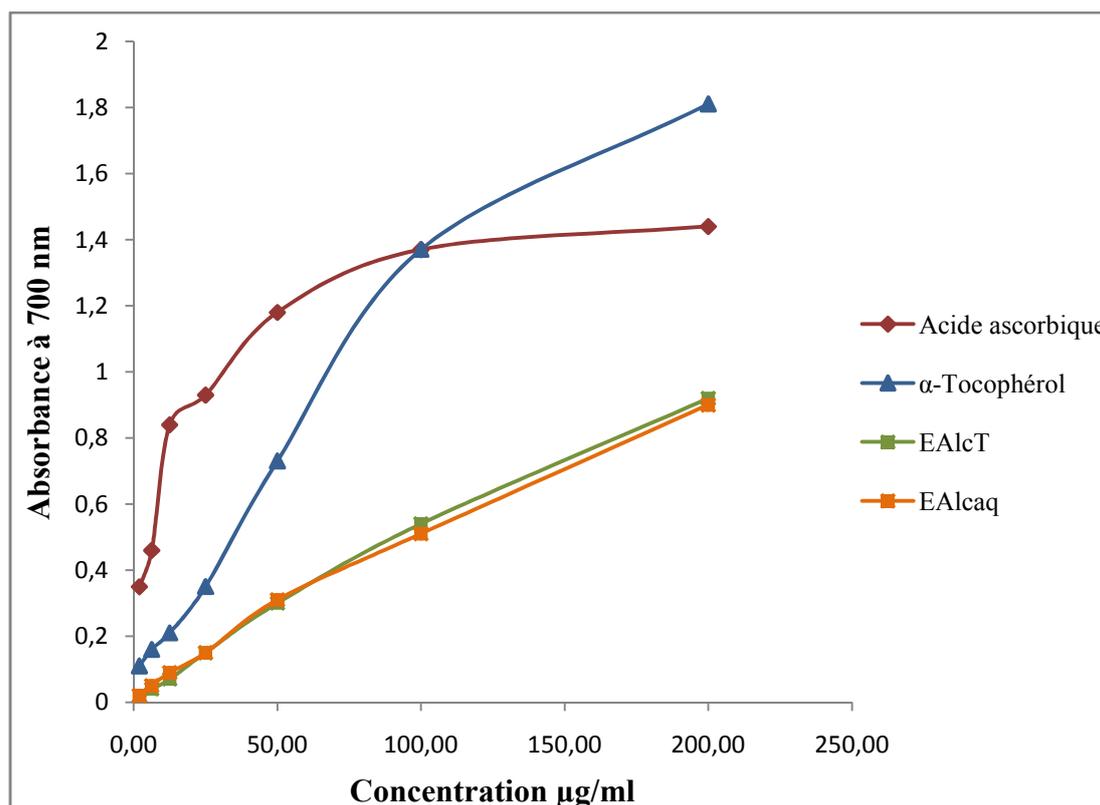


Figure 11. Pouvoir réducteur du fer de l'EAlcT et l'EAlcaq et des standards d'*E. alata*.

L'EAlcT a donné le pouvoir réducteur le plus important avec une absorbance de $0,92 \pm 0,01$ enregistrée à la concentration $200 \mu\text{g/ml}$, suivie de l'EAlcaq avec une absorbance de $0,90 \pm 0,05$ à la même concentration. En comparaison avec les standards on constate que le pouvoir réducteur de l' α -Tocophérol avec une absorbance de $1,81 \pm 0,09$ à la concentration égale à $200 \mu\text{g/ml}$ est meilleur que celui obtenu par l'acide ascorbique qui affiche une absorbance de $1,44 \pm 0,21$ et l'acide tannique $1,02 \pm 0,13$ à la même concentration.

Les résultats des standards, acide ascorbique et α -Tocophérol obtenus montrent que les absorbances des différents standards augmentent en fonction de la concentration, qui reste supérieur à l'EAlcT et l'EAlcaq d'*E. alata*.

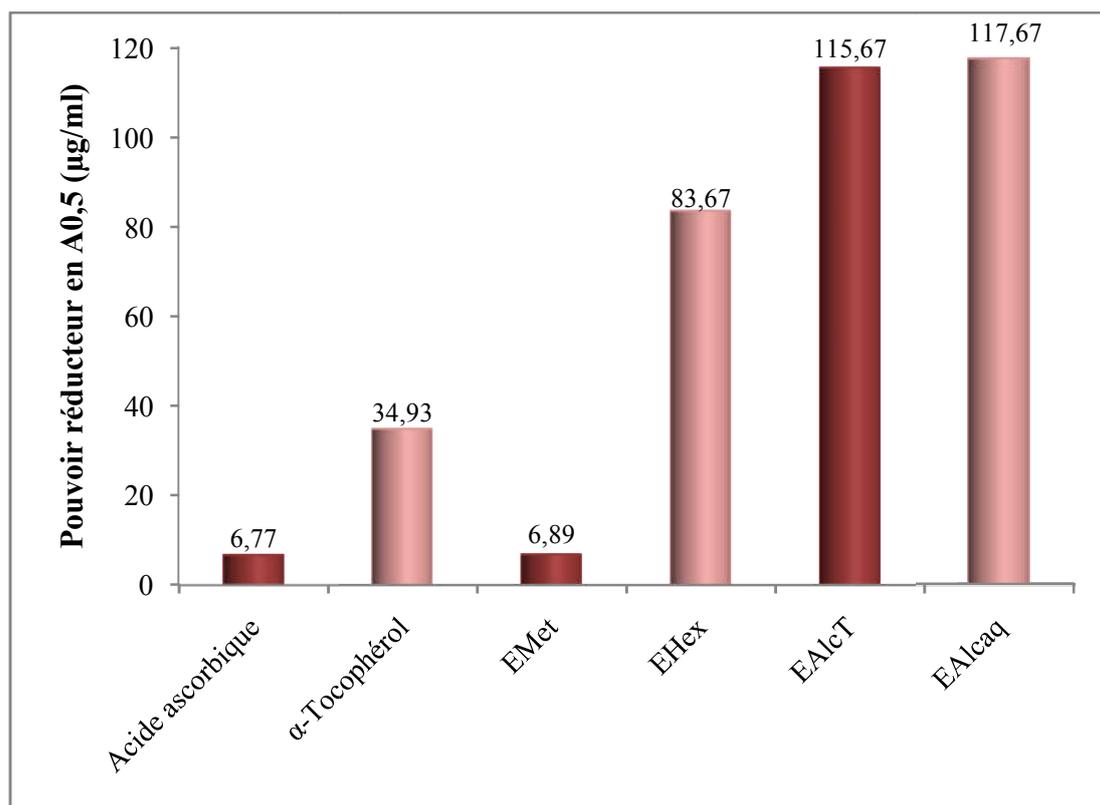


Figure 12. Le pouvoir réducteur en absorbance 0,5 des différents extraits d'*E. alata* et des standards.

Les résultats consignés dans la figure 10 montrent que l'EMet d'*E. alata* a manifesté un fort pouvoir réducteur $A_{0,5} = 6,89 \pm 0,77 \mu\text{g/ml}$, cet extrait est très proche au pouvoir réducteur enregistré par le standard acide ascorbique dont le $A_{0,5}$ est égale à $6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$.

L'EHex quand a lui possède un pouvoir réducteur faible par rapport a l'extrait méthanolique, il a enregistré un $A_{0,5} = 83,67 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$, suivie de l'EAlcT qui présente un $A_{0,5} = 115,67 \pm 2,63 \mu\text{g/ml}$ et enfin l'EAlcaq qui a donné un $A_{0,5} = 117,58 \pm 2,88 \mu\text{g/ml}$.

Le pouvoir réducteur des différents extraits reste faible par rapport aux standards utilisés qui donnent un pouvoir réducteur plus fort avec $A_{0,5} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$ pour l'acide ascorbique et l' α -Tocophérol ($A_{0,5} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$).

Cela est probablement lié au pouvoir de donation d'électrons que possède les standard et les extraits qui peut être due à leurs contenus en composés phénoliques et flavonoïdes, et par conséquence leur capacité également à neutraliser les radicaux libres.

Nos résultats sont en accord avec l'étude publiée par Kebili, (2016) a démontré l'importance du pouvoir réducteur présenté par *E. alata* qui a donné une valeur de $419,12 \pm 6,02 \text{ mg EAA/g}$ d'extrait méthanolique et $3,31 \pm 0,65 \text{ mg EAA/g}$ d'extrait des alcaloïdes totaux.

5.5. Résultats du test antibactérien

Le pouvoir antibactérien de l'EMet, l'EAlcT et l'EAlcaq a été examiné *in vitro* vis-à-vis trois souches (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). L'évaluation a été effectuée par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton (Rahal, 2005), en utilisant des disques imprégnés de différents extraits.

Les résultats obtenus ont révélé que le DMSO, comme un solvant approprié, ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance normale des souches microbiennes testées, de ce fait, il est employé comme un témoin négatif T(-). Par ailleurs, les souches testées ont montré de différentes sensibilités aux antibiotiques standards, utilisés comme des témoins positifs T(+), tels l'Ampicilline, Amoxicilline/acide clavulanique.

Les résultats expérimentaux obtenus dans la présente étude ont montré que les trois extraits ne présentent aucune activité *in vitro* vis-à-vis des trois souches *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* (voir annexe 4).

Nos travaux sont en désaccord avec les résultats trouvés par Kebili, 2016, qui ont démontré que l'extrait méthanolique et l'extrait des alcaloïdes totaux possèdent une activité antibactérienne intéressante contre de nombreuses souches, pour l'extrait méthanolique la plante a montré des zones d'inhibition de 8,8 mm, 9,7 mm et 13,5 mm contre *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. Aureus* respectivement. Et pour l'extrait des alcaloïdes totaux la plante a enregistré des zones d'inhibition de 7,3 mm, à 8,7 mm et 19 mm contre *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. Aureus* respectivement.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à cette absence de réponse lors des tests *in vitro*.

La plante est utilisée fraîche en médecine traditionnelle. Lors de cette étude, pour des raisons de conservation, nous avons pris le parti de sécher les plantes. Cette étape préliminaire de séchage peut engendrer des altérations chimiques des composés et provoquer la perte de l'activité.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales ou les extraits des plantes sont utilisées dans le traitement de nombreuses maladies, sont aussi utilisées dans les préparations pharmaceutiques.

Notre travail est consacré à l'étude de l'activité antioxydant et antibactérienne des différents extraits (méthanolique, hexane) et des alcaloïdes totaux de la partie aérienne d'*Ephedra alata alenda* appartenant à la famille des Ephedraceae.

L'extraction par macération dans le méthanol a permis d'obtenir un bon rendement d'extraction pour l'extrait méthanolique 20,35 %, suivie par l'extrait des alcaloïdes totaux 3,6 % puis l'extrait de l'hexane avec un rendement de 0,5 %.

La quantification en polyphénols et en flavonoïdes totaux des différents extraits nous a permis de déduire que la plante testée est une source prometteuse en polyphénols et en flavonoïdes. Les résultats obtenus nous ont révélé que l'extrait le plus riche en polyphénols et flavonoïdes est l'extrait de l'hexane.

Pour évaluer le potentiels antioxydant des différents extraits et des alcaloïdes totaux ont été évalué par deux méthodes différentes, le test de piégeage du radical libre DPPH, et le test du pouvoir réducteur (FRAP), qui montrent que les extraits testés ont une activité antioxydant variable, l'extrait méthanolique noté comme le plus actif ($IC_{50} = 63,83 \pm 6,56 \mu\text{g/ml}$ et $A_{0,5} = 6,89 \pm 0,77$) suivi de l'extrait de l'hexane puis l'extrait des alcaloïdes totaux. Cependant, pour le test du pouvoir réducteur (FRAP) l'extrait des alcaloïdes totaux a montré une meilleure activité par rapport à l'hexane.

L'étude de l'activité antibactérienne a permis de montrer que les extraits issus d'*E. alata* ne présentent aucune activité vis-à-vis des trois souches choisies (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*).

Nos résultats permettent de conclure que la partie aérienne d'*E. alata* représente une source naturelle d'agents antioxydants et peut servir comme traitement préventif contre le stress oxydatif. D'autres travaux qui doivent se concentrer sur l'étude de la composition chimique de la plante, le dosage des alcaloïdes totaux serait aussi très intéressant.

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

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abourashed E. A., El-Alfy A. T., Khan I. A., Walker L. 2003. Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res* 17:703-712.

Al-Qarawi A. A., Abd Allah E. F., Hashem A. 2012. Effect of Ephedra alata on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus*. *Pak. J. Bot* 44(1): 425-428.

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

Aniszewski T. 2007. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Application and Ecological Role*. Ed, Elsevier, p.316.

Arshad H., Shadma W., Iffat Z., Sarfaraj H. 2010. Antibacterial Activity of the Leaves of *Coccinia indica* (W. and A) Wof India. *Advances in Biological Research* 4(5):241-248.

B

Bekheet S. H. M., Abdel-Motaal F. F., Mahalel U.A. 2011. Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *Pergularia tomentosa* aqueous extracts on some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. *Tissue and Cell* 34:398-404.

Bellakhdar Jamal. 1997. *La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Ed. Ibis Press, p.764.

Billing J., Sherman P. W. 1998. Antimicrobial Functions of Spices : Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol* 73(1):3-49.

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

Boubekri C. 2014. Etude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, université Mohamed khider, Biskra, 160 p.

Boufellous M., Lrhorfi A., Berrani A., EL Haoud H., Zaher A., Bouhaddioui B., Bengueddour R. 2017. Phytochemical screening of a medicinal plant: *Lavandula stoechas* (Lamiaceae). *Journal of pharmacognosy and phytochemisyry* 6(2):56-62.

Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinale*. Edition Technique et documentation, p. 233.

Bruneton J. 2009. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier Tec & Doc: 4eme édition, p. 1268.

C

Calias P., Galanopoulos T., Maxwell M., Khayat A., Graves D., Antoniadis H. N., Dalarcao M. 1996. Synthesis of inositol-2-phosphate- cuercetin conjugates. *Carbohydr Res* 292: 83–90.

Cavar S., Maksimovic M., Vidic D., Paric A. 2009. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Aetemisia annua* L. From Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37: 479-485.

Caveny S., Charlet D.A., Freitqg H., Maier-Stolete M., Starratt A. N. 2001- New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). *American Journal of Botany* 88(7): 1199–1208.

Charpentier J-P., Boizot N. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestières. *Le Cahier des Techniques de l'Inra* 79-82.

D

Daoudi A., Sabiri M., M Bammou., Zair T., Ibijbijen J., Nassiri L. 2015. Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences* (87):8094- 8104.

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

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

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654–660.

Dzidic S., Suskovic J., Kos B. 2008. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol* 46(1):11–21.

E

Es-Safi N., Kollmann A., Khelifi S., Ducrot P.H. 2007. Antioxydative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure activity relationship. *L.W.T* 40: 1246- 1252.

Evans W.C. 2009. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders : 16^{ème} édition.

G

Gadaw A. V., Joubert., Hansmann C. F. 1997. Comparaison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), aTocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 632-638.

Ghedadba N., Hambaba L., Aberkane M. C., Oueld-Mokhtar S. M., Fercha N., Bousselsela H. 2014. Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. Algerian. *Journal of Natural Products* 2(2): 64-74.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.

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* 17: 2388-2411.

Goudable J., Favier A. 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11:115-120.

H

Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. 2007. Le stress oxydant. Rev Med Liege 62(10): 628-638.

Halliwell B., Gutteridge J M C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford 4^{ème} edition.

Hamedeyazdan S., Sharifi S., Nazemiyeh H., Fatihazad F. 2014. Evaluating antiproliferative and antioxidant activity of Marrubium crassidens . Advanced Pharmaceutical Bulletin 4(1): 459-464.

Hammoudi R. 2009. Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante Teucrium polium geyrii provenant de la région Tamanrasset. Thèse de magistère, Université Kasdi Merbah-Ouargla, 52pages.

Harborne J. B. 1980. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, 329-402.

Hegazi G.A.E., 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.

Hubert A. J. 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, Ecole doctorale des Sciences Ecologiques, 174p.

J

Jacotot B., Campillo B. 2003. Nutrition Humaine. Masson. Paris, p.311.

K

Kada S. 2018. Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologique : Biologie, Biochimie. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 172p.

Kebili Z, 2016. Contribution a l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Thèse de magistère ,Université Kasdi Merbah-Ouargla,102pages.

Keskes H., Mnafigui K., Hamden K., Damak M., ElFeki A., Allouche N. 2014. « In vitro antidiabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea*L. Leaves fromTunisia », Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Suppl 2:649- 655.

Khanbabae K., Ree T.R. 2001. Tannins. Classification and Defenition: Journal of Royal - Society of Chemistry 18: 641-649.

Koffi N., Beugré K., Guédé N., Dossahoua T., et Laurent A. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sciences & Nature 6 (2): 1-15.

Kroyer G. T. 2003. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient innovative. Food Science and Emerging Technologies 5: 101-105.

L

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

Lock O., Cabello I., Doroteo V., H. 2006. Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry* 20: 6-11.

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

M

Macheix J-J., Fleuriet A., Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechnique et universitaires romandes, Italie. p 2-3-12-13-14.

Malec L.S., Pamilio A.B. 2003. Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* 1: 30-38.

Martínez-Cayuella M.1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie 77: 147-161.

N

Nawwar M.A.M., El-Sissi H.I., Barakat H.H. 1984. Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry* 23(12):2937-2939.

O

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3122-3128.

Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H. 2003. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir* 3: 47-51.

Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307–315.

Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara: Centre National De La Recherche Scientifique. 3^{ème} édition, Paris, p. 662.

P

Papazian L., Roch A. 2008. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, p .153.

Paris M., Hurabielle. 1981. Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie: Tome 1. Masson, Paris. 339p

Phinney K.W., Ihara T. et Sander L.C. 2005. Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* 1077: 90–97.

Poncelet C., Sifer C. 2011. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, p. 84.

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

Q

Quettier-Deleu C., Gressie B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J., Bailleul F., Trotin F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 35–42.

R

Rahal K. 2011. Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS: 6^{ème} édition, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. 195 p.

S

Singleton V. L., Rossi J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult* 16:144-58.

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

Song F. L., Gan R. Y., Zhang Y., Xiao Q., Kuang L., Li H.B. 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.* 11:2362-72.

T

Tang S Y., Halliwell B. 2010. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies ? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394: 1-5.

Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3): 1089-1099.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Fellah H., Oueslati SC. 2010. Solvent effects on phenolic content and biological activities of the halophyte *limoniastrum mono petalum* leaves. *LWT-foos science and technology* 43:632-639.

V

Visioli F., Borsani L., Galli C. 2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47: 419–425.

Annexes

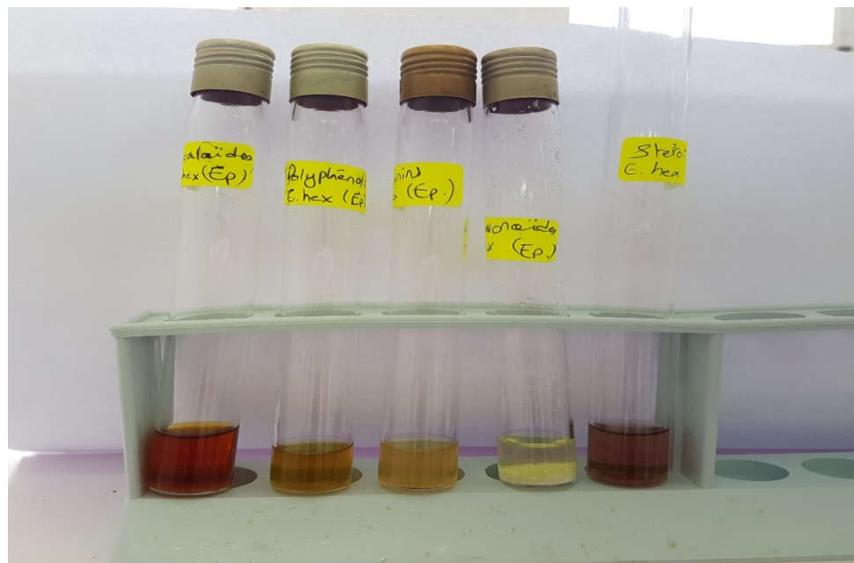
Annexes

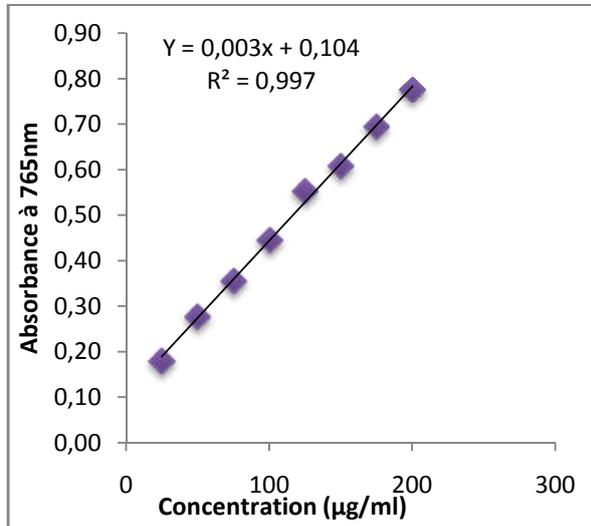
Annexe 1. Réactifs et Appareillage utilisées

- Réactifs
 - Acétate d'éthyle ($C_4H_8O_2$)
 - Acide acétique (CH_3COOH)
 - Acide gallique
 - Acide sulfurique (H_2SO_4)
 - Anhydre acétique ($C_4H_6O_3$)
 - Hydroxyanisole butylé (BHA)
 - Hydroxytoluène butylé (BHT)
 - Chlorure d'aluminium $AlCl_3$
 - Chlorure ferrique à 5% ($FeCl_3$)
 - Diméthylsulfoxyde (DMSO)
 - 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
 - Réactif de Dragendorff
 - Eau physiologique
 - Ethanol : (C_2H_6O), 100%, MM=46.07 g/mol, d=0.8
 - Chlorure de fer ($FeCl_3$) (0,1%)
 - Acide chloridrique (HCl)
 - Hexane
 - Ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$)
 - Magnésium métallique
 - Méthanol : (CH_3OH)
 - Gélose Mueller Hinton
 - Carbonate de sodium ($NaCO_3$)
 - Ammoniaque (NH_4OH)
 - Quercétine
 - Réactif de Folin Ciocalteu
 - TCA (10%)

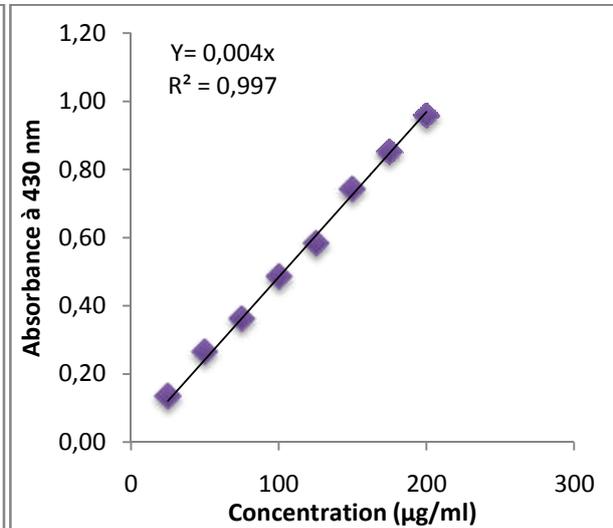
- Appareillages
 - Agitateur magnétique (FALC)
 - Autoclave (Systec VB 150)
 - Bain-marie (MEMMERT)
 - Balance (KERN EMB 220-1)
 - Balance analytique (KERN, ABT 220-5DM)
 - Centrifugeuses
 - Etuve (MEMMERT)
 - Evaporateur rotatif (Büchi)
 - Hotte
 - Micropipettes (SCIOLOGEX)
 - pH mètre (HANNA)
 - Plaque chauffante agitatrice (Stuart)
 - Spectrophotomètre UV-visible (SELECT)
 - Vortex (VELP Scientifica)

Annexe 2. Résultat des tests phytochimiques de l'extrait méthanolique et e l'extrait de l'hexane (alcaloïdes, polyphénols, tanins, flavonoïdes, stéroïdes).



Annexes 3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (a), et de la quercétine (b).

(a)



(b)

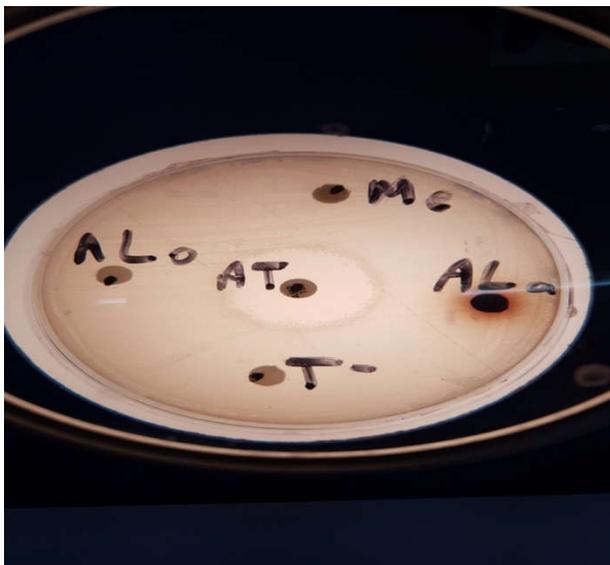
Annexe 4. Résultat du test antibactérien ((a) et (b) : *E. coli* ; (c) : *S. aureus* ; (d) : *P. aeruginosa*)



(a)



(b)



(c)



(d)

Ala : extrait des alcaloides totaux (phase aqueuse)

Alo : extrait des alcaloides totaux

At : témoin positif (antibiotique)

Me : extrait méthanolique

T- : témoin négatif (DMSO)

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا، لمستخلصات من الجزء الهوائي من *Ephedra alata alenda* وتحديد كمية البوليفينول والفلافونويد. الإستخلاص بواسطة النقع اعطانا المستخلص الميثانولي ، ومستخلص الهكسان، والفلويدات الكلية والتي تظهر افضل مردود للمستخلص الميثانولي (20.35%). تم قياس كمية البوليفينول والفلافونويد بطريقة Folin-Ciocalteu و trichloride الألومنيوم ، على التوالي. تم تنفيذ طرق مضادات الأكسدة في المختبر من خلال اختبار الارجاع الجذري DPPH واختبار قوة الاختزال (FRAP). وتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة نشر القرص في وسط جيلوزي. كانت أعلى كمية من البوليفينول والفلافونويد موجودة في مستخلص الهكسان (8.6 ± 67.07 ميكروغرام EAG / ملغم) أظهر نشاط مضادات الأكسدة أن جميع مستخلصات النبات التي تمت دراستها لها خصائص مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة. في حين أبلغ المستخلص الميثانولي عن أهم نشاط مضاد للأكسدة للاختبارين المستخدمين ، بما في ذلك ($IC_{50} = 63.83 \pm 6.56$ ميكروغرام / مل و $A_{0.5} = 6.89 \pm 0.77$ ميكروغرام / مل ، على التوالي. وبالتالي لنشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات من *E.alata* لم تظهر أي تأثير مضاد للبكتيريا على السلالات التي تم اختبارها. يمكن اعتبار هذه النتائج كنقطة انطلاق لتطبيقات هذه النباتات الصحية لعلاج أمراض معينة.

الكلمات المفتاحية *Ephedra alata alenda*، مضادات الأكسدة ، النشاط المضاد للبكتيريا، بوليفينول ، فلافونويد.

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydant et antibactérienne, des extraits de la partie aérienne d'*E. alata* et de déterminer leurs teneurs en polyphénols et flavonoïdes. L'extraction par macération nous a donné l'extrait méthanolique, l'extrait de l'hexane, et les alcaloïdes totaux, qui à montrer un meilleur rendement pour l'extrait méthanolique (20,35 %). Le dosage des polyphénols et flavonoïdes ont été quantifiés par la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium, respectivement. Les méthodes de l'activité antioxydant *in vitro* ont été effectuées via le test piègeur du radical DPPH et le test du pouvoir réducteur (FRAP). Et l'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé. La quantification en polyphénols et en flavonoïdes la plus élevée a été présente dans l'extrait de l'hexane ($67,07 \pm 8,6 \mu\text{g EAG/mg}$). L'activité antioxydant a montré que tous les extraits de la plante étudiée présentent des propriétés antioxydant à différent niveau. Cependant l'extrait méthanolique a signalé une activité antioxydant la plus importante pour les deux tests utilisés, dont son $IC_{50} = 63,83 \pm 6,56 \mu\text{g/ml}$ et un $A_{0,5} = 6,89 \pm 0,77 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Ainsi pour l'activité antibactérienne les extraits d'*E. alata* ont présenté aucun effet antibactérien vis-à-vis les souches testées. Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de ces plantes en santé pour le traitement de certaines maladies.

Mots clés : *Ephedra alata alenda*, activité antioxydant, activité antibactérienne, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract

The purpose of this study is to assess the antioxidant and antibacterial activity of *E. alata* aerial extracts and to determine their polyphenol and flavonoid content. The maceration extraction gave us methanolic extract, hexane extract, and total alkaloids, which showed a better yield for methanolic extract (20.35%). The determination of polyphenols and flavonoids was quantified by the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride method, respectively. *In vitro* antioxidant activity methods were performed with the DPPH radical trap test and reductive power test (FRAP). Antibacterial activity was evaluated by the disc diffusion method in the agar medium. The highest amount of polyphenols and flavonoids was in hexane extract ($67.07 \pm 8.6 \mu\text{g EAG/mg}$). Antioxidant activity showed that all the extracts of the plant studied have antioxidant properties at different stages. However, the methanolic extract reported the highest antioxidant activity for the two tests used, including $IC_{50} = 63.83 \pm 6.56 \mu\text{g/ml}$ and $A_{0.5} = 6.89 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$. Thus, for antibacterial activity, the *E. alata* extracts presented no antibacterial effects next to the strains tested. These results can be considered as a starting point for healthy applications of these plants for the treatments of some diseases.

Keywords: *Ephedra alata Alenda*, antioxidant activity, antibacterial activity, polyphenols, flavonoids.