



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

N série:.....

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

Evaluation de l'activité biologique de la plante médicinale de la
région d'Eloued *Ephedra alata* "alenda"

(*In vitro* et *In vivo*)

Présentés Par :

M^{lle} NESBA Safa

M^{me} HENKA Fatma

Devant le jury composé de :

- Président : M^r KHELEF Yahya M.A.B, Université d'El Oued
- Examineur : M^{lle} GUEMOUDA Massouda M.A.B, Université d'El Oued
- Promoteur : M^{me} MEDILA Ifriquia M.C.A, Université d'El Oued
- Co-encadreur : M^{me} ADAIKA Aicha Doctorante, Université d'El Oued

Année universitaire 2017/2018

Dédicace

Avec mes sentiments de gratitudes les plus profonds, Je dédie ce modeste travail.

À La lumière de ma vie ; Mes parents :

Mon père : NESBA Med laid et Ma mère : NECIRA Nadjet

sans eux je n'est pas pu être ce que je suis, qui ont œuvrés pour ma réussite, de par leurs amour, leurs soutiens, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute assistances et leurs présences dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soient-ils, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

À ma chère sœur : Maroua ,Et son mari "Ahmed"

À mes frères : Dhia , Ouejdi et Mounir

ainsi leurs femmes Meriem et Radja

À mes princesses : Meysoune et Saoussen

À mon fiancé : BOUHAMED Ismail

À mes chères amies: Samia, Asma, Saida, Fatma Zohra, samah, Khaoula et Sabrine.

À mes collègues de travail Khaoula, Imane, Zeineb, Sara et Dalel ;et tout l'équipement de Laboratoire d'EL MEDJED.

À toute ma famille et à tous ceux que j'aime.

Sans oublier mon binôme: FATMA et sa famille.

Safa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

*À 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, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père **ALI**.*

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman **HENKA ZEINEB** que j'adore.*

*À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon mari **BOUBAKER**.*

*Mon fils : **MOHAMMED ALBACHIR ANES**.*

*À toutes mes sœurs: **ASSIA, HOUDA, WAFÀ** et **YOUSSRA**.*

*À mon cher frère: **NADJEH**.*

*À : **RANIA, ABIR, HIBA, IBRAHIM, ABDELBADIE, KHANSA, NOHA, SAAD, KHALIFA***

À tous mes chers amis.

*À mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: **SAMIA, SAIDA, FATMA ZOHRÀ, SAMAH**.*

À tous les étudiants de ma promotion.

*Sans oublier mon binôme: **SAFA** et sa famille.*

Fatma

Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail*

*À notre promotrice de mémoire, **M^{me} MEDILA ifriqya**, maître de conférence A a la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, pour qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette mémoire. Hommage respectueux*

*Nous tenons à remercier profondément **M^{me} ADAIKA Aicha**, doctorante a la faculté de Technologie -Université d'El Oued, pour pour son sérieux et ses efforts Afin de nous aider et de nous orienter comme **co-encadreur**, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique tout au long de notre travail. Merci également pour votre disponibilité et votre gentillesse. Nous vous adressons notre profondes reconnaissances pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à **Mr KHELEF YAHIA**, maître d'assistant A a la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Aussi, nous tenons à exprimer également notre profonde reconnaissance à **M^{elle} GAMOU DA Messouda**, maître d'assistant B a la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, d'avoir accepté d'examiner notre travail. nous tenons à lui exprimer notre grand respect.*

*Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire d'**EL MEDJED** et **CENTRE DE PATHOLOGIE BENBORDI** pour leurs aides afin d'obtenir des bons résultats.*

*On adresse nos sincères remerciements a **Mr LAIB Ibrahim** ingénieur du laboratoire aussi à tout l'ensemble des membres du laboratoire département de la science de la nature et de la vie, Université HAMMA LAKHDAR, Eloued .*

*Je remercie également monsieur **Mr CHOVAIKH Atef**, maître de conférence A a la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, pour leur précieux conseil et leur aide.*

Nous réservons une mention particulière à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et leur aide et tout particulièrement: ALAYA Fatma, MEISSA Saida, FOUHMA fatima zohra, MEISSA Nadjat, AMAMRA Fatima, MEDALLEL Sara, TEDJANI Aicha, DEGACHI Rachida, KHIARI Nesrine et SALHI Imen.

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tout ce qui ont participé à la réalisation de ce mémoire. Surtout, Nesba med laid, Nesba med ouedjdi , Henka boubaker, Henka Ali , Necira Ibrahim , Foughma belgacem et Foughma mohamed.

Résumé

Dans le présent travail, l'objet est d'évaluer l'activité antioxydante (*In vitro* et *In vivo*), et l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la plante *Ephedra alata alenda* ; une plante saharienne, appartenant à la famille des Ephedraceae ; ont été testées. Le macérat a été préparé de la partie aérienne d' *Ephedra alata alenda*. *In vitro*, l'analyse phytochimique de l'extrait a révélé la présence des polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, terpènes et saponines. Le rendement d'extraction a été estimé à 8.21 %. Le contenu de l'extrait en polyphénols est de 57.59 µg eq/mg ES. et pour les flavonoïdes 30.60 µg eq/mg ES. L'évaluation de l'effet antioxydant de ces extraits par le piégeage du radical libre DPPH a donné la valeur d'IC₅₀ de 0.049 mg/ml. Ainsi l'activité antioxydante par la voltamétrie cyclique vis-à-vis le radical superoxyde anion O₂•⁻ a donné des bons résultats. En revanche, l'activité antioxydante totale pour l'extrait aqueux est plus importante que celle de l'acide gallique. En fin l'activité antibactérienne évaluée n'a montré aucun effet antibactérien vis-à-vis les souches référencées utilisées.

In Vivo, Notre expérimentation a été réalisée chez 25 rats wistar; divisés en 5 lots, un lot témoin et 4 lots sont exposés au métribuzine pendant 50 jours; le troisième lot est traité par 0.1ml de cisplatine et le quatrième et cinquième par deux doses d'*Ephedra alata alenda* de l'ordre 100 et 200 mg/kg . L'analyse montre une variation significative du poids relatif du foie de groupe exposé au métribuzine. Des changements notables dans les paramètres biochimiques étudiés, aussi pour les paramètres de stress oxydatif chez le lot exposé au métribuzine. En revanche, le traitement par l'extrait aqueux avec les deux doses et par le cisplatine donne des résultats similaires en normalisant le poids relatif de foie et les paramètres biochimiques étudiés et en diminuant l'état de stress. L'étude histologique a confirmé les résultats biochimiques.

Mots clés : *Ephedra alata alenda*, Enquête Ethnopharmacologique, Activité antibactérienne, Activité antioxydante, Métribuzine, paramètres biochimiques, stress oxydatif.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاطية المضادة للأكسدة (في المختبر و في الجسم الحي) ، والنشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلص المائي لنبات *Ephedra alata alenda* ، وهو نبات صحراوي ينتمي لعائلة Ephedraceaes. تم إعداد النقع من الجزء الهوائي لنبتة الغلدة، حيث أبرز الكشف الكيميائي في المختبر لهذا المستخلص على احتوائه على كل من البوليفينولات ، الفلويونات، التانينات ، الفلافونيدات، التربينات والصابونينات ، كما تم تقدير مردود المستخلص ب 8.21 % ، و التقدير الكمي لعديدات الفينول ب 57.59 (ميكروغرام مكافئ من حمض الغاليك/ مع من المادة الجافة للمستخلص) وبالنسبة للفلافونيدات ب 30.60 (ميكروغرام مكافئ من الكرسيتين/ مع من المادة الجافة للمستخلص). وأعطى تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص من خلال تثبيط الجذور الحرة (DPPH) قيمة IC_{50} تقدر بـ 0.049 ملليغرام/ مل . وعلاوة على ذلك ، النشاطية المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية، باستخدام تقنية الفولت اومبيروميتري ، للجذر فوق الأكسيد قد أفرزت نتائج جيّدة. من ناحية أخرى ، وضحت الفعالية المضادة للأكسدة الإجمالية أهمية المستخلص المائي مقارنة بـ حمض الغاليك. في الأخير لم يظهر النشاط المضاد للبكتيريا الذي تم تقييمه أي تأثير مضاد للبكتيريا بالمقارنة مع السلالات المرجعية .

على مستوى الجسم الحي، أجرينا دراستنا على 25 أنثى من الجرذان البيضاء ، تم تقسيمها إلى خمس مجموعات، مجموعة غير معالجة ، وأربع مجموعات تم تعريضها للمبيد الكيميائي الميتريبيزين خلال 50 يوما : حيث أن المجموعة الثالثة عولجت ب 0,1 مل من سيسبالاتين و المجموعتين الرابعة والخامسة عن طريق جرعتين من *E.alata alenda* 100 و 200 مغ /كغ على التوالي. أظهرت النتائج المتحصل عليها وجود تفاوت في الوزن النسبي لكبد المجموعة المعرضة للميتريبيزين. وقد لوحظت تغييرات بارزة في المعايير الدموية والبيوكيميائية المدروسة . ومع ذلك، فإن النتائج تكشف أيضا عن وجود إجهاد تأكسدي في المجموعة التي تعرضت للميتريبيزين. غير أن العلاج بواسطة جرعتي المستخلص النباتي ، كذلك بواسطة سيسبالاتين أعطى تقريبا نفس النتائج، في تعديل الوزن النسبي للكبد والمعايير الدموية و البيوكيميائية وخفض حالة الإجهاد. وفي الأخير دراسة مقاطع أنسجة الكبد كانت موافقة للنتائج البيوكيميائية

الكلمات المفتاحية : "الغلدة"، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط المضاد للأكسدة ، الميتريبيزين ، المعايير البيوكيميائية ، الإجهاد التأكسدي .

Liste des abréviations

AFP : Alpha-FeotoProtéine	EDTA : Acide éthylène Diamine Tétraacétique
ALAT : alanine aminotransférase	Epa : potentiel de pic anodique
AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium	Epc : potentiel de pic cathodique
ASAT : aspartateaminotransférase	ERO : espèces réactives de l'oxygène
BHA : butylhydroxyanisole	ESM : Ecartype moyenne Fc g
BHT : Butylhydroxytoluène	FeCl₃ : Chlorure de fer
BSA : Sérum bovin albumine	FRAP : Ferric ion reducing antioxidant power
Cispt : Cisplatine	FVT : Flavonoïdes totaux.
cm : centimètre	GSH : Glutathion réduite
CO₂ : anhydride carbonique	GSTs : glutathion-S-transférase
D100 : Dose 100 mg/kg	H : Hydrogène
D200 : Dose 200 mg/kg	H₂O : eau
DDT : Dichlorodiphényltrichloréthane.	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
DMSO : Dimethyl sulfoxide	HCl : Acide chlorhydrique
DO : Densité Optique	IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle	In : Inflammation.
DT : deoxythymidine	Ipa : courant de pic anodique
DTNB : 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque	Ipc : courant de pic cathodique
E.alata : <i>Ephedra alata</i>	K₂HPO₄ : Phosphate de potassium dibasique
E₀ : Potentiel formel	M : molaire

MDA : malondialdéhyde

min : minute

ml : millilitre

mm millimètre

mmol : millimole

Moy : moyenne

Na₂CO₃ : Bicarbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NAD⁺: Nicotinamide Adénine
Dinucléotide

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

NH₃ : ammoniac

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

Nm : nanomètre

NS : différence Non Significative

Nz : Nécrose zonale

O₂^{•-} : superoxide

OH[•] : radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

OS : Stress oxydatif.

PAL : phosphatase alcaline

PAL : Phosphatase Alcaline.

PG : gallate propylée

PH : potentiel Hydrogène pNPP

PPM : PhosPhoMolybdate

PPT : Polyphénols totaux

prot : protéine

ROS : Reactive Oxygen Species

SM : métabolites secondaires

TGO : glutamate oxaloacétatetransaminase

TGP : glutamate-pyruvate-transaminase

Tm : Température de

TP : Témoin Pesticide

tr/min : Tour par minute.

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

UI/L : Unité internationale par litre.

UV : Ultraviolet

UV-Vis : UltraViolet-Visible.

Vis : Visible

°C : Degrés Celsius C

ΔEp : Différence de potentiel

μg EAG/ mg MS : Microgramme
d'équivalent d'acide gallique par
milligramme de matière sèche.

μg EQ/mg MS : Microgramme
d'équivalent de quercétine par
milligramme de matière sèche.

YGT : Gamma Glutamyl Transférase.

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Structure de base des composés phénoliques	04
Figure 02	Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.	05
Figure 03	Squelette de base des flavonoïdes	06
Figure 04	Structures chimiques de quelques flavonoïdes	07
Figure 05	Principaux acides hydroxycinnamiques	08
Figure 06	Principaux acides hydroxybenzoïques	08
Figure 07	Principaux types de coumarines	09
Figure 08	Exemple des tanins hydrolysables	10
Figure 09	Exemple des tanins condensés.	11
Figure 10	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants	13
Figure 11	Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques	16
Figure 12	Structures chimiques des antioxydants naturels	17
Figure 13	Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri	20
Figure 14	Répartition géographique de l' <i>Ephedra</i> dans le monde	22
Figure 15	<i>Ephedra Alata Alenda</i> (photo originale)	24
Figure 16	L' <i>Ephedra alata</i> (photo originale)	27
Figure 17	Carte d'Algérie représentée la Wilaya d'El-Oued	28
Figure 18	Localisation géographique de la zone d'étude	29
Figure 19	Protocole de préparation de l'extrait aqueux	32
Figure 20	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	36
Figure 21	Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus réversible d'oxydo-réduction	37
Figure 22	Voltammogramme cyclique d'oxygène.	40
Figure 23	Protocol expérimentale de l'étude.	43
Figure 24	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon sexe	53
Figure 25	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon l'âge (Année)	54
Figure 26	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête	54

	ethnobotanique selon la reconnaissance	
Figure 27	Représentation statistique descriptive des résultats d'enquête ethnobotanique selon la source d'information	55
Figure 28	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le niveau d'étude	56
Figure 29	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le mode d'utilisation	56
Figure 30	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le mode de préparation	57
Figure 31	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon la partie utilisée	58
Figure 32	Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon les maladies traitées	58
Figure 33	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique	60
Figure 34	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux	60
Figure 35	Valeur IC50 d'extrait aqueux d' <i>Ephedra Alata</i> et composé standard (acide ascorbique)	61
Figure 36	Les courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la voltammétrie cyclique	62
Figure 37	Voltampérogramme cyclique d'extrait aqueux d' <i>Ephedra Alata</i>	62
Figure 38	Voltammogrammes de $O_2^{\bullet-}$ en présence de différentes concentrations d'acide gallique, dans le DMF + 0.02 M Bu4NBF4, vitesse de balayage 100mv	64
Figure 39	Voltammogrammes de $O_2^{\bullet-}$ en présence de différentes concentrations d'extrait aqueux , dans le DMF + 0.02 M Bu4NBF4, vitesse de balayage 100mv	64
Figure 40	Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction du concentration de l'acide gallique	64
Figure 41	Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction du concentration d'extrait aqueux d' <i>Ephedra Alata</i> .	65

Figure 42	IC ₅₀ d'Acide gallique et d'Extrait aqueux	65
Figure 43	Poids relatif des organes (foie, reins ,cœur, et poumon) chez les différents groupes expérimentaux	66
Figure 44	Effet de traitement par l'extrait aqueux d' <i>Ephedra alata</i> et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP), le taux de PAL et le taux de LDH chez les rattes exposées au métribuzine	67
Figure 45	Effet de traitement par l'extrait aqueux d' <i>Ephedra alata</i> et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine) et la concentration sérique en glycémie chez les rattes exposées au métribuzine	68
Figure 46	Concentration de Malondialdéhyde (MDA) hépatique, pulmonaire, renal et cardiaque chez les différents groupes expérimentaux	69
Figure 47	Concentrations tissulaires de catalase chez les différents groupes expérimentaux	70
Figure 48	Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux	71
Figure 49	Observation microscopique d'une coupe histologique du foie chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)	72
Figure 50	Observation microscopique d'une coupe histologique du poumon chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)	73
Figure 51	Observation microscopique d'une coupe histologique du rein chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)	74

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant	15
Tableau 02	Mécanisme d'action de quelque antioxydante	18
Tableau 03	La classification scientifique d' <i>Ephedra alata</i>	23
Tableau 04	Rendements d'extrait sec d' <i>Ephedra alata</i>	59
Tableau 05	Mise en évidence de certaines métabolites secondaires dans l' <i>Ephedra Alata</i> "Alenda"	59
Tableau 06	Dosage des composés phénoliques dans l'extrait aqueux	60
Tableau 07	Paramètres électrochimiques des fractions éthanoliques d'extrait aqueux	64
Tableau 08	Activité antioxydante totale d'extrait aqueux d' <i>Ephedra alta</i>	64
Tableau 09	Les intensités du courant d'oxydation (Ipa) de l'oxygène et les concentrations dans la cellule ainsi que les pourcentages d'inhibition de superoxyde , pour l'antioxydant standard et l'extrait aqueux d' <i>Ephedra Alata</i> .	66
Tableau 10	IC ₅₀ d'Acide gallique et d'Extrait aqueux avec les équations linéaire	67
Tableau 11	Etude de l'activité inhibitrice d'extraits de <i>E.alata</i>	68

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les métabolites secondaires et les activités biologiques.....	3
I.1. Les métabolites secondaires.....	3
I.1.1. Généralité.....	3
I.1.2. Définition	3
I.1.3. Rôle biologique	3
I.1.4. Distribution et localisation	4
I.1.5. Classification.....	4
I.2. Les activités biologiques.....	12
I.2.1. Les activités antioxydants	12
I.2.1.1. Introduction	12
I.2.1.2. Stress oxydatif	13
I.2.1.3. Les radicaux libres	13
I.2.1.4. Les antioxydants	14
A. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant	14
B. Classification des antioxydants.....	15
C. Mécanismes d'action des antioxydants	17
D. Implications pathologiques du stress oxydant	18
E. Stress oxydant et cancer	19
I.2.2. Activité antibactérienne.....	19

Chapitre II. Les plantes médicinales et <i>Ephedra alata alenda</i>.....	21
II.1. Définition des plantes médicinales.....	21
II.2. Définition des principes actifs.....	21
II.3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle.....	21
II.4. Généralités sur la plante.....	22
II.4.1. Genre <i>Ephedra</i>	22
II.4.2. Sous espèce <i>Ephedra alata alenda</i>	23
II.4.2.1. La classification scientifique d' <i>Ephedra alata</i>	23
II.4.2.2. Description botanique.....	23
II.4.2.3. Répartition géographique	24
II.4.2.4. Utilisation	24
II.4.2.5. Pharmacologie	25
II.4.2.6. Toxicologie	26

PARTIE II :PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1: Matériels et méthodes	27
I.1. Matériels	27
I.1.1. Matériels biologiques	27
I.1.1.1. Matériel Végétal.....	27
I.1.2.2. Les microorganismes utilisés.....	29
I.1.2.3. Matériel animal.....	30
I.1.2.4. Enquête ethnobotanique.....	31
I.1.2. Matériel d'étude au laboratoire.....	31
I.2. Méthodes.....	31
I.2.1. Préparation des extraits	31
I.2.1.1. Extraction par macération à l'eau.....	31
I.2.1.2. Détermination du rendement.....	31
I.2.2. Etude <i>in vitro</i>	33
I.2.2.1. Les tests phytochimiques.....	33

I.2.2.2. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	34
I.2.2.3. Etude de l'activité antioxydant	35
A. Par méthode spectrométrique	35
B. Par méthode électrochimique	37
I.2.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait	41
I.2.3. Etude <i>in vivo</i>	42
I.2.3.1. Préparation de la solution du pesticide	42
I.2.3.2. Préparation des solutions des extraits végétaux	42
I.2.3.3. Préparation le médicament de cisplatine	42
I.2.3.4. Conception expérimentale.....	42
I.2.3.5. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes	44
I.2.3.5.1. Méthodes de l'analyse sanguine.....	44
I.2.3.5.2. Dosage des paramètres de stress oxydatif.....	47
I.2.3.5.3. Préparation des échantillons pour l'étude histologique.....	50
I.2.4. Analyses statistiques	52
Chapitre 2: Résultats et discussions.....	53
II.1. Résultats et interprétation.....	53
II.1.1. Enquête ethnobotanique	53
II.1.2. Rendement d'extraits aqueux	59
II.1.3. Etude <i>in vitro</i>	59
II.1.3.1. Tests phytochimique.....	59
II.1.3.2 Analyse quantitative des composés phénoliques	60
II.1.3.3. Etude de l'activité antioxydant	60
A. Par méthode spectrométrique.....	60
B. Par méthode électrochimique.....	62

II.1.3.4. Etude de l'activité antibactérienne d'extraits brut d' <i>Ephedra alata</i>	68
II.1.4. Etude <i>in vivo</i>	69
II.1.4.1. Effet de traitement par l'extrait d' <i>Ephedra alata</i> et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine.....	69
II.1.4.2. Effet de traitement par l'extrait aqueux et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les rattes exposées au métribuzine.....	70
II.1.4.3. Effet de traitement par l'extrait d' <i>Ephedra alata</i> et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine.....	80
II.1.4.4. Etude histologique.....	75
II.2.Discussion.....	78
Conclusion générale.....	86
Références bibliographiques.....	87
Annexes.....	97



Introduction générale



De tout les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner (Messai ,2011); Dans le monde, elle ont toujours été utilisées comme médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes (Dibong *et al.*, 2011).

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. elle produisent déjà 70% de nos médicaments, aussi environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (Laamri & Mostefaoui, 2017).

En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. A titre indicatif, les polyphénols, forment un groupe très diversifié de molécules dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies (Bruneton, 2009).

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques, telle que l'activité antibactérienne et antioxydante est considérée comme très importante et très utile, en particulier pour les plantes, qui sont largement utilisées en médecine folklorique (Abdel Hakim , 2009)

Les propriétés antioxydantes des extraits végétaux sont massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher un apport supplémentaire de composés antioxydants. Les principes actifs des extraits provenant de diverses sources végétales continuent à avoir un très grand intérêt comme supplément en médecine complémentaire. La plupart de ces extraits contiennent des vitamines, des flavonoïdes et autres polyphénols.(Mohammedi ,2013)

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (Djahra ,2014). Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal se trouve la famille des Ephedraceae, représentés par un seul genre «Ephedra», cette famille possède des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle.

Dans le cadre de cette optique, La présente étude de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydants et antimicrobiennes de l'extrait aqueux d'une de ces sous espèces, *Ephedra alata alenda* , qui pousse dans la région d'El-oued, et est réputée par sa tolérance élevée à la carence en eau.

Pour la réalisation de cette étude, nous allons la partager en deux parties essentielles :

- La première partie est consacrée à l'étude bibliographique comporte recherche sur les métabolites secondaires et les activité biologique, aussi sur les plantes médicinales avec une description de la plante étudiée.
- La deuxième partie est expérimentale, subdivisée en deux chapitres : l'un Présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Première Partie



Etude Bibliographique

CHAPITRE I



Les Métabolites secondaires et Les Activités Biologiques

Chapitre I. Les métabolites secondaires et les activités biologiques

I.1. Les métabolites secondaires

I.1.1. Généralité

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, (Krief, 2003).

Ces métabolites secondaires interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) (Gobbi & Khebbaz ,2014). Et sont aussi se trouvent dans toutes les cellules végétales et nécessaire à leur croissance et à leur développement (Raven *et al.*, 2000). Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (Guignard, 1996).

I.1.2. Définition

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes, ils sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes (Youla & Latrous, 2017; Boudjouref, 2011).

I.1.3. Rôle biologique

Les métabolites secondaires sont interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux a des stress varies : action anti-herbivore, inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et lumière UV. Aussi ils interviennent pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits; Mais elles peuvent être antinutritifs. Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole (Boukri, 2014 ; Mansour,2015).

I.1.4. Distribution et localisation

Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante (Hartmann, 2007). Ce sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) (Laamari & Mostefaoui, 2017).

Les métabolites secondaires Biosynthétisés à partir de métabolites primaires (Peeking et al., 1987), résultent généralement de trois voies de biosynthèse: la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate (Aref & Heded, 2015)

I.1.5. Classification

Dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007); Les métabolites secondaires sont appartiennent à trois grandes familles:

- Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, banthocyanidines, tanins) et les quinones.
- Les terpénoïdes et leurs dérivés.
- Les alcaloïdes (Merghem, 2009).

I.1.5.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contres les agressions environnementales (Gee & Johnson, 2001). Ils caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc (Bruneton, 1999).

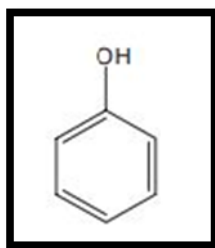


Figure 01: Structure de base des composés phénoliques (Vermerris & Nicholson, 2006)

Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit à l'Homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (Dacosta, 2003); En effet ils constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi *et al.*, 2003); ils sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Figure 02) (Dacosta, 2003).

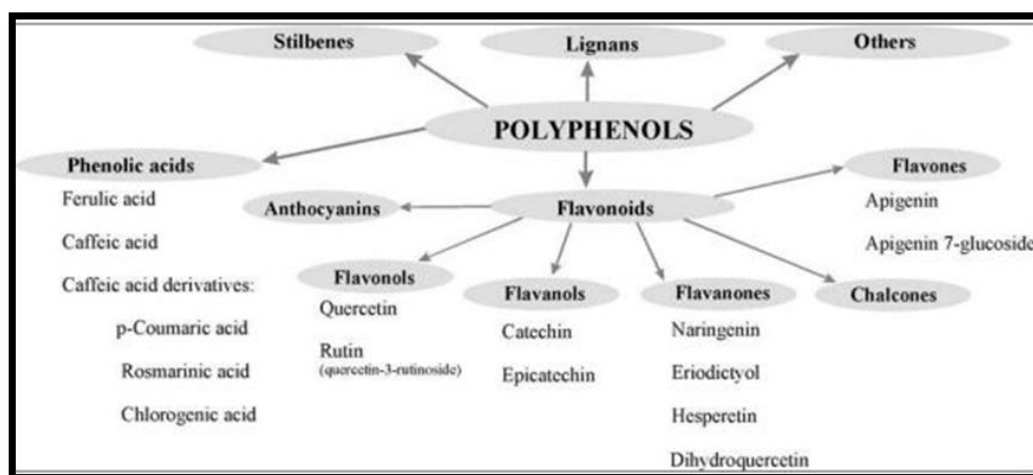


Figure 02: Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe. (Boros *et al.*, 2010)

A. Flavonoïde

A.1. Définition

Le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus (flavus, <<jaune>> en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Laamari & Mostefaoui, 2017) ; Ce sont des pigments souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits (El alaoui, 2015).. aussi Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Zeghad, 2008) ; Les flavonoïdes sont

présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeven *et al.*, 2002).

A.2. Structure et classification

Tous les flavonoïdes (plus de 4000) possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (Bruneton, 1999) à 15 atome de carbone (C6-C3-C6) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Harborne & Williams, 2000).

Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous) (Bruneton, 1999).

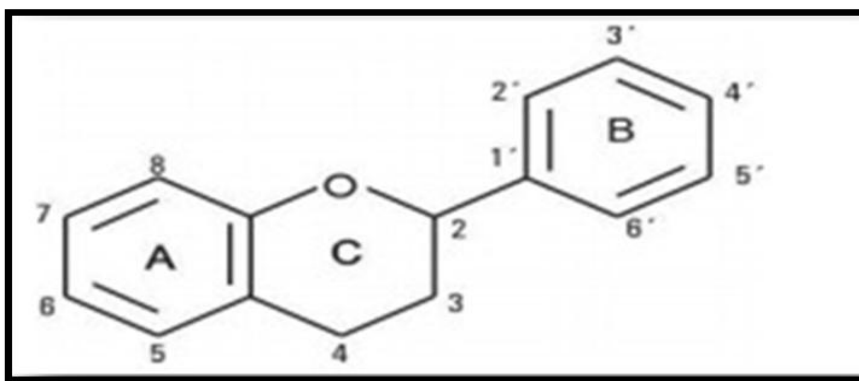


Figure 03: Squelette de base des flavonoïdes (Collin & Creast, 2011).

Les flavonoïdes existent soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), soit sous forme de C- ou O- glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7). Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (Effendi *et al.*, 2008).

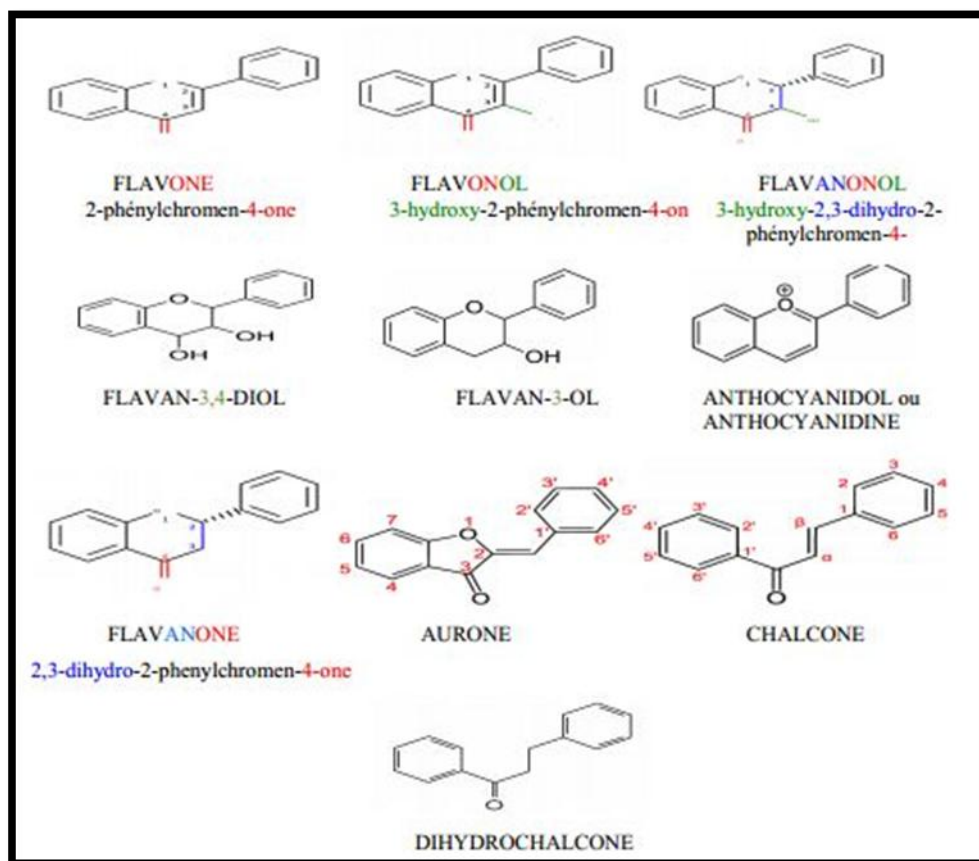


Figure 04: Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Scalbert & Williamson, 2000).

A.3. Rôles et intérêts

Les flavonoïdes sont largement connus par leurs activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, antiagrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, anti-hypertensives et antimicrobiennes (Ferradji, 2010), ils assurant la protection des tissus contre les rayonnements solaires nocifs. (Crozier *et al.*, 1997; Stobieck *et al.*, 2006). Les flavonoïdes aussi montrent à des propriétés dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Merghem, 2009); ils protègent la plante des différents agents pathogènes, aussi ils sont connus par leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses (Hidayat & Fatmawati, 2016 ; Ueli *et al.*, 1991).

B. Acides phénoliques

B.1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux qui jouent un rôle important dans la résistance aux maladies et la protection contre les parasites, (Servili &

Montedoro, 2002 ; Keerthi *et al.*, 2014), Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques (Laraoui, 2007).

B.2. Structure et classification

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (Manach *et al.*, 2004) . Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques (El Gharras, 2009).

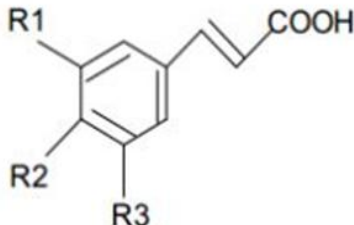
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 05 : Principaux acides hydroxycinnamiques (El Gharras, 2009).

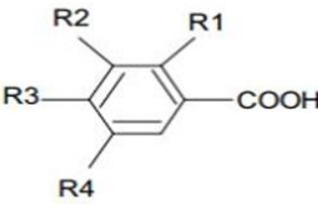
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure 06: Principaux acides hydroxybenzoïques (El Gharras, 2009).

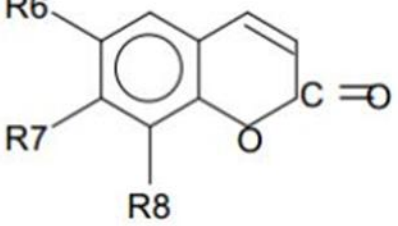
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnéto

Figure 07 : Principaux types de coumarines (El Gharas, 2009).

C. Tanins

C.1. Définition

Les tanins sont des substances polyphénoliques d'origine végétale, de structure variée, qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (Paris & Hurabielle., 1981, Bruneton, 1999) . Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux , mais ils sont plus abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les rosacée ; Et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé. (Ghestem *et al.* , 2001)

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Larwence *et al.*, 1984).

C.2. Structure et classification

Les tanins sont des composés phénoliques , non azotées, soluble dans l'eau, l' alcool, et l'acétone, peu soluble dans l'éther. ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (Brunet, 2008)

Les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (Hagerman & Butler, 1981).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, trois groupes de tanins

différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques : les tanins hydrolysables, les tanins complexes et les tanins condensés (Vermerris & Nicholson, 2006; Bruneton, 1999).

- **Tannins hydrolysables**

Les Tannins hydrolysables (Figure 08) ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique (Bellebcir, 2008).

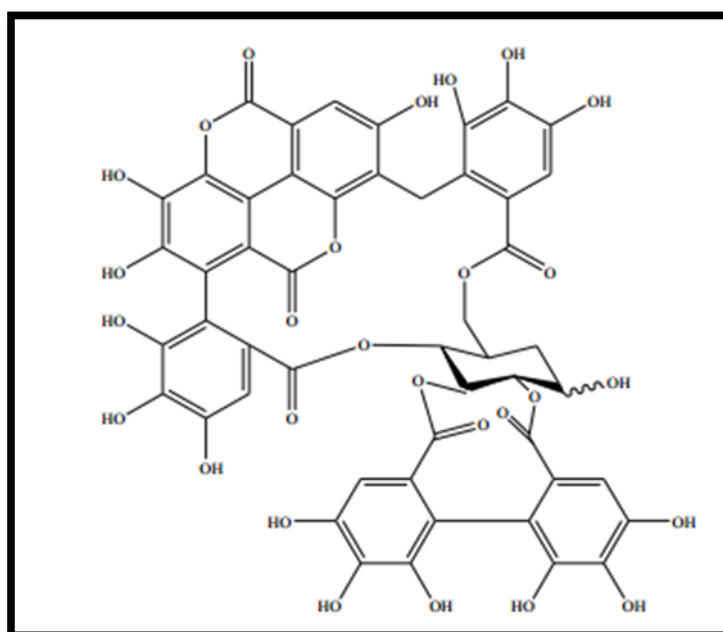


Figure 08: Exemple des tanins hydrolysables (Boubekri , 2014).

- **Tanins condensé (ou tanins non hydrolysable)**

Ce sont des tanins non hydrolysables (Dits catéchiques et proanthocyaniques) (Figure 09), ils sont plus complexes que les tanins galliques (Alilou, 2012) ; leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Paris & Hurabielle., 1981).

Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (Gori & Tebbale , 2014).

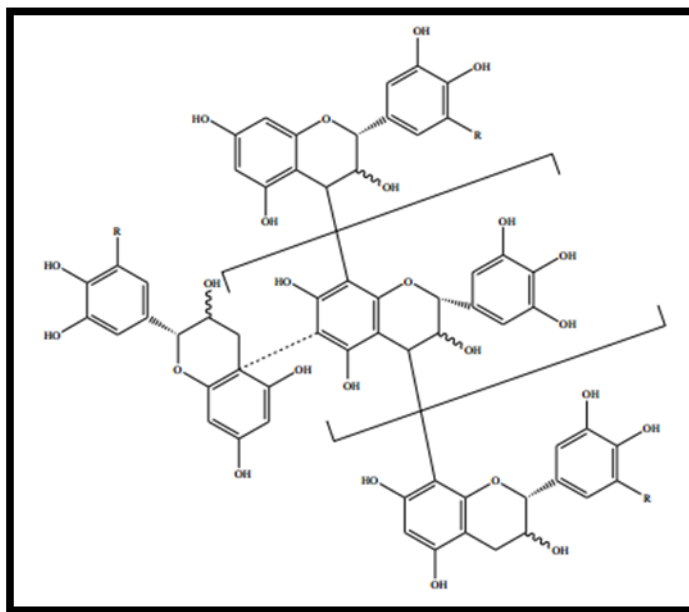


Figure 09: Exemple des tanins condensés (Boubekri, 2014).

- **Tanins complexes**

Tanins complexes sont définis comme des tanins dans lequel une unité de catéchine glycosidique est lié soit à un gallotannin ou d'une unité ellagitannin. Comme son nom l'indique, la structure de ces composés peut être très complexe. Un exemple est Acutissimin A . (Laamari & Mostefaoui , 2017)

C.3. Rôles et intérêts

Le rôle biologique des tanins est lié à sa propre protection contre les infections fongiques et bactériennes, les insectes et les animaux herbivores (Khanbabaee & Ree , 2001). En outre, les tanins ont un très grand pouvoir, antiviral, anti-inflammatoire et une activité antimutagène . Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (Laamari et Mostefaoui, 2017)

Les tanins peuvent exercer des effets nutritionnels bénéfiques chez les ruminants qui en consomment des taux modérés. Plusieurs études suggèrent que la présence des tanins condensés à un seuil inférieur à 6% est avantageuse et induit une amélioration des performances animales, croissance et rendement en viande et en lait (Barry *et al.*, 1986) ; aussi, La présence naturelle des tanins dans les différents pâturages protège les herbivores contre les ballonnements (Makkar, 2003).

I.1.5.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont généralement dérivés des aminoacides, contiennent de l'azote et forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. (Croteau *et al.*, 2000 ; Mohammadi, 2013). Ils se trouvent en solution dans le suc cellulaire; et abondent dans les tissus particulièrement actifs : régions de croissance, points végétatifs, zones de cicatrisation, bourgeons qui s'ouvrent, ovaires et ovules qui mûrissent (Lucienne, 1958)

Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Donatien, 2009). On les classe sous trois groupes:

- **Les alcaloïdes vrais:** l'azote inclus dans un hétérocycle, ce groupe représente la majorité des alcaloïdes.
- **Les proto-alcaloïdes:** ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique, ils ont une structure proche des amines.
- **Les pseudo-alcaloïdes:** ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Ghedjati, 2014).

On pense que les alcaloïdes font partie du système de défense chimique constitutif des plantes, jouent à faible doses; Le rôle de la défense chimique pour les alcaloïdes dans les plantes est soutenu par leur large gamme d'effets physiologiques sur les animaux et par les activités antibiotiques que possèdent de nombreux alcaloïdes. Divers alcaloïdes sont également toxiques pour les insectes ou fonctionnent comme des moyens de dissuasion alimentaires; aussi, le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'analgésiques (morphine), d'antiparasitaires, d'anti-tumoraux... (Croteau *et al.*, 2000 ; Azzi, 2016).

I.2. Les activités biologiques

I.2.1. Les activités antioxydants

I.2.1.1. Introduction

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices (BERRA, 2015). la production de ces radicaux au niveau cellulaire est étroitement contrôlée par un énorme système de défense dit système

antioxydant. 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 antioxydante et imposent un stress oxydatif pour le système physiologique (Kebili, 2016).

I.2.1.2. Stress oxydatif

Des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants (Boubekri, 2014). Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Abdoune, 2012).

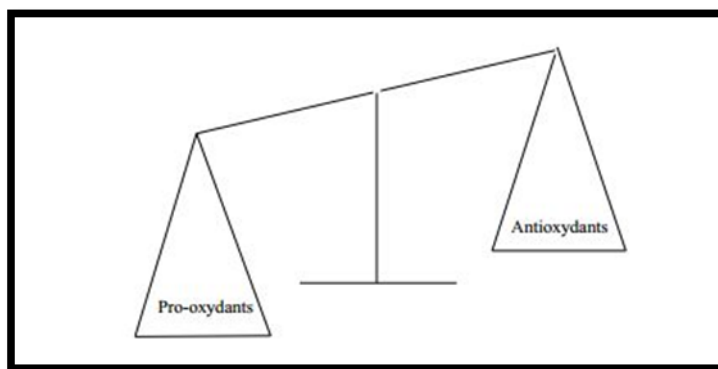


Figure 10: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (Boubekri, 2014).

Ce déséquilibre se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Djeffal, 2014).

I.2.1.3. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme étant toute espèce qui a un ou plusieurs électrons impaires, qui est difficile à être détecter, identifier et quantifier, aussi leur réactivité est responsable de leur toxicité (Favier, 1994 ; Packer & Glazer, 1990 ; Minisci, 1997). Ils sont capables de réagir avec différentes molécules, en particulier lors de réactions en chaîne (Christophe & Christophe, 2011), la plupart des radicaux libres sont produits par les mitochondries (Sylvia, 2010).

Les radicaux libres sont générés au cours du fonctionnement normal de l'organisme, mais leur production peut être augmentée par la pollution, la fumée des cigarettes ou une exposition prolongée au soleil (Abdoun, 2012).

L'appellation « espèces réactives d'oxygène (ERO) » inclut les radicaux libres de l'oxygène qui représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants: anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont des oxydants moins réactif que $OH^{\bullet}$, mais ils ont une durée de vie plus longue leur permettant de se déplacer à partir du site de génération et de réagir avec des molécules dans divers tissus (Valko *et al.*, 2007; Martínez-Cayuela, 1995).

I.2.1.4. Les antioxydants

A. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Et en pratique, plusieurs essais *in vitro* procédures sont menés pour évaluer les activités antioxydants avec les échantillons d'intérêt. (Badarinath *et al.* 2010).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC(Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2- azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6- sulphonate) et DPPH⁺ (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva *et al.*, 2010).

Tableau 01: Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant (Kebbab ,2014).

Méthode	Réaction
Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). évalue le pouvoir réducteur des composés La lecture se fait à 700 nm.
Méthode DPPH	Réduction du radical libre stable de 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH.). La lecture se fait à 517 nm.
Méthode ABTS	le sel de ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2- azino bis-(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) perd un électron pour former un radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm.
Méthode PPM (PhosPhoMolybdate)	L'hydrogène et l'électron sont transférés vers le complexe oxydant (PPM).

In vivo, l'évaluation de l'activité antioxydants se fait par plusieurs méthodes comme le dosage des paramètres de stress oxydatif (Catalase, GSH, GST et MDA) aussi par le dosage sanguin .

B.Classification des antioxydants

Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes :

- Les antioxydants synthétiques.
- Les antioxydants synergiques.
- Les antioxydants d'origine végétale. (Bouhadjra ,2011)

B.1. Antioxydants de synthèse

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins

chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu *et al.*, 2003).

Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extrahépatiques (Barlow, 1990). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (Ito *et al.*, 1985).

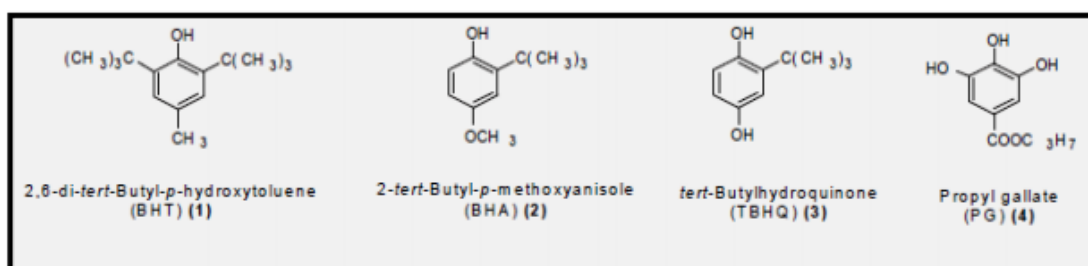


Figure 11 : Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques (Ito *et al.*, 1985)

B.2. Les antioxydants synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : Les acides lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants.

B.3. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturellement sont présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturel comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux (Figure 12.) (Pelli & Lyly, 2003).

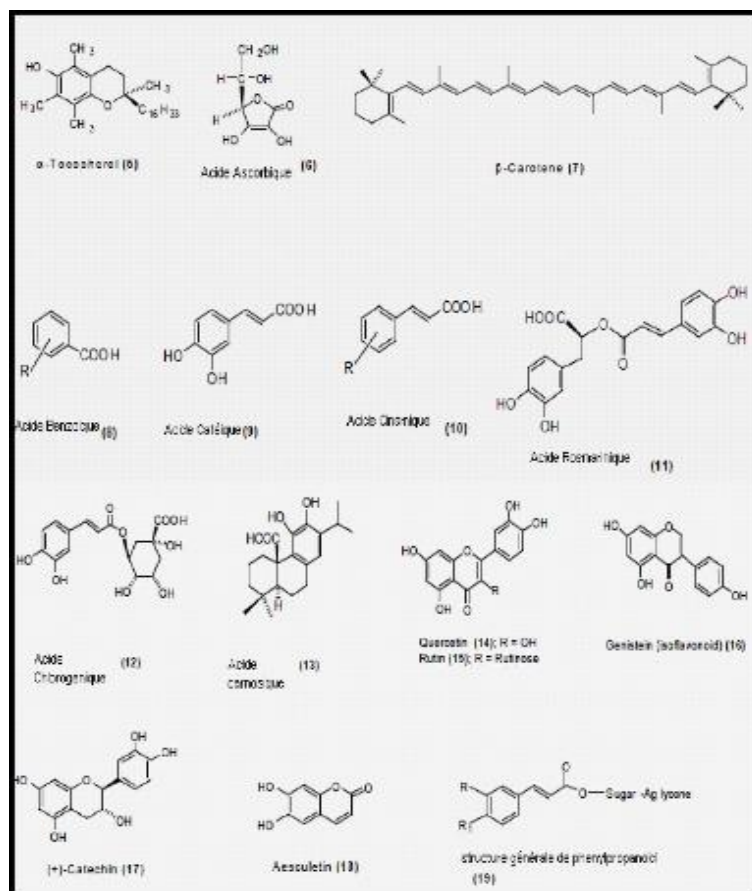


Figure 12: Structures chimiques des antioxydants naturels (El kalamouni, 2010).

C. Mécanismes d'action des antioxydantes

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent

l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Yaacoub, 2009 ; Hellal , 2011).

Tableau 02 : Mécanisme d'action de quelque antioxydante (Atti ,2014)

	NATURE	MODE D'ACTION
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	Neutralise les radicaux libres
	Vitamine C	Participe aux réactions d'oxydoréduction
	Bêta carotène	
	Bêta carotène	
	Bêta carotène	Fixation des métaux de transition
	Ubiquinone, acide urique...	
Défenses enzymatiques	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ERO (Yakhlef ,2010).

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, et stable dans le produit fin (Hellal, 2011).

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Parmi ces antioxydants on peut citer : les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les huiles essentielles, les phénols et les xanthones (Abdoune., 2012)

D. Implications pathologiques du stress oxydant

De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, neurodégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007).

E. Stress oxydant et cancer

La carcinogénécité du stress oxydant est principalement attribuée à la génotoxicité de ROS dans les différents processus cellulaires (Lee, 2006). Les cellules cancéreuses sont connues par leur métabolisme actif et sous une élévation d'un stress oxydatif, vraisemblablement associé avec une prolifération cellulaire incontrôlée et dysfonction de la régulation métabolique (Khelfallah, 2013).

- **ROS et cancer**

Comparées aux cellules normales, les cellules cancéreuses sont en état de stress oxydatif. Leur métabolisme est en effet altéré et fort élevé, peut-être pour combler les dépenses énergétiques que demande une intense prolifération, ce qui entraîne une génération accrue de ROS (Pelicano & ai, 2004). Pour combattre ce surplus de ROS, les cellules cancéreuses activent leurs défenses antioxydantes, rétablissant leur homéostasie.

Plusieurs voies de signalisation contrôlent ces défenses antioxydantes, offrant de nouvelles cibles pour une chimiothérapie. En court-circuitant ces voies de contrôle avec un agent adéquat, les cellules cancéreuses deviendraient incapables de se protéger. L'augmentation du stress oxydatif qu'elles subiraient aboutirait à leur mort (Pennington *et al*, 2005).

I.2.2. Activité antibactérienne

I.2.2.1. Définition

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux (Yakhlef ,2010); Les pouvoirs antimicrobiens des plantes aromatiques et médicinales sont connus depuis l'antiquité. Toute fois il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. (Abdoune, 2012)

L'activité antibiotique correspondant à activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un végétal qui à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien .Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différent selon la souche d'appartenance (Laamari & Mostefaoui, 2017).

I.2.2.2. Antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle, semi-synthétique ou synthétique, capable à faible dose de tuer ou d'inhiber spécifiquement la croissance du germe par un mécanisme particulier jouant sur ses mécanismes vitaux (Okusa, 2012).

Selon la structure chimique, les antibiotiques peuvent exercer leurs effets selon différents modes:

- Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi: β -lactamines, glycopeptides,
- Antibiotiques altérant la membrane plasmique: polymyxines, daptomycine,
- Antibiotiques inhibant la synthèse protéique (généralement par fixation sur les ribosomes): tetracyclines, chloramphenicol,
- Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques: rifampicine, etc (Kebili Z., 2016).

I.2.2.3. Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques (Kebili, 2016). Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts (Yakhlaf, 2010).

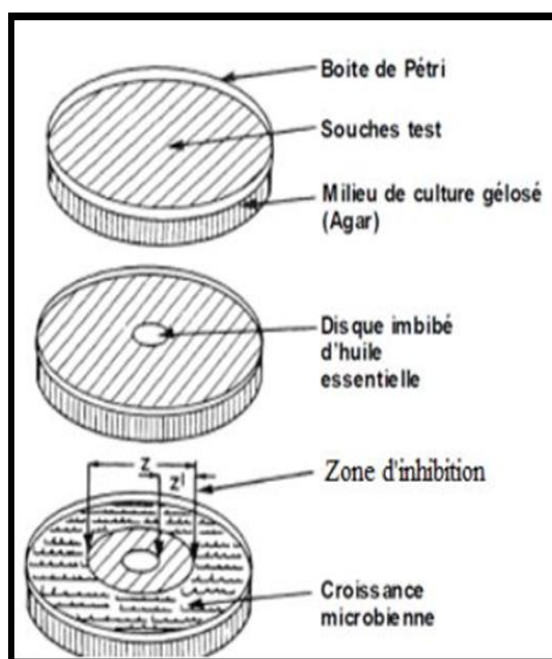


Figure 13: Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

CHAPITRE II



*Les plantes médicinales
et Ephedra alata alenda*

Chapitre II. Les plantes médicinales et *Ephedra alata alenda*

II.1.Définition des plantes médicinales

Une plante médicinale est une drogue végétale qui peut être utilisées entière ou sous forme d'une partie de plante pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (racines, écorce sommités, fleurées, feuilles, fleurs, fruits, graines) peut être employée dans le but de se soigner (Boudraa & Rouadeh, 2003 ; Jörg & Christof, 2007 ; Schaunberg & Paris, 2013).

Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents (Schaunberg & Paris, 2013)

II.2. Définition des principes actifs

Les effets bénéfiques des plantes sur la santé sont dus au fait qu'elles contiennent des substances appelées principes actifs, responsables de leurs effets thérapeutiques (JÖRG & Christof, 2007).

Les plantes produisent un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures, ces composés sont appelés métabolites secondaires (Ramawat & Merillon, 2008).

Les métabolites secondaires sont des substances indirectement essentiels à la vie de la plante, ils participent à l'adaptation de la plante avec son l'environnement, à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température,...) et à la défense contre les pathogènes (moisissures et bactéries phytopathogènes,...) (Sarni & Cheynier, 2006).

On distingue trois principales classes des métabolites secondaires : les Composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes et stéroïdes (Ramawat et Merillon, 2008).

II.3. Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde, notamment celle des pays en voie de développement où plus de 80 % de la population ont recourt presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé primaire, du fait de son incapacité à accéder, voire bénéficier des vertus de la médecine moderne (Rates, 2001 ; Khadhri, 2013).

Parmi ces plantes on trouve *Ephedra alata*

II.4. Généralités sur la plante

II.4.1. Genre *Ephedra*

L'origine de l'*Ephedra* a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (environ 200 millions d'années passant dans le Trias moyen) (Huang & Price, 2003).

La famille des *Ephedraceae* représentée par le seul genre *Ephedra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009) est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se termine par une pointe souvent acérée. Au niveau des noeuds, qui sont écarté de 4 à 6 cm, les feuilles réduites en écailles apparaissent triangulaires qui se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuille. De petites fleurs apparaissent en été (Limberger *et al.*, 2013; Ozenda, 1991; Abourashed *et al.*, 2003).

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; Qingbiao, 2006) et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Hegazi & El-Lamey, 2011). La figure 14 montre la répartition du genre *Ephedra* dans le monde.

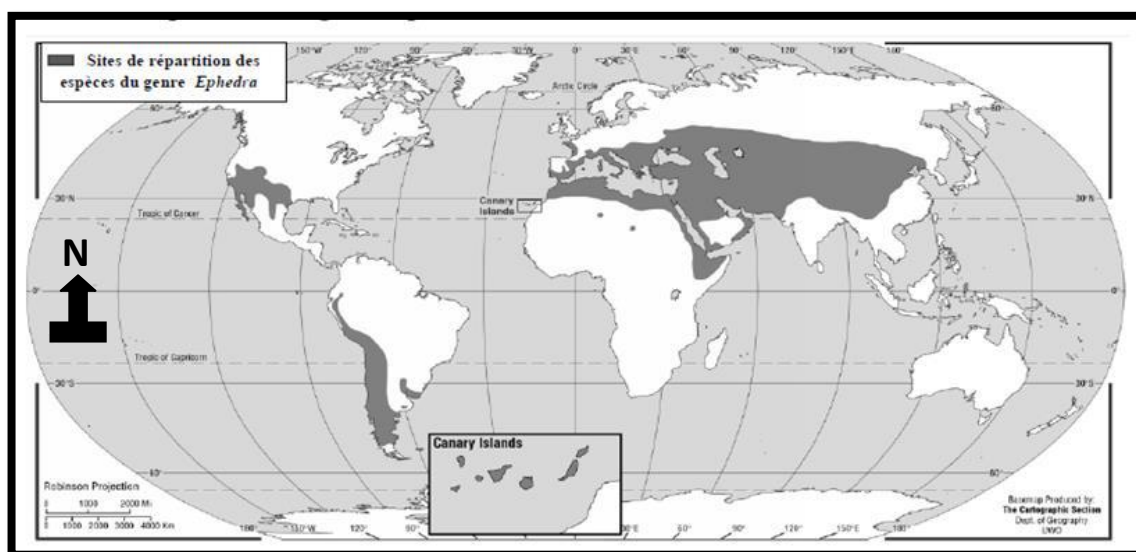


Figure14: Répartition géographique de l'*Ephedra* dans le monde (Caveney *et al.*, 2001).

II.4.2. Sous espèce *Ephedra alata alenda*

II.4.2.1. La classification scientifique d'*Ephedra alata*

Tableau 03: La classification scientifique d'*Ephedra alata* (Ozenda, 1991).

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

II.4.2.2. 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, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des noeuds de petites feuilles opposées, alternant d'un noeud 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).



Figure 15: *Ephedra alata alenda* (photo originale)

II.4.2.3. Répartition géographique

L'espèce *Ephedra 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).

II.4.2.4. Utilisation

Les espèces du genre *Ephedra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *E. sinica* est l'espèce principale qui a été utilisée en Chine depuis plus de 5000 ans. *E. 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).

Ma-huang est le terme spécifique donné, par les chinoises, à la partie aérienne des espèces : *E. sinica*, *E. equisetina*, *E. intermedia*, *E. distachya*, *E. gerardiana*, *E. minuta* ainsi qu'autres espèces contenant de l'éphédrine (Abourashed *et al.*, 2003).

Ma-huang a été traditionnellement utilisé en Chine pour lutter contre l'asthme bronchiale, rhume, grippe, fièvre, frissons, rhinite, congestion nasale, oedème, maux de tête, arthralgies et comme diaphorétique, antiallergique et antitussif (Abourashed *et al.*, 2003; Soni *et al.*, 2004; Konno *et al.*, 1979; Ma *et al.*, 2007).

Les espèces *Ephedra* d'Asie ont été récemment utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (Caveney *et al.*, 2001).

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). Au Maroc, l'*Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (Ghourri *et al.*, 2013). 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.

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).

En dépit de sa longue histoire et sa promesse agronomique, l'utilisation de l'herbe a diminué au fil des ans, mais au début du vingtième siècle, l'importance de l'herbe a graduellement revécu comme il est démontré par son large utilisation aux Etats Unis dont beaucoup de produits contenant de l'Ephedra vendus sous des noms tels que "Herbal Ecstasy and Escalation" sont supposés être efficaces pour la perte de poids et l'amélioration des performances physiques (Abourashed *et al.*, 2003; Caveney *et al.*, 2001).

II.4.2.5. Pharmacologie

Les effets pharmacologiques et toxicologique de cet arbuste semble être attribuable à ses alcaloïdes de types éphédrine, principalement (-)-éphédrine et (+)- pseudoéphédrine. L'Ephédrine, malgré l'absence de groupement phénolique caractéristique des catécholamines, est un sympathomimétique, agoniste à la fois des récepteurs adrénergiques α et β . Elle présente aussi un effet indirecte sur le système sympathique via l'augmentation de la libération de noradrénaline à partir des vésicules de stockage dans les neurones sympathiques vers la zone synaptique où il se fixe sur les récepteur post-synaptiques α et β (Limberger *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2007)

L'effet principal de la stimulation des récepteurs adrénergiques α et β inclue l'augmentation de la fréquence cardiaque et la contractilité. Elle favorise également la vasoconstriction périphérique due à la fraction pseudoéphédrine, la bronchodilatation, ce qui explique son utilisation traditionnelle comme décongestionnant nasal et antiasthmatique, ainsi

que la stimulation du SNC (Abourashed *et al.*, 2003) (Phinney *et al.*, 2005). Cependant, les effets hypertenseurs et vasoconstricteurs liés à l'éphédrine, sont moins rapides et moins puissants, mais plus durables et plus stables dans les conditions du métabolisme contrairement à l'adrénaline (Chopra *et al.*, 1960). C'est pour cela que l'administration de l'éphédrine, qui semble le majeur principe actif de la plupart des espèces *Ephedra*, est contre indiqué chez les patients atteint d'hypertension ou toute autre MCV, de glaucome, ou de l'hyperthyroïdie (Soni *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010).

II.4.2.6. Toxicologie

Les espèces de l'*Ephedra* ont des effets bénéfiques et néfastes (Ma *et al.*, 2007). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une bronchodilatation, une agitation et une mydriase. L'utilisation de l'*Ephedra* est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques (Peters *et al.*, 2005). Ces effets peuvent être les raisons pour lesquelles l'utilisation de l'*Ephedra* est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiqué pour une utilisation à long terme (Chen *et al.*, 2010).

Deuxième Partie



Partie Pratique

CHAPITRE I



Matériels et Méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériels

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'ELOUED et laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS). les analyses sanguines ont été effectuées au niveau du laboratoire d'analyses médicales EL-MEDJED et Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du centre d'analyse pathologique BEN BORDI, service l'anapath, EL OUED.

I.1.1. Matériels biologiques

I.1.1.1. Matériel Végétal

Les parties aérienne d'*Ephedra alata* sont récoltées le 07 Octobre 2017, est une espèce médicinale appartenant à la famille des *Ephedraceae*.

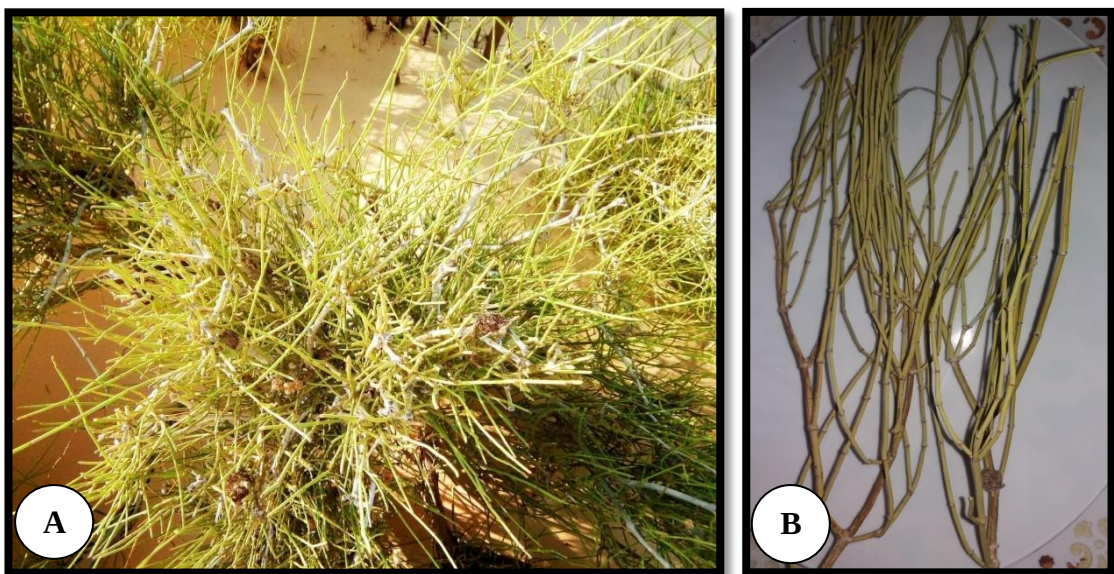


Figure 16: L'espèce d'*Ephedra alata alenda* (photo originale)

A: plante fraîche ; **B:** plante sèche.

A. Présentation de la zone d'étude (La wilaya d'EL OUED)

La wilaya d'El Oued est située au Sud-Est de l'Algérie, elle a une superficie de 44 586.80 Km². La longueur de sa frontière avec la Tunisie est de 300 Km environ. Elle est couverte par le grand Erg : Oriental sur les 2/3 de son territoire. La wilaya d'El Oued est délimitée:

- Au nord, par les wilayas de Tébessa et Khenchela
- Au nord et au nord-ouest par la wilaya de Biskra
- Au sud et au sud-est par la wilaya d'Ouargla
- À l'est par la Tunisie.



Figure 17: Carte d'Algérie représente la Wilaya d'El-Oued (Système de Gestion Intégré de l'Information Agricole et Rurale of Algeria [SGIAR] ,2009)

B. Site de prélèvement

Les échantillons de la plante ont été prélevés à partir d'un site de la région d'El-Oued "Nakhla" situé au Nord 33° 16' 38" et 6° 57' 5" Est (Figure 18).



Figure 18: Localisation géographique de la zone d'étude (www.google earth 2018.com)

C. Technique de séchage

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Pour s'assurer de la bonne conservation des échantillons, un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours a été réalisé. Elles sont, ensuite, broyées par un broyeur électrique.

Après le broyage, la plante a été conservée dans des sacs en papier opaque afin de garder leur couleur, goût et principalement leur effet thérapeutique, elle a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu'à leur analyse.

I.1.2.2. Les microorganismes utilisés : (Souches microbiennes)

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée en utilisant des souches référenciées :

▪ Les bactéries Gram négatif

- ***Escherichia coli*** (ATCC 25922): Bacille, appartient à la famille des Enterobacteriaceae (Paterson, 2006). De forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (Steven *et al.*, 2004). *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel *et al.*, 2005).

- ***Pseudomonas aeruginosa*** (ATCC 27853) : Bacille, opportuniste, fréquemment incriminée dans les infections nosocomiales grâce à sa capacité de persister dans les milieux hospitaliers,

sa résistance naturelle et son pouvoir d'acquisition de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques (Chinbo *et al.*, 2014). Elle est l'agent le plus pathogène courant provoquant une infection chronique (Pressler, 2011). *P. aeruginosa* est impliquée dans les infections des plaies et de l'appareil respiratoire, infections des voies urinaires et les septicémies (Perry *et al.*, 2004).

- ***Klebsilla pneumoniae*** (ATCC 700603) : Genre de bactérie, non mobiles de famille Enterobacteriaceae, capsulés avec des colonies à aspect de muqueuses. (Garbannelle *et al.*, 1987). Il est un type de bactérie qui est souvent répandu dans les unités de soins intensifs ou les maisons de soins infirmiers. Il se trouve généralement dans le tractus intestinal, où il fait partie de l'écosystème d'un côlon sain. Cette bactérie peut se propager à d'autres parties du corps, cependant provoquer des maladies mortelles (Anadriamobololona, 2010)

- ***Salmonella Enteric*** (Arizonae CIP 81-3); des entérobactéries, des bacilles, non sporulants (Jawetz *et al.*, 1973), espèce majoritaire, qui se divise en six sous-espèces (Popoff *et al.*, 2004; Tindall *et al.*, 2005)

▪ Les bactéries Gram positif

- ***Staphylococcus aureus*** (ATCC 25923) : Cocci, de la famille des Micrococcaceae, immobile et disposées en grappe de raisins, présente sur le corps et les muqueuses, et souvent responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales. (Perry *et al.*, 2004; Lowy, 1998).

I.1.2.3. Matériel animal

Afin d'éviter la variabilité intersexe, nous n'avons utilisé pour l'activité anti-oxydante que des ratte femelles de type *Wistar albino* de l'Institut Pasteur d'Alger (I.P.A.). Pesant entre 150g et 180g au début de l'expérimentation.

Les ratte ont été séparées dans des cages aléatoirement. Ils sont divisés en cinq lots et hébergées au niveau de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université Elchahid Hamma Lakhdar (cinq rates par cage :n=5). Les cages sont munies d'une porte étiquette où sont mentionnés le nom du lot, l'intervalle des poids, avec la date de début de traitement.

Les ratte sont soumises pendant 20 jours à une période d'adaptation où elles ont un accès libre à l'eau et à l'aliment sous des conditions de lumière et de température contrôlées (12 heures d'éclairage / Température de 24 °C).

I.1.2.4. Enquête ethnobotanique

En vue de rendre compte de la valeur d'*E.alata alenda*, représentée dans la région d'EL- Oued une enquête ethnobotanique est lancée auprès de la population. Au cours de cette enquête 78 personnes de 20 à 90 ans (34 hommes et 44 femmes) de différentes régions, EL-oued, Nakhla, Oued alenda, Debila et Robbah ont été questionnées. (La fiche d'enquête est présentée en Annexe 09).

I.1.2. Matériel d'étude au laboratoire

Les réactifs et les matériels utilisés dans les différents tests et dosages sont présentés dans l'annexe 01.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation des extraits

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules poly phénoliques contenues dans la partie aérienne de la plante (Madi, 2009).

I.2.1.1. Extraction par macération à l'eau

La plante étudiée (10g) est mise à macérer à l'obscurité et à température ambiante dans l'eau distillée 100 ml pendant 24 heures. Après la macération, l'extrait aqueux est récupéré par filtration sur papier Wattman. Ensuite l'extrait a été évaporé à 56°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R- 200) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. puis séché à l'Etuve à une température ne dépasse pas 56 C°. Enfin ce résidu sec a été conservé à une température de +4°C (Matkowski & Piotrowcka, 2006).

I.2.1.2. Détermination du rendement

Le rendement de la plante en extrait sec a été quantifié selon la formule :

$$R \% = \text{PEB} / \text{PMV} \times 100$$

R : Rendement.

PEB : Poids de l'Extrait Brut (g).

PMV: Poids de Matière Végétale(g).

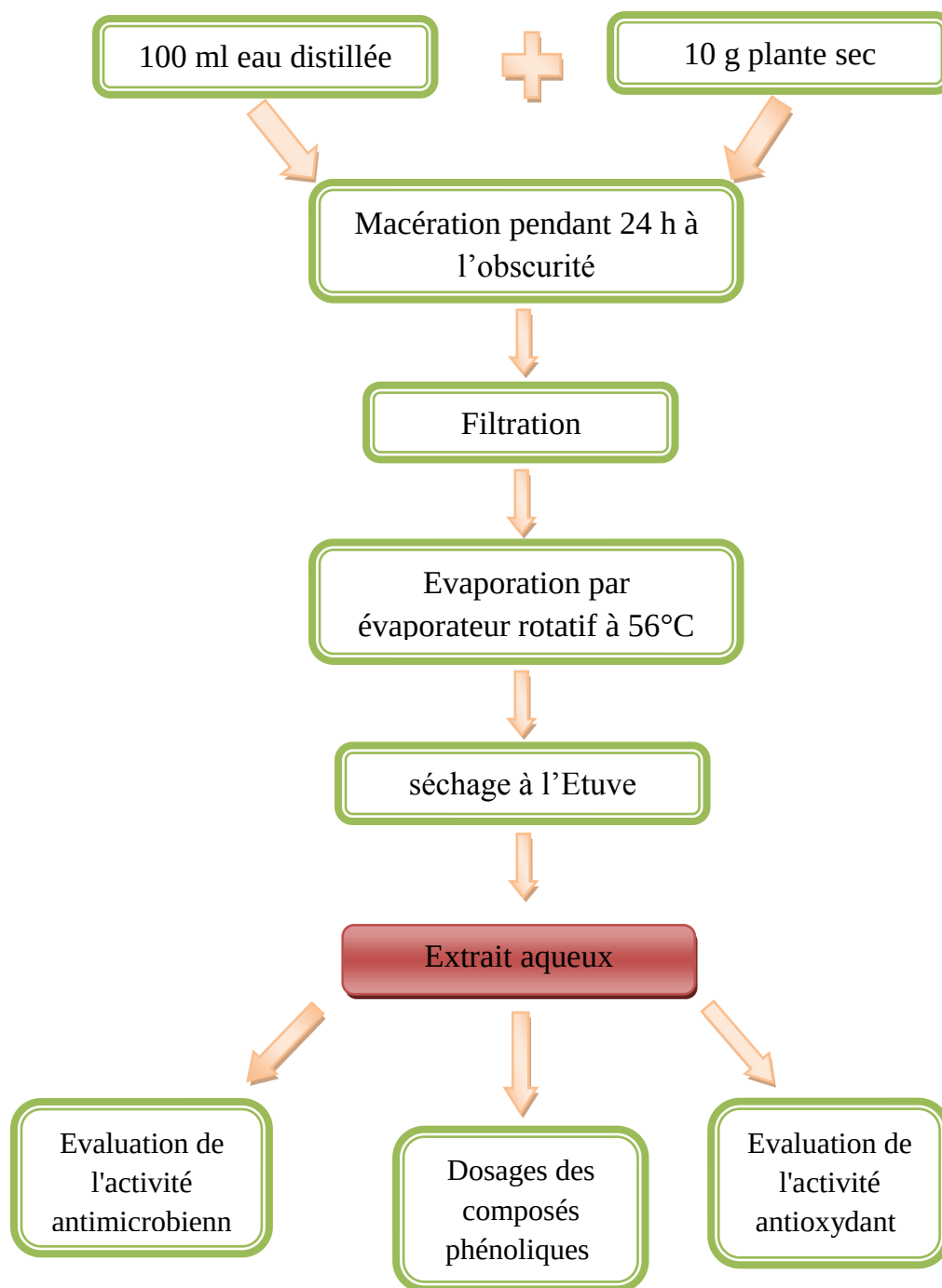


Figure 19: Protocole de préparation de l'extrait aqueux

I.2.2. Etude *in vitro*

I.2.2.1. Les tests phytochimiques

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation (Haoulia, 2015). La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur les extraits (Mohammedi, 2013).

A. polyphénols

2mL de chaque extrait est ajouté une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique (FeCl_3) à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée (Bidie *et al.*, 2011).

B. Flavonoïdes

Traité 0.5ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en après 3minutes (Bouhadjera *et al.*, 2005).

C. Les tannins

Les tanins sont mis en évidence à partir de 0.5 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl_3 (1% préparé au méthanol). Après l'agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Karumi *et al.*, 2004; Rizk, 1982).

D. Les Alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et quelques gouttes de réactif de Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes (Kanoun, 2011).

E. Les saponosides (Test de mousse)

Nous avons introduit 10 mL de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes (s) puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides. (Bidie *et al.*, 2011)

F. Sucres réducteurs

Dans un tube à essai, ajoutez liquide Fehling (1ml d'un réactif A plus 1ml d'un réactif B), l'extrait à analyser et incubez l'ensemble dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs (Traese & Evans, 1987).

G. Terpénoïdes

Dans un tube à essai, ajoutez à 5ml d'extrait de plante, 2ml de chloroforme (CHCl_3) et 3ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré. La formation d'une couleur brune rougeâtre indique la présence des Terpénoïdes (Dharmendra *et al.*, 2012).

I. Stéroïdes

Pour 1ml d'extrait végétal ajoutez 0,5ml de solution d'acide acétique, suivi par 0,5ml de H_2SO_4 concentré. Si la solution ne donne aucune couleur verte cela prouve la présence de stéroïdes non saturés. Dans un 2ème tube, le même volume de H_2SO_4 est ajouté. La présence de la couleur rouge indique la présence des dérivés des stéroïdes (Harborne *et al.*, 1973).

I.2.2.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi en utilisant le réactif de Folin-Siocalteu, tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de Lamaïosn et Carnat (Belguidoum, 2012).

A. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

❖ Principe

Le dosage des polyphénols est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange des complexes de sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleu. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Ainsi, le dosage des PPT se

fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique (Waterhouse, 1999).

❖ Mode opératoire

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0.2 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.02 jusqu'à 0.16 mg/mL, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée est ajouté immédiatement. Après 5min, on ajoute 0.8ml d'une solution de Na_2CO_3 (7.5%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 765nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Yogita *et al* , 2013).

B. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

❖ Principe

Le réactif utilisé est : le chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par ce réactif, elle entraîne la formation d'un complexe jaune absorbe à 430 nm. (Abdurrahman *et al* ,2013 ; Yakhlef ,2010).

❖ Mode opératoire

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, 1 ml de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%) préparé dans l'éthanol (Abdurrahman *et al* ,2013).

I.2.2.3. Etude de l'activité antioxydant

A. Par méthode spectrométrique

✓ Test du piégeage du radical libre DPPH

❖ Principe du test

D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant des groupes -SH, -NH et -OH. Le 2,2-diphenyl-1 -picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce radical ne forment

pas des dimères, il reste donc sous sa forme monomère qui est relativement stable (Popovici *et al.*, 2009).

La réduction du DPPH• par un agent antioxydant en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette foncée qui va se transformer en jaune pâle (Molyneux, 2004) (figure 20). Cette réaction qui s'effectue à température ambiante pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Popovici *et al.*, 2009) peut être suivie spectrophotométriquement en mesurant la diminution de son absorbance entre 515-518 nm. (Molyneux, 2004).

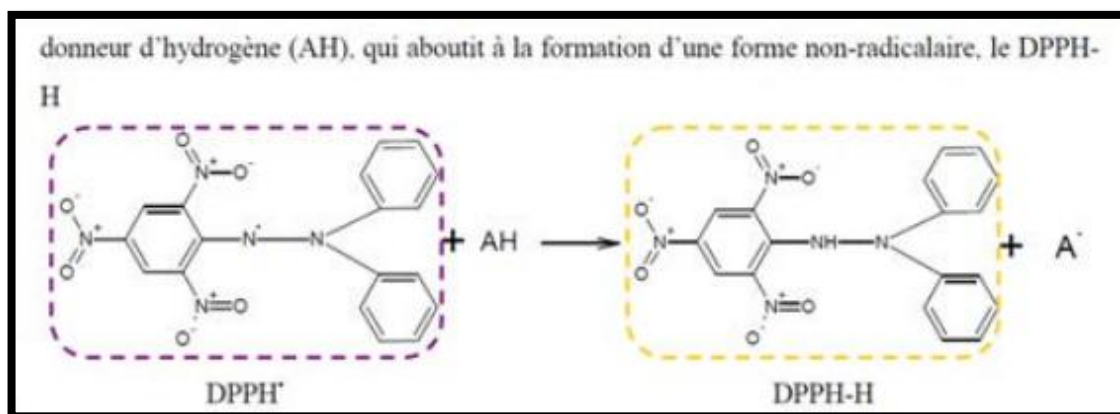


Figure 20: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Molyneux, 2004).

❖ **Protocole de l'activité anti-radicalaire par le test DPPH (mesuré au spectrophotomètre) :**

La méthode décrite par Brand-williams (1995) ; différentes concentrations comprises entre 0.02-0.1 mg/ml d'échantillon étudié et de témoin (acide ascorbique avec différentes concentrations entre 0.002-0.01 mg/ml). Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol. 0.5ml de solution échantillons et témoin sont ajoutées à 1 ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min en obscurité à la température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

Les résultats exprimés en IC₅₀ qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici *et al.*, 2009) .

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante:

$$\% \text{ d'activité antioxydant} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

B. Par méthode électrochimique

❖ Principe de la voltampérométrie cyclique

La Voltammétrie cyclique est la technique la plus utilisée pour acquérir des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques (Wang, 2006) .

Le principe général de la voltampérométrie est donc l'obtention d'une réponse (le courant) du système soumis à une perturbation (le potentiel) responsable de la réaction électrochimique désirée. Cette opération est réalisée en effectuant une exploration par imposition et variation progressive du potentiel d'électrode (balayage de potentiel) (Gajewski M. *et al*, 2009)

Les courbes obtenues (qui sont caractéristiques de la solution électrolytique) peuvent être utilisées pour déterminer la nature et la concentration des espèces oxydables ou réductibles présentés (Wang, 2006).

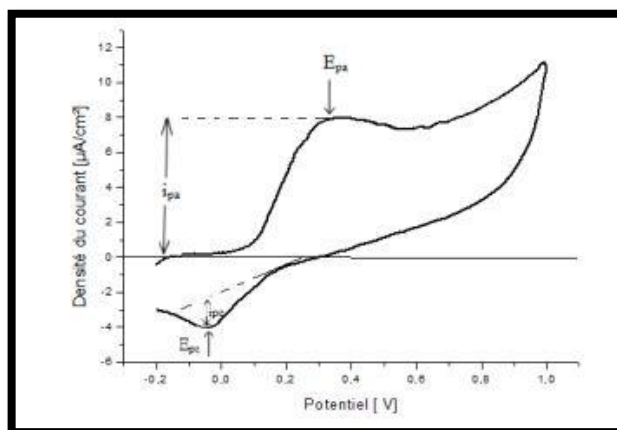


Figure 21: Voltammogramme cyclique typique pour un simple processus réversible d'oxydo-réduction (Djouadi, 2012).

D'où Epa et Epc sont les potentiels d'oxydations et de réductions.

Les mesures électrochimiques sont réalisées dans une cellule en verre contenant trois électrodes : l'électrode de travail, contre-électrode en platine et l'électrode de référence saturée avec KCl.

✓ **Etude de l'activité antioxydante totale**

❖ **Etude électrochimique du comportement de l'acide gallique**

L'étude électrochimique du comportement du standard utilisé qui est l'acide gallique est effectuée dans l'intervalle de concentration allant de 0.1mM à 1.1 mM, Le potentiel E : -0.4 jusqu'à 1.6 mV et la vitesse de balayage est constante : 100 mV/s.

❖ **Obtention des voltammogrammes cycliques d'échantillons**

De la même façon et sous les mêmes conditions précédentes appliquées sur l'acide gallique, on traite l'extrait aqueux d'*Ephedra alata alenda*, on obtient la voltampérogramme cyclique en ajoutant une quantité bien déterminée de l'extrait dans la cellule électrochimique (Boubekri, 2014).

❖ **La teneur de l'équivalent de l'acide gallique :**

Selon Boubekri (2014), après l'obtention des voltammogrammes on peut lire le courant de pic anodique correspondant. Ce dernier est alors porté dans l'équation linéaire pour calculer la concentration équivalente de l'acide gallique. La teneur en acide gallique a été exprimée en grammes par litres. Alors, la teneur de l'équivalent de l'acide gallique est calculée comme suit:

Pour calculer la concentration de tout l'extrait, on divise donc la masse de l'extrait obtenue après extraction par le volume du solvant dans lequel on a dissout cet extrait ($C_1(\text{g/mL})$) comme le montre la relation suivante :

▪ **La concentration massique d'échantillon en g/ml :**

$$C_g = \frac{m_{\text{extrait}}(\text{g})}{V(\text{mL})}$$

- La concentration massique d'échantillon dans la cellule en g/mL :

$$C_g' = \frac{C_g \times V_{utilisée}}{V_{Totale}}$$

$V_{ajoutée}$: le volume ajoutée de chaque extrait en mL

V_{Totale} : le volume totale dans la cellule en mL

- L'équation obtenue d'après la courbe linéaire de l'acide gallique est :

$$y = b + ax$$

Où :

Y : représente la valeur de la densité anodique du courant.

X : représente la valeur de la concentration du standard en g.L⁻¹.

En remplaçant à chaque fois la valeur de la densité du courant dans l'équation précédente, on trouve la valeur de la concentration équivalente de l'acide gallique en g/L.

- L'activité antioxydante totale des extraits est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$AAT \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{C_g \left(\frac{g}{L} \right)}{C_g' \left(\frac{g}{mL} \right)} \dots\dots (*)$$

- ✓ **Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage de anion superoxyde O²⁻**

❖ Principe

Selon Henni (2017) et Soulef (2017); Les mesures voltampérométriques sont effectuées dans une cellule électrochimique de volume V=25 ml et un système à trois électrodes. L'anion radical superoxyde est généré par l'oxygène moléculaire commercial dissout dans le DMF qui contient 0.12M de Bu₄NBF₄ à la température de la salle (28±1°C). La vitesse de balayage est maintenue à 100mV/s. La gamme de potentiel appliquée été de - 1.6V à 0.0V par rapport à ECS.

L'extrait aqueux étudiés est ajouté au radical superoxyde dissout dans le DMF et les voltammogrammes ont été enregistrés. La capacité de produit testé pour piéger les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Capacité inhibitrice du superoxyde (\%)} = \frac{I_{p_0} - I_{p_s}}{I_{p_0}} \times 100 \dots\dots\dots(*)'$$

Où: I_{p_0} et I_{p_s} sont l'intensité du courant de pic anodique de l'oxygène respectivement sans et avec composé à tester.

❖ Voltammogrammes cycliques de l'oxygène :

25ml de DMF sont mis dans la cellule électrochimique avec 0.16mg de Na_4BuF_4 , les trois électrodes ; de travail, auxiliaire et de référence nettoyés sont mis en place et la cellule a été bien fermée. Ensuite le mélange est barboté par l'oxygène commercial pendant 15 minutes pour but de générer le radical superoxyde dans la cellule. On fixe les conditions électrochimiques opératoires, et on met l'appareil en marche. Les voltammogrammes de l'oxygène sont ensuite enregistrés(Soulef, 2017).

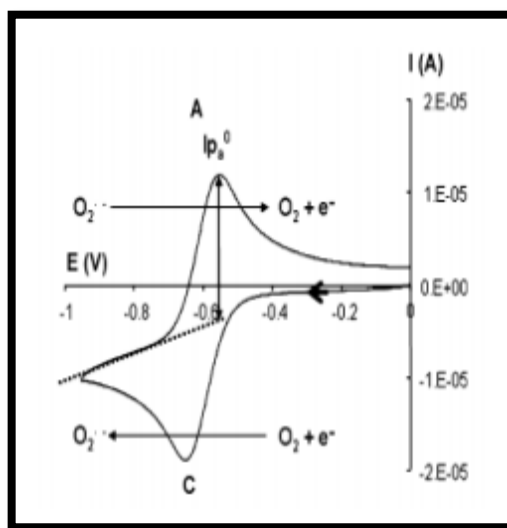


Figure 22: Voltammogramme cyclique d'oxygène (Soulef, 2017).

I.2.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion des disques citée par (Medjour & Ben aoun, 2017; Kebili, 2016; Nedjmi & Sousou, 2014 ; Meddor *et al.*, 2013; Mostfaoui & Laamri, 2017; Yakhlef, 2010).

✓ Les milieux de culture

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

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de plantes ;

✓ Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive)

✓ Préparation des précultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

✓ Préparation des disques

Nous avons préparé les disques par papier wattman de 6mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, il faut stériliser les disques 30 minutes à 120°C dans un tube essai bien fermé. Et garder le jusqu'à l'utilisation.

✓ Préparation des suspensions bactériennes

A l'aide d'une pipette pasteur nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et ont été mises dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (Na Cl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée et laissée sur la paillasse pendant 30 minutes .

✓ Test de l'activité antibactérienne

La gélose Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes Pétrie stériles à 4 mm d'épaisseur et laissée se gélifier. On a trempé une pipette pasteur dans la suspension préalablement préparée et on a étalé la surface entière avec la gélose Mueller Hinton (GMH) à trois reprises.

A - Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de notre extrait brut. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la

surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

On a utilisé l'antibiotique d'ampicilline (**AMP**).

B - Test de sensibilité aux extraits bruts des plantes : antibioaromatogramme

A l'aide d'une pince stérile, 4 disques de 6 mm de diamètre préalablement préparé, imprégnés des quatre concentrations de l'extrait aqueux (0.5, 1, 1.5, 2 mg/ml) . sont déposés dans la boîte pétrie. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

=> Le témoin négatif était un disque imprégné avec l'eau distillée stériliser. Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006).

I.2.3. Etude *in vivo*

I.2.3.1. Préparation de la solution du pesticide

La métribuzine a été solubilisé dans l'eau potable des lots 2,3,4 et 5 ,à raison de 30mg/Kg de poids corporel, par voie orale durant 50 jours (Boudebia & Boutera , 2017).

I.2.3.2. Préparation des solutions des extraits végétaux

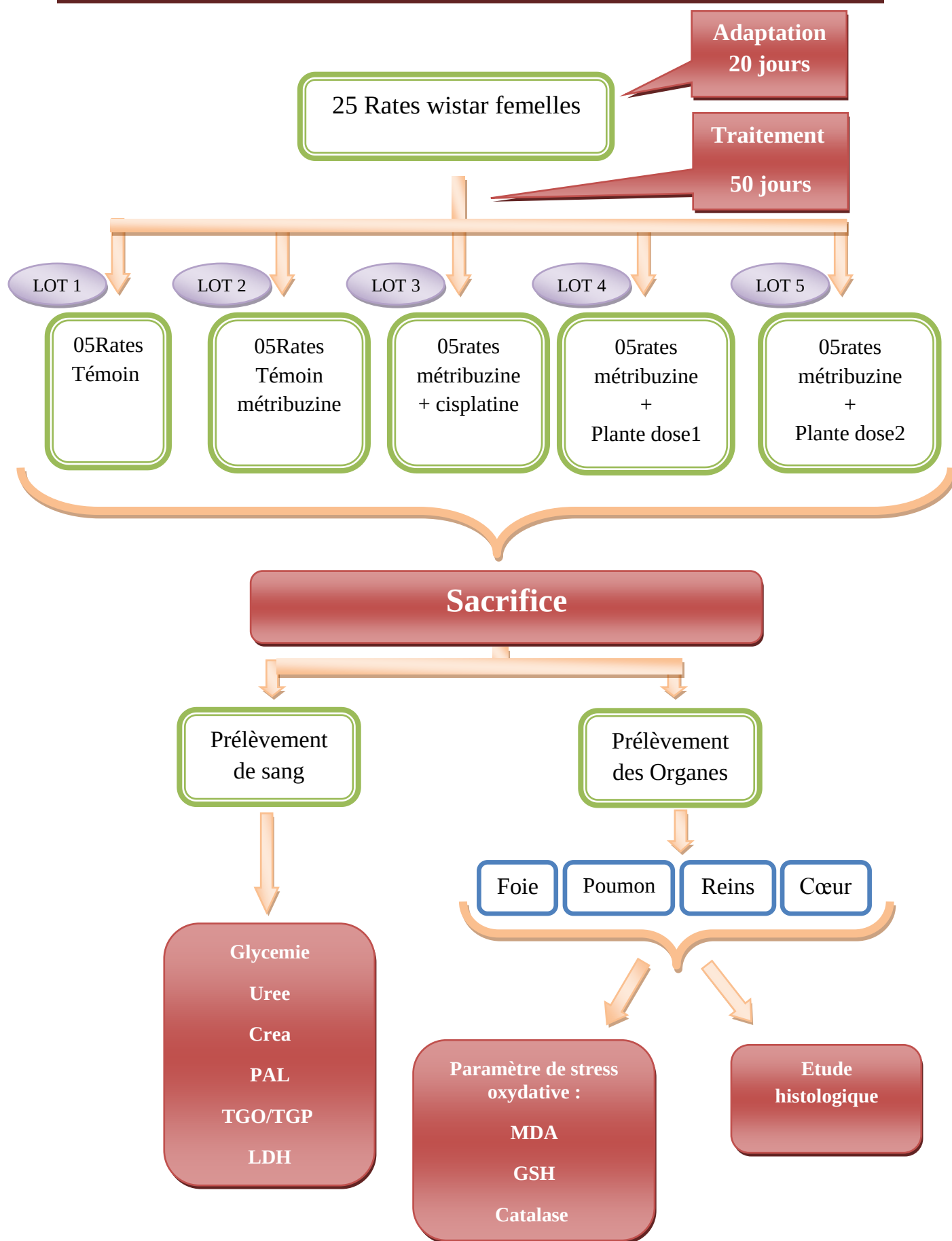
L'extrait aqueux de l'espèce végétale *Ephédra alata* a été solubilisé dans l'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%) est injecté par voie intra-péritonéal aux rattes des lots 4et 5 (La concentration de l'extrait est calculée en fonction du poids vif de l'animal; 100 mg/kg (Dose1 "D1") et 200mg/kg (Dose2 "D2") successivement) .

I.2.3.3. Préparation le médicament de cisplatine

Le cisplatine appartient au groupe de médicaments qui combattent le cancer et que l'on appelle antinéoplasiques; Il est injecté chez les rates de volume 0.1 ml par voie intra-péritonéal au lot 3 .

I.2.3.4. Conception expérimentale

L'ensemble des rates ont été divisé en cinq groupes et garder dans des mêmes conditions. Après une période d'adaptation de 20 jours, les rates ont été traités pendant 50 jours. Le poids a été enregistré pendant la durée de l'expérimentation :

**Figure 23:** Protocol expérimentale de l'étude.

I.2.3.5. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes

Après 16 h de jeûne, les rates sont sacrifiées (par décapitation) après la mesure de poids de chaque rat. Au moment du sacrifice, le sang est collecté dans des tubes secs pour chaque rat. Le sang est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute pendant 15 minutes pour la récupération du sérum. Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques.

Après la dissection, le foie, les reins, le cœur et la rate sont attentivement prélevés, rincés avec l'eau physiologique et ensuite pesés. Une partie des organes est utilisée pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé pour faire des coupes histologique au niveau du laboratoire de Centre du Pathologie Benbordi (CPB). Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH et catalase).

I.2.3.5.1. Méthodes de l'analyse sanguine

Les paramètres biochimiques mesurés sont les suivants:

Glycémie, Créatinine, urée sanguin, TGO, TGP, Phosphatase alcalines et le LDH. Chaque paramètre a une méthode de dosage spécifique et leur valeur lié au spectrophotomètre.

A. Méthode de dosage de la glycémie

❖ Principe

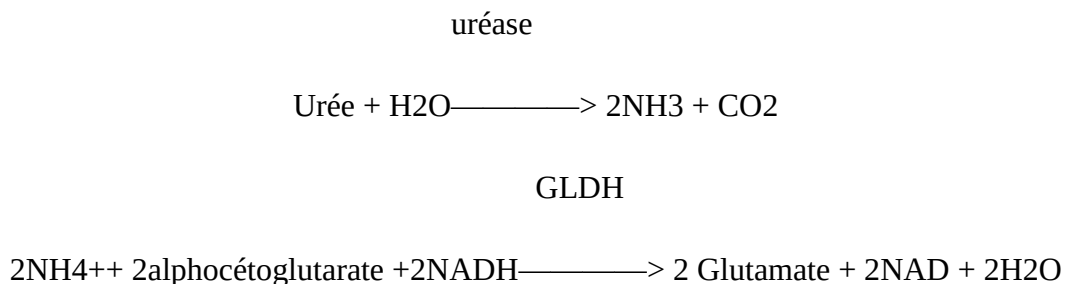
Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. Une réaction enzymatique étroitement spécifique (glucose-oxydase) oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant à l'oxydation de l'o-dianisidine en un produit coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose. (Shen, 2009)

On met 1000 µl de réactif dans le tube à essai et on ajoute 10 µl de sérum. On attende 10 min pour la réaction. A l'aide d'un spectrophotomètre UV de type SHIMADZU UV 1800, on mesure l'absorbance A de la substance colorée en solution pour la longueur d'onde λ (= 470 nm) (Alis, 2003).

B. Méthode de dosage d'Urée sanguin

❖ Principe

La détermination enzymatique de l'urée par méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes:



GLDH= 2-L-Glutamate déshydrogénase (Pauly, 2012).

On met 500 µl de 1er réactif de l'urée sanguin dans un tube à essai et on ajoute 5 µl de sérum, après 5 min on ajoute 500 µl de 2eme réactif. La valeur de l'absorbance A lié après 10min par le spectrophotomètre UV et avec un longueur d'onde λ (= 340 nm) (Babadi, 2013).

C. Méthode de dosage de créatinine

❖ Principe

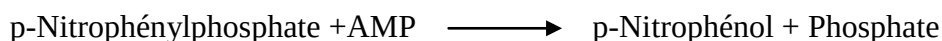
La créatinine réagit avec le picrate alcalin en donnant une coloration jaune orangé, mesurable à 520 nm, proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (Pauly., 2012).

Dans un tube à essai on met 500 µl de 1^{ère} réactif de créatinine et on ajoute 500 µl de 2^{ème} réactif puis on ajoute 100µl de sérum. On lis la valeur de l'absorbance A directement par le spectrophotomètre UV (Babadi, 2013).

D. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

❖ Principe

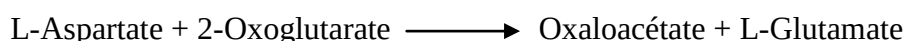
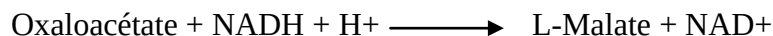
La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1-propanolen libérant du pnitrophénol et du phosphate.

PAL

La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=405$ nm (Boudebria & Boutera, 2017) .

E. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)**❖ Principe**

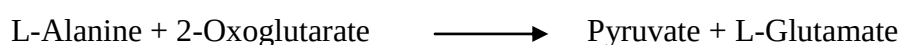
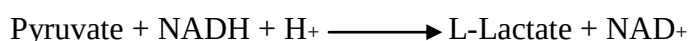
Le dosage de l'activité de l'Aspartate aminotransférase (AST ou TGO) est selon une méthode développée par Karmen et optimisée par Henry (Conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant:

AST**MDH**

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P5P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (Henry *et al.*, 1960).

F. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT)**❖ Principe**

Le dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT ou TGP), est selon une méthode développée par Wroblewski et La Due, et optimisée par Henry et Bergmeyer (conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant :

ALT**LDH**

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P₅P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (Bergmeyer *et al.*, 1978).

G. Méthode de dosage de LDH

La LDH est généralement dosée par méthode spectrophotométrique de type cinétique. On tire profit du fait que le NADH, la forme réduite, absorbe fortement autour de 340 nm alors que sa forme oxydée, le NAD⁺, n'absorbe pratiquement pas. Le principe est donc de suivre la diminution de l'A₃₄₀, si on incube du NADH et du pyruvate, ou son augmentation, si on incube du NAD⁺ et du lactate. On peut facilement faire une mesure en termes de concentration absolue car les proportions de chaque produits ou substrats sont parfaitement stoechiométriques et que le l'absorption molaire du NAD⁺ ou du NADH sont connus. On applique simplement la loi de Beer-Lambert

$$A = C \cdot l \cdot E \text{ ou } \Delta A = \Delta C \cdot l \cdot E$$

C = la concentration , **ΔC** = la variation de concentration , **A** = l'absorption , **ΔA** = la variation d'absorption , **l** = la longueur du segment lumineux, **E** = le coefficient d'absorption (donnée sous forme molaire ou autre, celle du NADH à 340 nm est de 6.22 cm²/mmol).

En réarrangeant cette équation on peut facilement trouver quel est la quantité de NADH apparu (ou disparu) en fonction de la variation de l'absorption (Mossadak ,2015).

I.2.3.5.2. Dosage des paramètres de stress oxydatif

❖ Préparation de l'homogénats des organes

Pour préparer l'homogénats, un gramme de tissu (foie, reins, cœur et la rate) est broyé dans la solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène pour chaque rat . L'homogénat est centrifugé à 3000 t/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré puis conservés à -20°C. Cette surnageant est utilisé pour le dosage des paramètres de stress oxydatif.

A. Méthode de Dosage des protéines tissulaire

❖ Principe

Les protéines tissulaires ont été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un spectrophotomètre en utilisant le bleu de Comassie qui est réagi avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). L'absorption est mesurée à 595nm (Bradford, 1976).

A. Méthode de dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires

❖ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).

Réactif :

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% P/V ; Chlorure d'hydrogène (HCl) 1 N. 375 mg de TBA, 20g de TCA, 0,01g de BHT, 25 ml de HCl 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 ml et le volume complété à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

❖ Mode opératoire

Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100 µl d'échantillon, 400 µl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100 °C pendant 15 minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Expression des résultats

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/l}$.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon}/1.53 \times 10^5)/\text{mg de prot}$$

B. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaires

❖ Principe

Le glutathion a été déterminé suivant une méthode colorimétrique de (Weckbercker & Cory, 1988) par un spectrophotomètre, la mesure de la densité optique résulte de la formation de l'acide 2- nitro-5 mercocapturique à partir de la réduction de l'acide dithio-bis2-nitrobenzoïque ce qu'on appelle réactif de d'Ellman avec les groupements SH existent dans le GSH.

❖ Mode opératoire

- Peser 250mg de tissus hépatique.
- Broyer le tissu avec 10 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
- Prendre 0.8 ml de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) solution 2.
- Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minute dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 t/min pendant 5 minutes et le surnagent utiliser pour le dosage de glutathion comme suite.

Mélangé

- 0.5 ml de surnagent.
- 1ml de solution tampon tris avec NaCl solution 1.
- 0.025 ml de DTNB (0.01mol) méthanol solution 3.

Laisser le mélange 5min de température de chambre puis lire l'absorbance avec spectrophotomètre d'absorption moléculaire à 412 nm contre le blanc (eau distillé)

Calcule

$$(\text{GSH})(\text{nM/mg de prot}) = \frac{\text{Do} \times 1 \times 1.525}{13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de prot}} \times d$$

13133: constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

DO: la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525ml: volume total de mélange.

0.5ml: volume de solution surnagent.

1: volume de mélange de protéine.

0.8ml: volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

(GSH): concentration de glutathion.

d : facteur de dilution.

C. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du catalase

❖ Principe

Un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml de H_2O_2 fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (Clairborne,1985).

Calcule

L'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon la formule :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) / \text{g de protéine}$$

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

I.2.3.5.3. Préparation des échantillons pour l'étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du centre d'analyse pathologique Ben Bordi, service l'anapath, El Oued .

A. Le prélèvement d'échantillon

Le prélèvement histologique est une biopsie qui est un prélèvement d'un très petit morceau de chaque organe (foie, poumon, cœur et reins) pour effectuer des examens (Rezzag Mohcen & Serout ,2015)

Ils doivent être rapidement prélevés les organes pour éviter son autolyse qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau distillé ensuite avec du NaCl 0,9%, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 30%.La technique utilisée comporte les étapes suivantes (Boudebia & Boutera , 2017) .

B. Préparation des cassettes porteurs les biopsies

On met les biopsies (fragments des tissus) dans le formole quelque jours, puis on prend les fragments des tissus et on les met dans les cassettes et ensuite on ajoute le paraffine pour fixer les fragments et en fin on met les cassettes dans le congélateur en -23C ° pour la conservation (Julie, 2007).

C. Obtention des coupes histologiques

- A l'aide d'un microtome, on fait les coupes histologiques.
- On place la cassette qui porte la biopsie dans l'appareil (le microtome) et en fait le coupage par (18 µm puis 5, 8 ou 10 µm) pour obtenir des tranches fines (rubans).
- On met les tranches fines (rubans) dans un bain marie (à 37 C °) durant quelque secondes (≈1min) pour le paraffine devient friable (détrempé).
- A l'aide des lames, on prend ces rubans du bain marie et en les place sur porte lame.
- Dans un étuve, on pose le porte lame à 110 C ° durant 7minutes pour éliminer le paraffine (Jean et *al.*, 2008).

D. Coloration

Pour la coloration, la technique utilisée est celle à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique).La coloration suit les étapes suivantes :

Déparaffinage et hydratation des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée. Puis sont misent dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux). Les lames sont plongées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); ensuite dans un bain d'eau du robinet avec vérification de la différenciation au microscope. Misent dans un bain d'eau ammoniacale, puis dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet

E. Le montage

Après l'enlèvement des lames d'xylène on fait le montage; on humide un peu la lame par l'xylène puis on met un peu de quantité de colle spécifique (l'EUKITT) qui permet de coller bien la lame avec la lamelle et aussi de donner une observation très clair et transparent, puis on met la lamelle, et on presse un peu pour enlever le reste d'air (Rezzag mohcen & Serouti ,2015).

F. Observation

On utilise le microscope optique pour observer les résultats par l'agrandissement x 40; Et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

I.2.4. Analyses statistiques

Les résultats des tests sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. L'évaluation statistique des résultats est effectuée par le test T student; qui est basé sur la comparaison entre deux moyennes. Pour cela, on a utilisé les logiciels de MINITAB (version 13) et EXCEL (version 2010),

La signification est déterminée par la valeur $\alpha=0.05$; Si :

$P < 0.05$: Différence significative.

$P < 0.01$: Différence hautement significative.

$P < 0.001$: Différence très hautement significative.

$P > 0.05$: Différence non significative.

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition=f(concentration)].

CHAPITRE II



Résultats et discussion

II.1. Résultats et interprétation

II.1.1. Enquête ethnobotanique :

- Selon sexe

Dans la zone d'étude, les hommes et les femmes sont concernés par la médecine traditionnelle (Figure 24).Cependant, les femmes ont un peu plus de connaissances sur les espèces médicinales *Ephedra alata alanda* par rapport aux hommes (56,41% contre 43,58%)

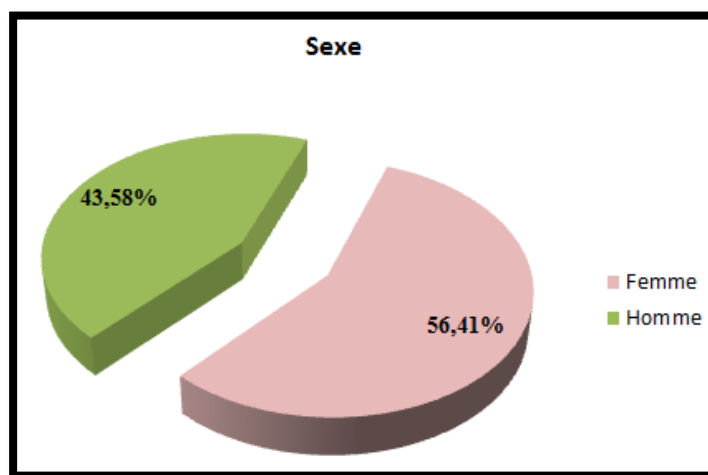


Figure 24 : Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon sexe.

- Selon l'Age

L'utilisation des plantes médicinales (Figure 25) dans la région d'El-oued est répandue chez toutes les tranches d'âge, avec une prédominance chez les personnes âgées de 40 à 50 ans (39,74 %).Cependant, pour la tranche d'âge de 30à 40 ans, on note un taux de (20,51%),et pour la tranche d'âge de 50à60ans (16,66%), puis 12,82% pour la tranche d'âge plus de 60 ans de 20à30ans et pour les personnes de 20à30ans ,l'utilisation des plantes médicinales (7,69%) ne représente pas un grand intérêt thérapeutique, la même chose chez les personnes inférieure de 20 ans(2,56%).

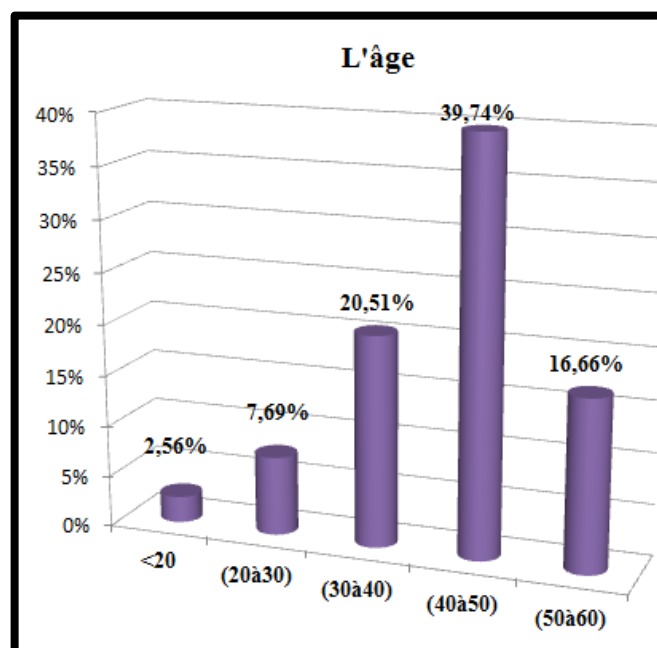


Figure 25: Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon l'âge (Année) .

- **Selon la reconnaissance**

Dans la zone d'étude, toutes les personnes 100% connaissent *Ephedra alata alanda* .



Figure 26: Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon la reconnaissance.

- **Selon la source d'information**

La source d'approvisionnement de plante utilisée dans la région d'étude est un taux de 57.69% par expérience, par la média avec un taux 17.94%, médecine alternative 11.53% Herboristes 10.25% , l'épicier 2.56% .

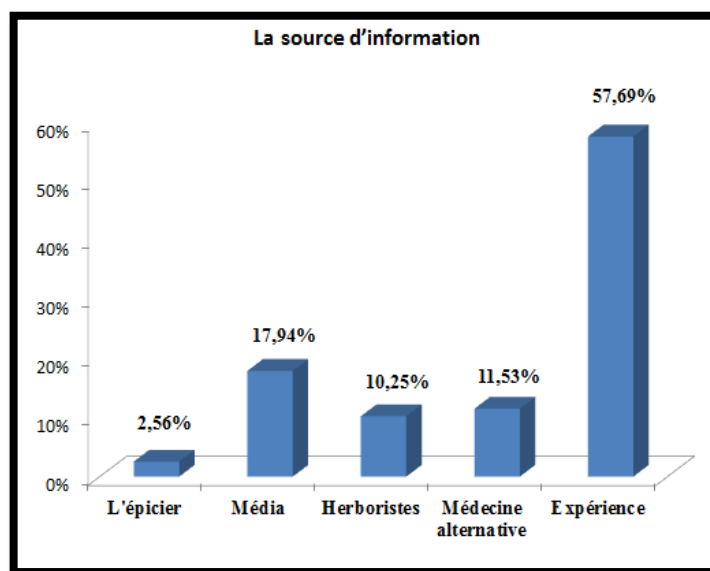


Figure 27: Représentation statistique descriptive des résultats d'enquête ethnobotanique selon la source d'information.

- **Selon le niveau d'étude**

Selon la figure 28 , la grande majorité des usagers des plantes médicinales ont un niveau moyen avec un pourcentage de 32,05 % cela est relativement élevé et en corrélation directe avec le niveau d'études de la population locale utilisatrice des plantes. Néanmoins, les personnes analphabétiques ont un pourcentage d'utilisation non négligeable des plantes médicinales qui est de 28,20%, alors que celles ayant un niveau d'études primaire ont un pourcentage 17,94% ,sachant que ceux ayant le niveau secondaire et universitaires, utilisent très peu les plantes médicinales secondaire 12,82%, universitaire 8,97%.

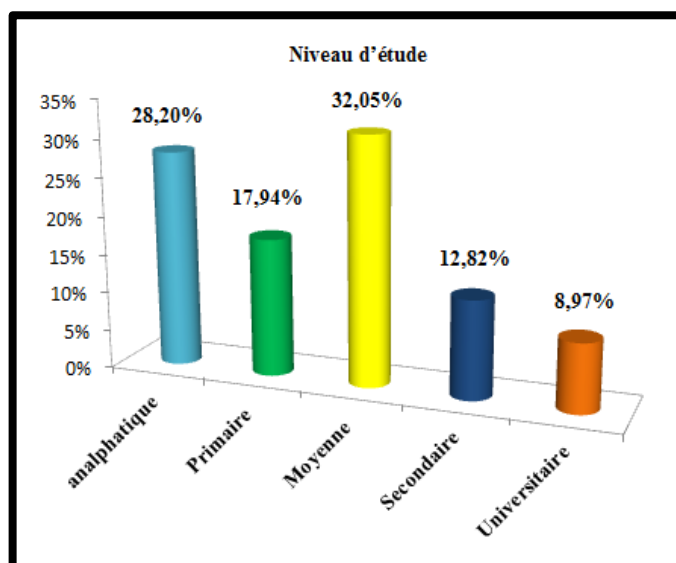


Figure 28: Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le niveau d'étude

- **Selon le mode d'utilisation**

Dans notre enquête nous avons trouvé que les personnes qui utilisent la plante en état sèche (63,15%) et les personnes qui utilisent fraîche (36,84%).

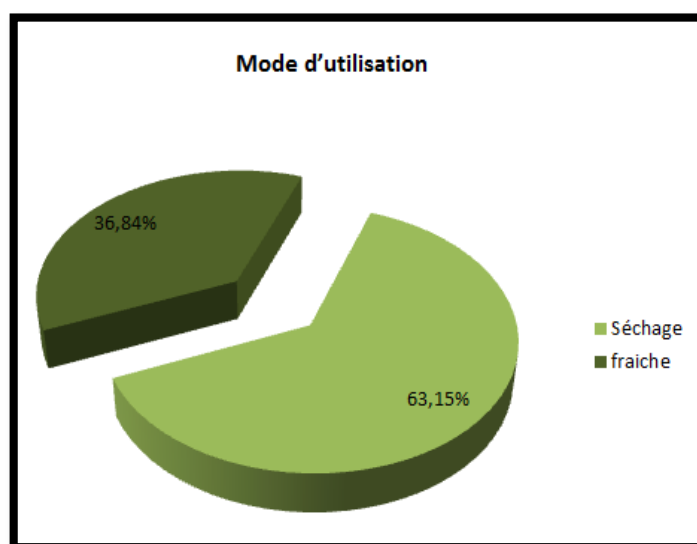


Figure 29 : Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le mode d'utilisation.

- **Selon le mode de préparation**

D'après l'enquête le mode de préparation de la plante varie en fonction de l'efficacité du mode vis à vis la plante. Le mode de décoction est le mode le plus dominant (44,44%). Ce pourcentage montre que la population locale fait confiance à ce type de préparation et le trouve adéquat pour réchauffer et désinfecter le corps. La préparation en poudre est indiquée avec un taux de 15,27%. la macération 15,25% et tizane 11,11% ,par inhalation 8,33%, pigment 5,55% .

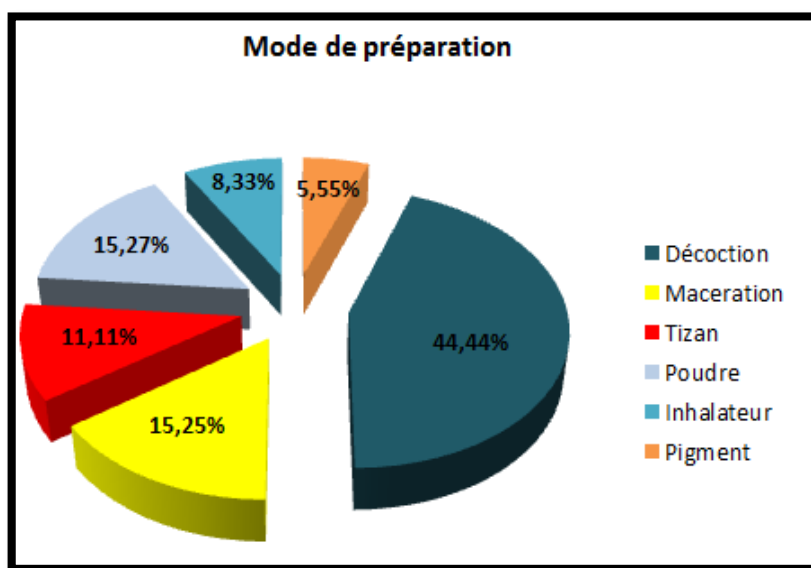


Figure 30 : Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon le mode de préparation .

- **Selon la partie utilisée**

Les principes actifs peuvent être situés dans différentes parties des plantes médicinales (partie aérienne, plantes entière , feuilles, fleurs, racines, écorce, fruits, graines, rhizome...). Dans la zone d'étude, la partie aérienne la plus utilisée des plantes médicinales avec un taux de 35,29 %, suivies par la plante entière 21,56%, puis viennent les feuilles 9,80% ,les fleurs avec un taux d'utilisation de 7,84% , les racines 3,92% Autres combinaisons 1,96% (Figure31).

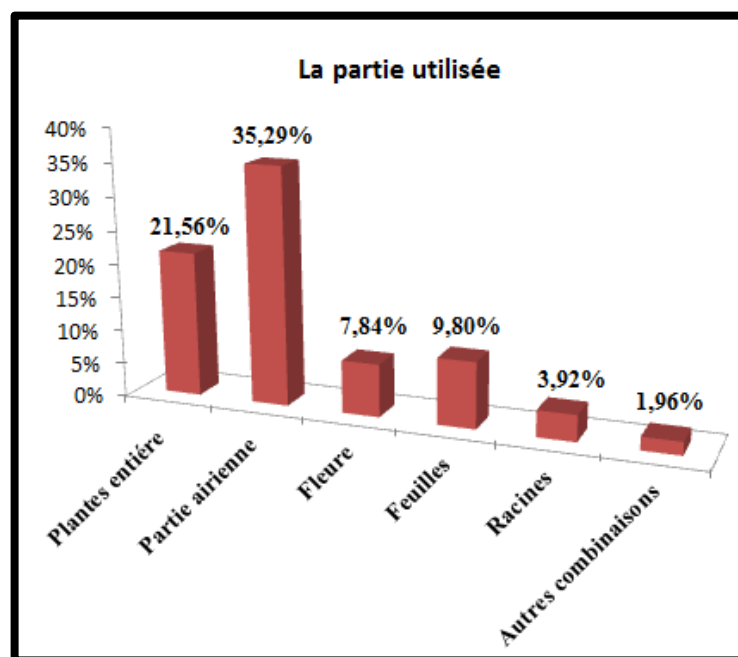


Figure 31: Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon la partie utilisée.

- Selon les maladies traitées

Les résultats obtenus montrent que *Ephedra alata* est utilisé en médecine traditionnelle interviennent dans le traitement des cancer avec un pourcentage 24,24 % , inflammation l'estomac 13,13% l'asthme 12,12% ,pression artérielle 11,11% et le diabète 10,10% puis les autres affections(Figure 32).

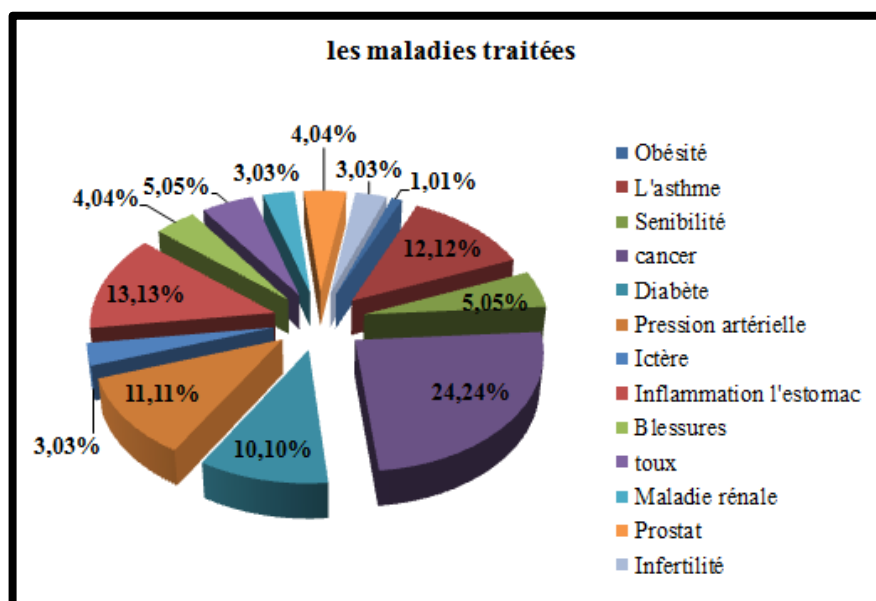


Figure 32 : Représentation statistique descriptive des résultats l'enquête ethnobotanique selon les maladies traitées

II.1.2. Rendement d'extraits aqueux :

L'extrait obtenu après macération dans l'eau distillée d'aspect Collant et pâteux, de couleur marron foncé a été pesé pour déterminer son rendement.

Le rendement est calculé par rapport au poids de la matière sèche de plante étudiée par macération est 8.21%

II.1.3. Etude *in vitro*

II.1.3.1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests de criblage phytochimique préliminaires sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Le screening phytochimique a mis en évidence divers métabolites secondaires dans la partie aérienne de la plante : Polyphénols, Flavonoïdes , tanins, alcaloïdes ,saponosides, sucres réducteurs et terpènes .

II.1.3.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

A. Teneurs en polyphénols totaux (PPT)

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été effectuée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu . La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes d'extrait ont été rapportées en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS). est déterminé par l'équation de type : $y = 9.619x + 0.022$ avec $R^2 = 0,998$.

B. Teneurs en flavonoïdes totaux (FVT)

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon est la quercétine . La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme de matière végétale sèche (µg EQ/mg de MS). Le taux des flavonoïdes d'extraits a été obtenu à partir du courbe d'étalonnage qui suit une équation de type: $y=0.066x+0.000$ avec $R^2 = 0,998$.

L'estimation quantitative d'extrait aqueux, préparé à partir des parties aériennes d'*Ephedra Alata* au moyen des dosages spectrophotométriques sont rapportée dans le tableau 04 .

D'après les résultats, on peut constater que l'extrait de la plante étudié, est riche en polyphénols et Flavonoïdes .

II.1.3.3. Etude de l'activité antioxydant

A. Par méthode spectrométrique

✓ Test du piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydant de notre extrait a été évaluée par test DPPH ; Dans ce test on utilise l'acide ascorbique comme standard, les résultats obtenus (pourcentage d'inhibitions I%) sont représentés dans la courbe d'étalonnage (figure 33), ayant l'équation: $Y = -3588x - 3.075$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.982$

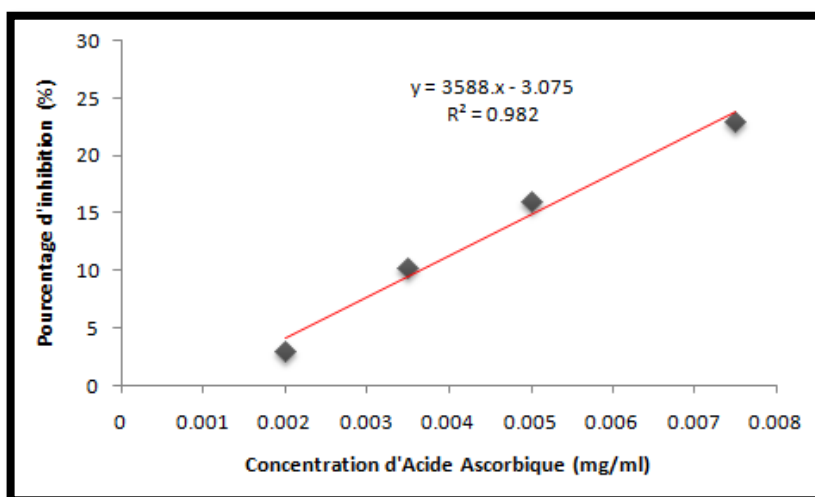


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

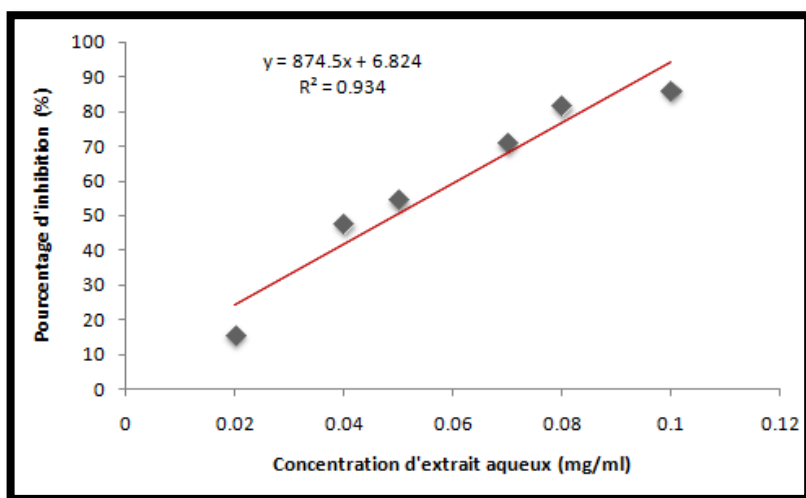


Figure 34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux

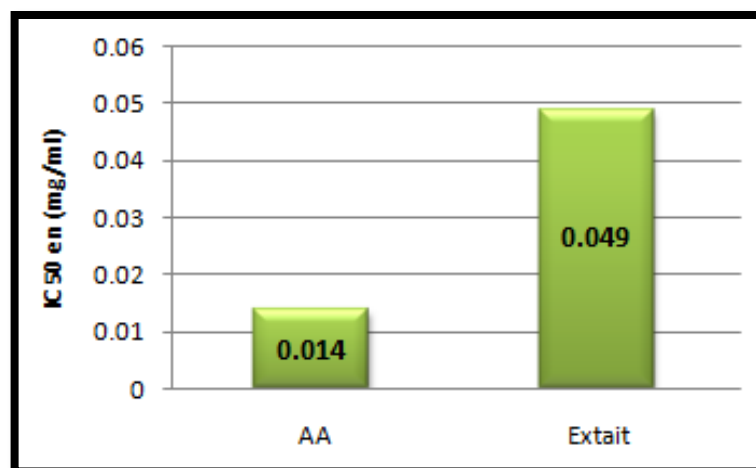


Figure 35: Valeur IC₅₀ d'extrait aqueux d'*Ephedra Alata* et composé standard (acide ascorbique)

Extrait : Extrait Aqueux ; **AA :** Acide Ascorbique .

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC₅₀ (**figure 35**), ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC₅₀ sont déterminés graphiquement des deux tests séparés, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque IC₅₀ exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50% de DPPH en solution.

Les résultats montrent un pouvoir antioxydant plus important de l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* (IC₅₀ = 0.049 ± 0.0025 mg/ml) en comparaison avec le contrôle positif "Acide Ascorbique" (IC₅₀ = 0.014 mg/ml).

B. Par méthode électrochimique

✓ Etude de l'activité antioxydante total

Puisque l'acide gallique est connu pour ses propriétés antioxydantes très intéressantes, il est donc utilisé comme standard dans notre étude, nous notons que l'étude est effectuée dans le domaine d'électroactivité d'acide gallique pour évaluer l'activité antioxydante de notre échantillon .

❖ Réponse de courant et la courbe d'étalonnage d'acide gallique :

D'après la courbe d'étalonnage, la valeur du coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ qui est une valeur très exacte, ce qui traduit l'exactitude de cette technique à travers les résultats obtenues.

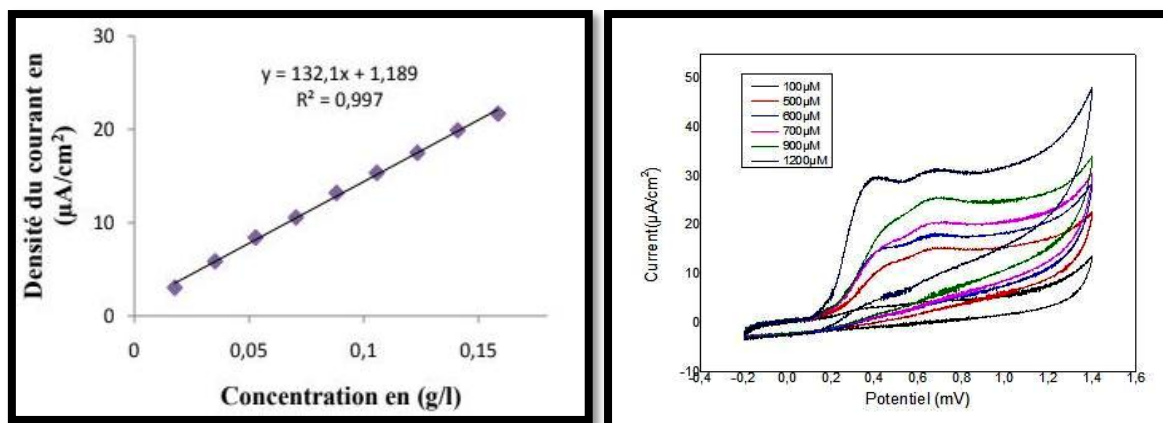


Figure 36 : Les courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la voltammétrie cyclique .

❖ Voltampérogrammes cycliques d'extrait aqueux

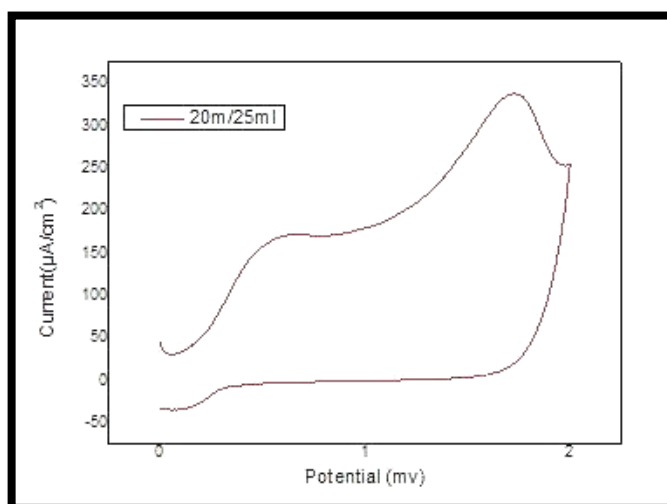


Figure 37 : Voltampérogramme cyclique d'extrait aqueux d'*Ephedra Alata*

❖ Paramètres électrochimiques

Les paramètres électrochimiques d'extrait aqueux d'*E. Alata* étudiés sont rassemblés dans les tableaux ci-dessous:

la valeur de l'activité antioxydante totale calculées par la formule (*) = 173.710 mg/g.

- ✓ **Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage de anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$**
- ❖ **Voltammogramme et courbe d'etalonnage d'antioxydant standard (Acide gallique)**

L'antioxydant standard avec différentes quantités est dissout dans le DMF, pour obtenir des concentrations différentes à chaque injection dans la cellule avec lesquelles on peut tracer leur courbe d'étalonnage. Ensuite, les voltammogrammes du standard ont été enregistrés.

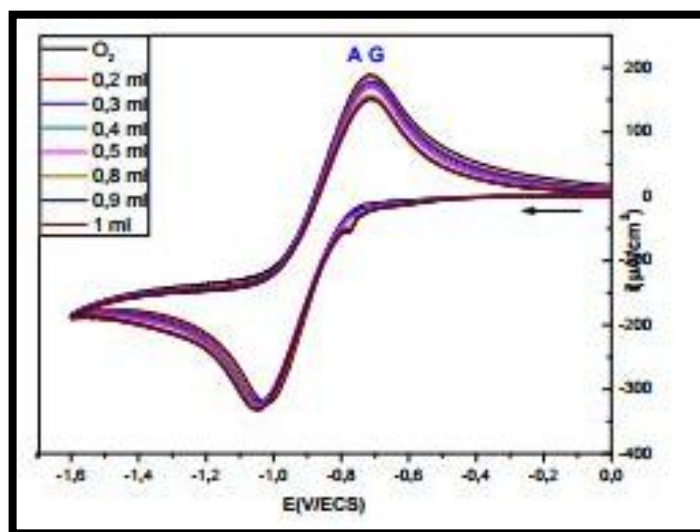


Figure 38 : Voltammogrammes de $O_2^{\cdot-}$ en présence de différentes concentrations d'acide gallique, dans le DMF + 0.02 M Bu₄NBF₄, vitesse de balayage 100mv

- ❖ **Voltammogrammes des produits étudiés (testés) :**

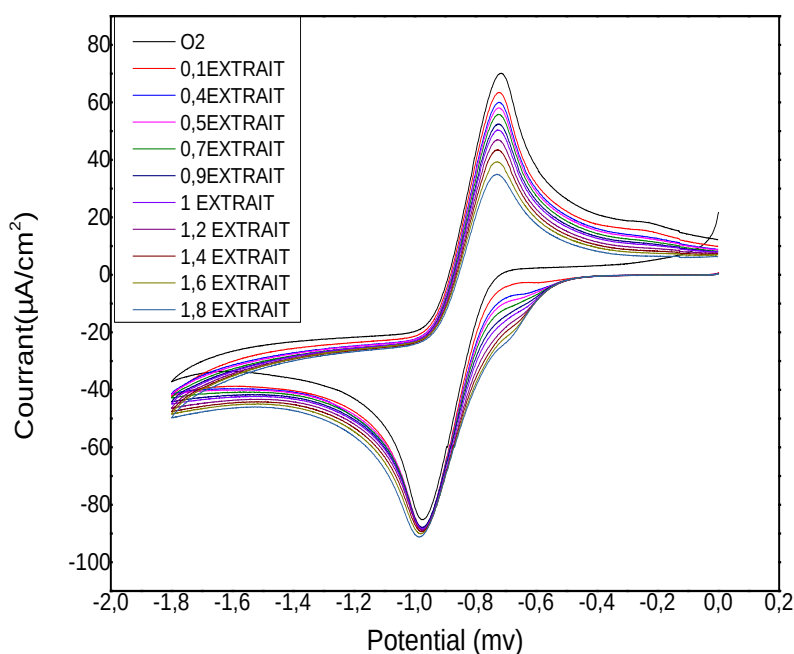


Figure 39 : Voltammogrammes de $O_2^{\bullet-}$ en présence de différentes concentrations d'extrait aqueux , dans le DMF + 0.02 M Bu₄NBF₄, vitesse de balayage 100mv

En se basant sur l'équation (*'), on peut calculer les pourcentages d'inhibition du superoxyde anion dans la cellule par les antioxydants standards ainsi que par les produits étudiés.

On peut tracer la courbe qui représente les pourcentages d'inhibition de superoxyde en fonction des concentrations d'antioxydants standard dans la cellule.

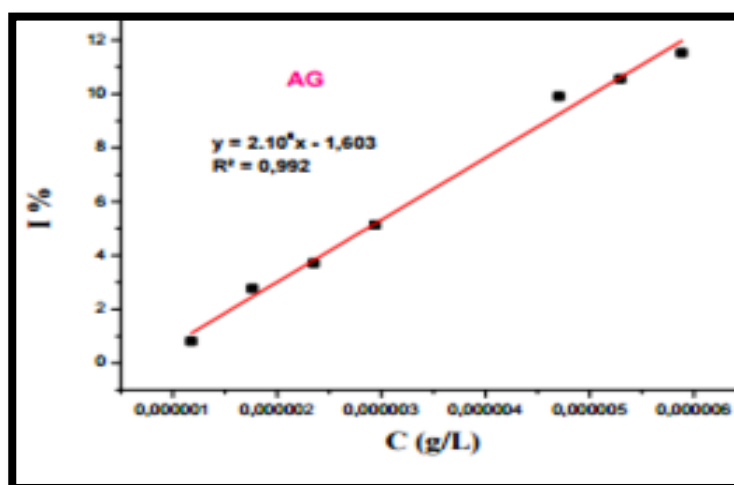


Figure 40: Evaluation du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction de la concentration de l'acide gallique.

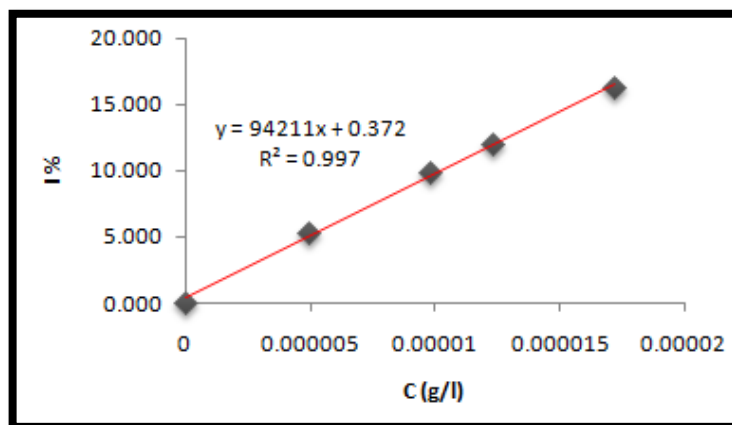


Figure 41: Evolution du pourcentage d'inhibition de superoxyde en fonction de la concentration d'extrait aqueux d'*Ephedra Alata*.

A partir des équations linéaires, on peut calculer les IC₅₀ en g/l (tableau 10).

Tableau 10: IC₅₀ d'Acide gallique et d'Extrait aqueux avec les équations linéaires.

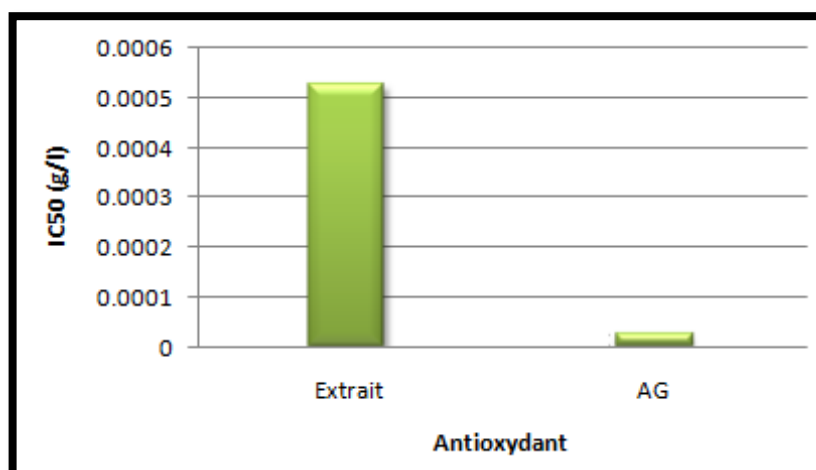


Figure 42: IC₅₀ d'Acide gallique et d'Extrait aqueux

II.1.3.4. Etude de l'activité antibactérienne d'extraits bruts d'*Ephedra alata*

L'étude du pouvoir antibactérien d'extraits d'*Ephedra alata* par la méthode de diffusion sur gélose. La mesure du diamètre des zones d'inhibition y compris le disque (5 mm) permettent de déterminer cette activité antimicrobienne de cette plante in vitro. Le tableau 5 indique les résultats des tests d'activité antimicrobienne d'extrait issus de la plante *E.ALATA* sur les souches bactériennes.

Tous les extraits n'ont pas réagi avec les souches microbiennes testées. On remarque aussi l'absence de pouvoir inhibitrice d'extrait contre la croissance bacterienne comparativement au témoin positif qui a réagi fortement .

II.1.4. Etude *in vivo*

II.1.4.1. Effet de traitement par l'extrait d'*Ephedra alata* et le Cispt sur le poids relatif des organes chez les rattes exposées au métribuzine

Les foies, les reins, les cœurs et les poumons sont attentivement prélevés, les poids relatif de ces organes sont calculés comme suit :

$$\frac{\text{poids d'organe}}{\text{poids totale de ratte}} \times 100$$

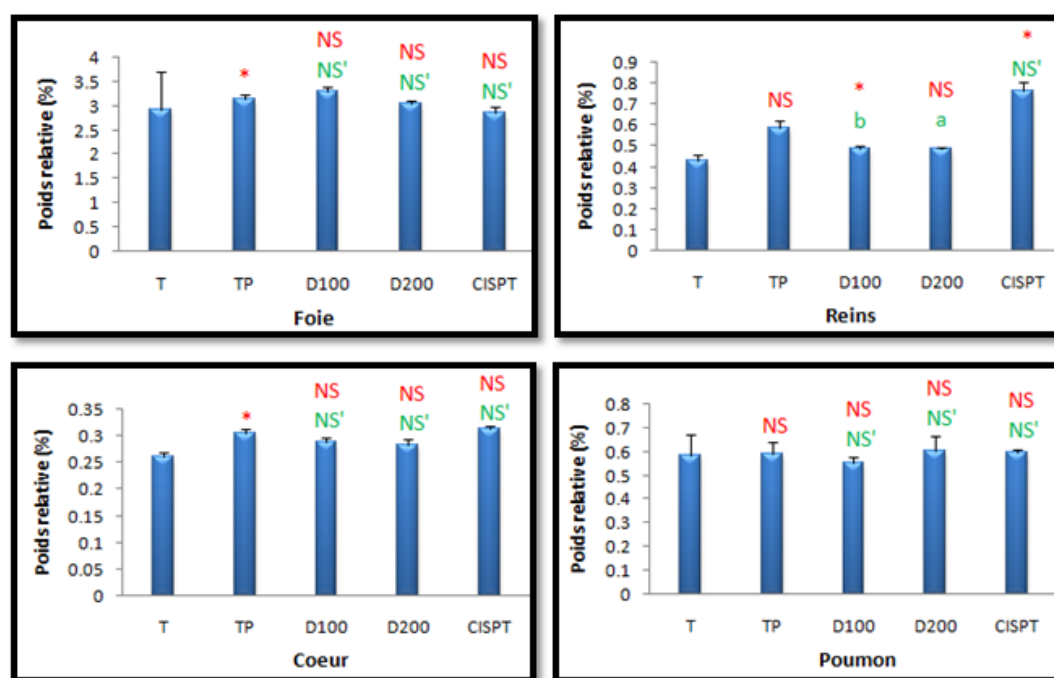


Figure 43: Poids relatif des organes (foie, reins ,cœur, et poumon) chez les différents groupes expérimentaux.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ^{NS} $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ^{NS'} $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

Les résultats présentés dans la figure 43 : montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids relatif de foie et de cœur et non significative ($p > 0,05$) du poids relatif des reins de groupe exposé au métribuzine (TP) par rapport au groupe Témoin (T), et aucune variation concernant le poids relatif de poumon. En revanche; une diminution, significative ($p < 0,05$) et hautement significative ($P < 0,01$) de poids relatif des reins chez les groupes traités par D₂₀₀ et D₁₀₀ d'extraire aqueux d'*Ephedra alata alenda* successivement ; et aucune variation significative ($P > 0,05$) concernant les autres organes par rapport au groupe TP .

II.1.4.2. Effet de traitement par l'extrait aqueux et le Cispt sur les paramètres biochimiques chez les rattes exposées au métribuzine

Les analyses biochimiques ont été réalisées au laboratoire ELMEDJED à El oued .

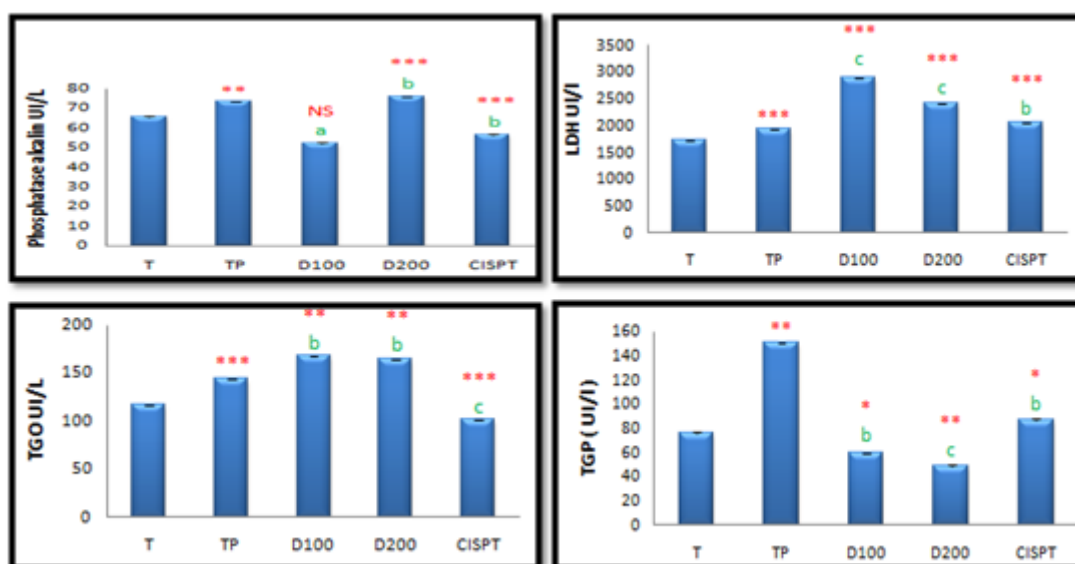


Figure 44: Effet de traitement par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* et le Cispt sur les enzymes hépatique (TGO, TGP), le taux de PAL et le taux de LDH chez les rattes exposées au métribuzine.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS $P > 0,05$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; ^{NS'} $P > 0,05$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

L'analyse chez les rattes exposées au métribuzine ,nous montre une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) des variations du taux de TGO et HDL , et augmentation hautement significative du taux de TGP et PAL, par rapport au groupe témoin sain (T). En revanche, le traitement des rattes par 100mg/kg de l'extrait aqueux de la plante *E.alata* provoque une augmentation hautement significative($p < 0,01$) et très hautement significative ($p < 0,001$) respectivement de TGO et de LDH, et une diminution significative($P < 0,05$) et

hautement significative ($P < 0.01$) de taux de PAL et TPG successivement. Et pour la dose de 200mg/kg, une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de TGO et très hautement significative ($p < 0.001$) de LDH et de PAL; d'un autre côté, le traitement par le cisplatine provoque une augmentation, très hautement significative de TGO, PAL et de LDH, et hautement significative de TGP.

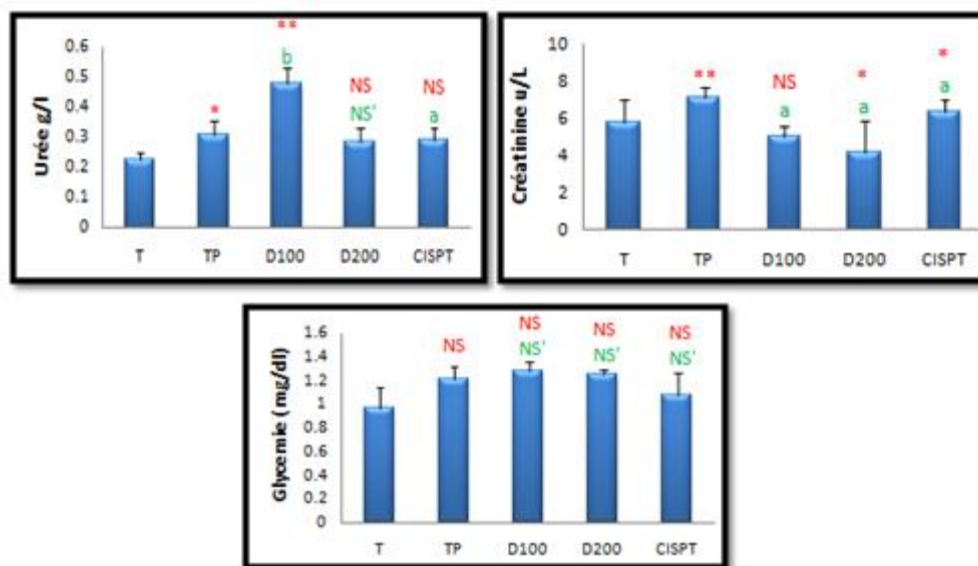


Figure 45: Effet de traitement par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* et le Cispt sur le bilan rénal (urée, créatinine) et la concentration sérique en glycémie chez les rattes exposées au métribuzine.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **NS** $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ^{NS'} $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

Les résultats obtenus (figure 45) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une augmentation, significative des concentrations de l'urée, et hautement significative de la créatinine par rapport aux rattes saines. Cependant, le traitement des rattes par 100mg/kg de d'extrait aqueux provoque une augmentation hautement significative de l'urée, contrairement au dose de 200mg/kg qui provoque une diminution non significative ($P > 0.05$). alors que les 2 doses sont provoquées une diminution significative de créatinine. pendant que le traitement par le cisplatine provoque une diminution significative de l'urée et de créatinine par rapport aux rattes exposées au métribuzine (Témoin pesticide).

Pour la concentration sérique en glycémie on observe une augmentation non significative du taux de glucose sanguin chez les lots expérimentales par rapport au témoin

sain et témoin pesticide , sauf que avec le traitement par le cisplatine qui provoque une diminution non significative par rapport au T et TP.

II.1.4.3. Effet de traitement par l'extrait d'*Ephedra alata* et le Cispt sur les paramètres de stress oxydatif chez les rattes exposées au métribuzine

Après 50 jours d'exposition des rattes au métribuzine sont traitées par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* (des doses 100 et 200mg/kg) et le cisplatine pendant 7 jours, dans les organes prélevés ont été effectués les tests des stress oxydatifs (Malondialdéhyde« MDA », glutathion réduit « GSH » et catalase).

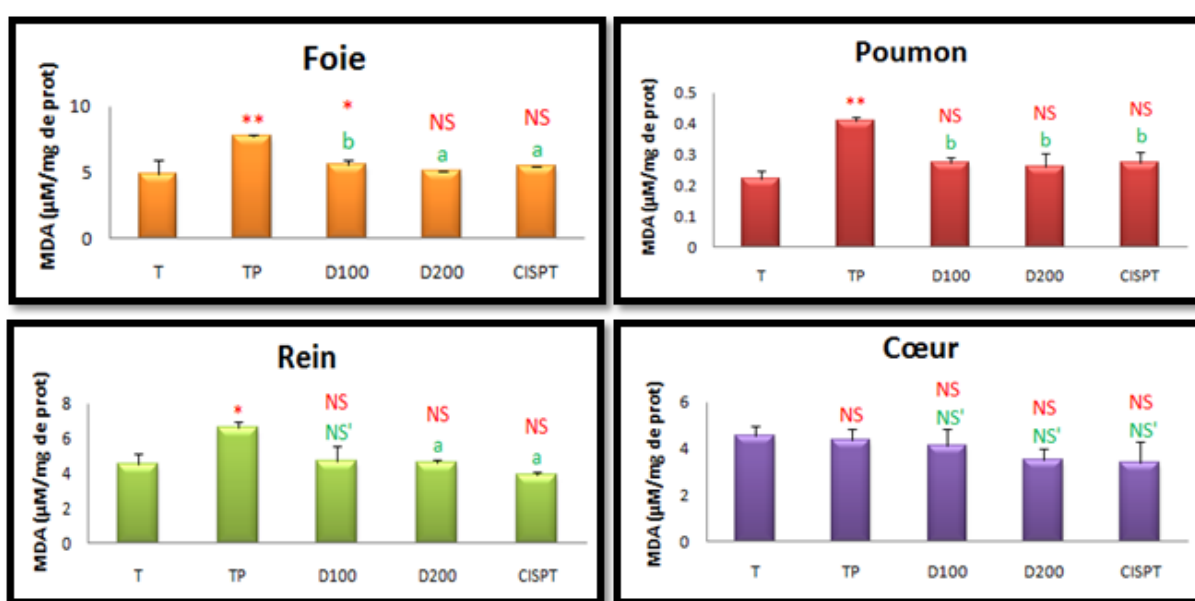


Figure 46: Concentration de Malondialdéhyde (MDA) hépatique, pulmonaire, renal et cardiaque chez les différents groupes expérimentaux.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 ; NS P > 0.05 comparaison avec le lot témoin.

^a p < 0.05; ^b p < 0.01; ^c p < 0.001 ; ^{NS'} P > 0.05 comparaison avec le lot témoin pesticide.

Les résultats présentés dans la figure 46 chez les rattes exposée au métribuzine montrent une augmentation hautement significatif de la concentration hépatique et pulmonaire de MDA (p<0.01), une augmentation significative de la concentration rénale de MDA (p<0.05), et une diminution non significative de la concentration cardiaque de MDA (P>0.05) par rapport aux rattes saines. Concernant la concentration rénale et hépatique de MDA chez les rattes de lot traitées par 100mg/kg d'extrait aqueux, une diminution no significative (P>0.05) et hautement significative (P<0.01) observée successivement, et une diminution significative observée chez les rattes des lots traitées par 200mg/kg d'extrait et cisplatine

($p < 0.05$) . Cependant, les résultats de la concentration pulmonaire pour les rattes traitées par les deux dose d'extrait et cisplatine montre une diminution hautement significative et concernant la concentration cardiaque de MDA montre une diminution non significative par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide)

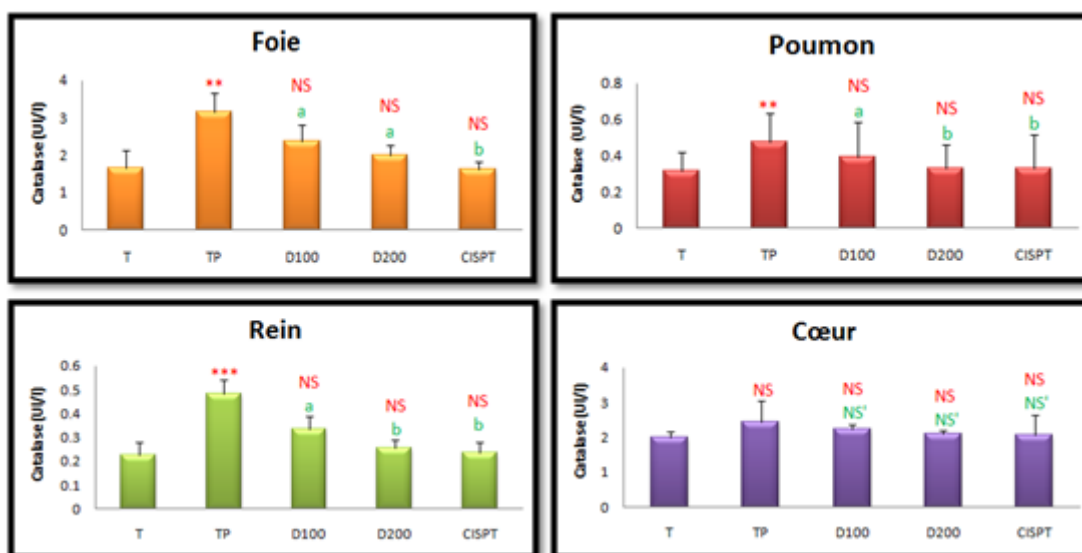


Figure 47: Concentrations tissulaires de catalase chez les différents groupes expérimentaux.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ^{NS'} $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

Les résultats obtenus chez les rattes exposée au métribuzine présentés dans la figure 47 montre que la concentration hépatique et pulmonaire de catalase augmente de façon hautement significative ($p < 0.01$) ,et de façon très hautement significative pour la concentration rénale de catalase . Concernant la concentration cardiaque les résultats montre une augmentation non significative par rapport aux rattes saines (T). Les résultats montrent aussi que le traitement par 100mg/kg d'extrait aqueux d'*Ephedra alata* provoque une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration pulmonaire et rénale de catalase avec une diminution non significative de la concentration cadiaque de catalase, la dose de 200mg/kg montre aussi une diminution hautement significative ($p < 0.01$) et non significative ($p > 0.05$) successivement. cependant, le traitement par cisplatine montre une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration hépatique, pulmonaire et rénale, et une diminution non significative de la concentration cardiaque de catalase ($p > 0.05$), par rapport aux rattes exposées au métribuzine (témoin pesticide)

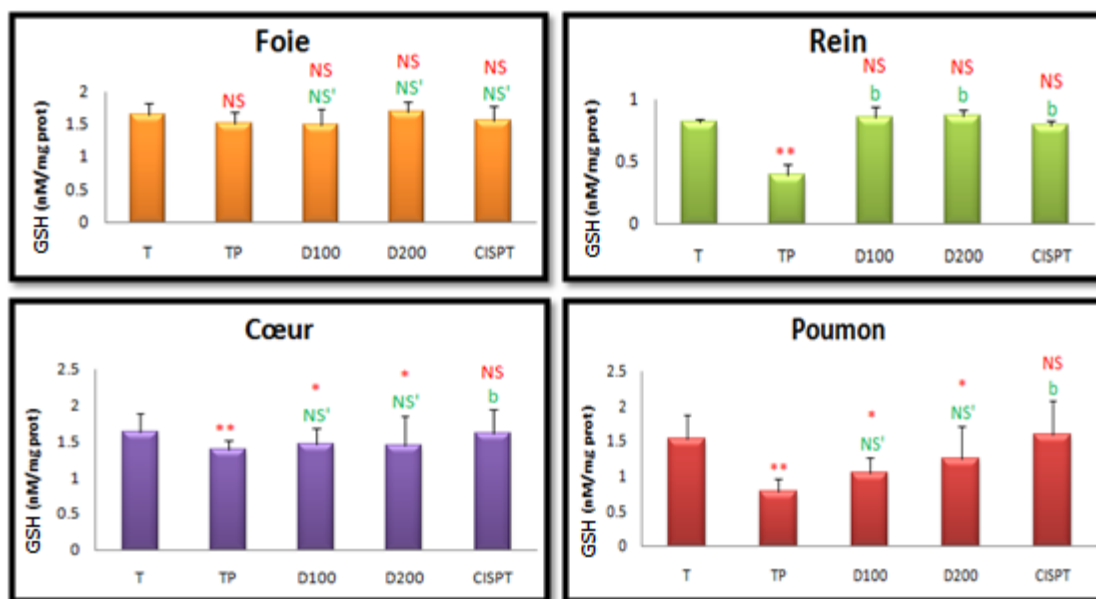


Figure 48 : Concentrations tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les différents groupes expérimentaux.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin.

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ^{NS'} $P > 0.05$ comparaison avec le lot témoin pesticide.

Les résultats obtenus (figure 48) montrent que l'exposition des rattes au métribuzine provoque une diminution non significatif de la concentration hépatique($p > 0.05$), et hautement significative de la concentration rénale, pulmonaire et cardiaque de GSH ($p < 0.01$) , par rapport aux rattes saines.

Concernant les résultats de la concentration rénale de GSH pour les trois lots (de dose D100,D200 et de cisplatine) , montrent une augmentation hautement significative ($p < 0.01$). Pour la concentration hépatique de GSH une diminution non significative observée pour les lots de 100mg/kg d'extrait et de lot de cisplatine, et une augmentation non significative pour lot de 200mg d'extrait . ainsi les résultats de la concentration cardiaque et pulmonaire de GSH montrent une augmentation non significative ($p > 0.05$) pour les deux dose d'extrait , et une augmentation hautement significative pour lot de cisplatine .

II.1.4.4. Etude histologique

Des coupes histologiques ont été réalisées (au niveau des tissus du foie, poumon et du rein), pour avoir l'effet des substances actives de l'espèce *Ephédra alata* par rapport au cisplatine, après l'exposition de 50 jours au métribuzine.

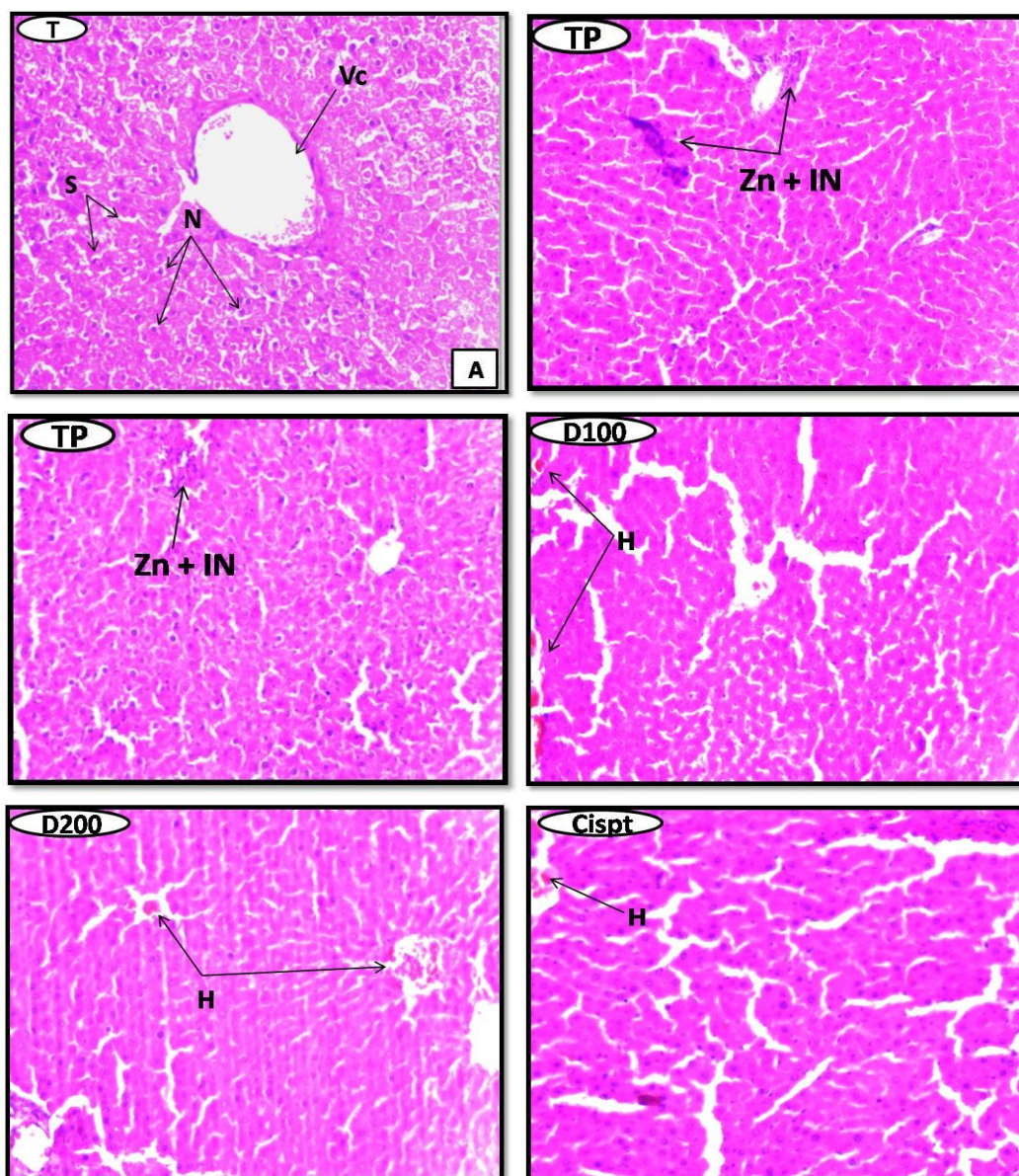


Figure 49: Observation microscopique d'une coupe histologique du foie chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)

A: Foie, **T:** Temoin sain, **TP:** Temoin Pesticide, **D100:** ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 100mg/kg d'extrait aqueux d'*E. Alata*, **D200:** ratte exposé au métribuzine et traité par la dose 200mg/kg d'extrait aqueux d'*E. Alata*, **C:** ratte exposé au métribuzine et traité par cisplatine. **Vc:** Veine Centro-lobulaire, **N:** Noyau, **S:** Sinusoïde hépatique, **Zn+ IN:** Zone de nécrose avec inflammation, **H:** hémorragie.

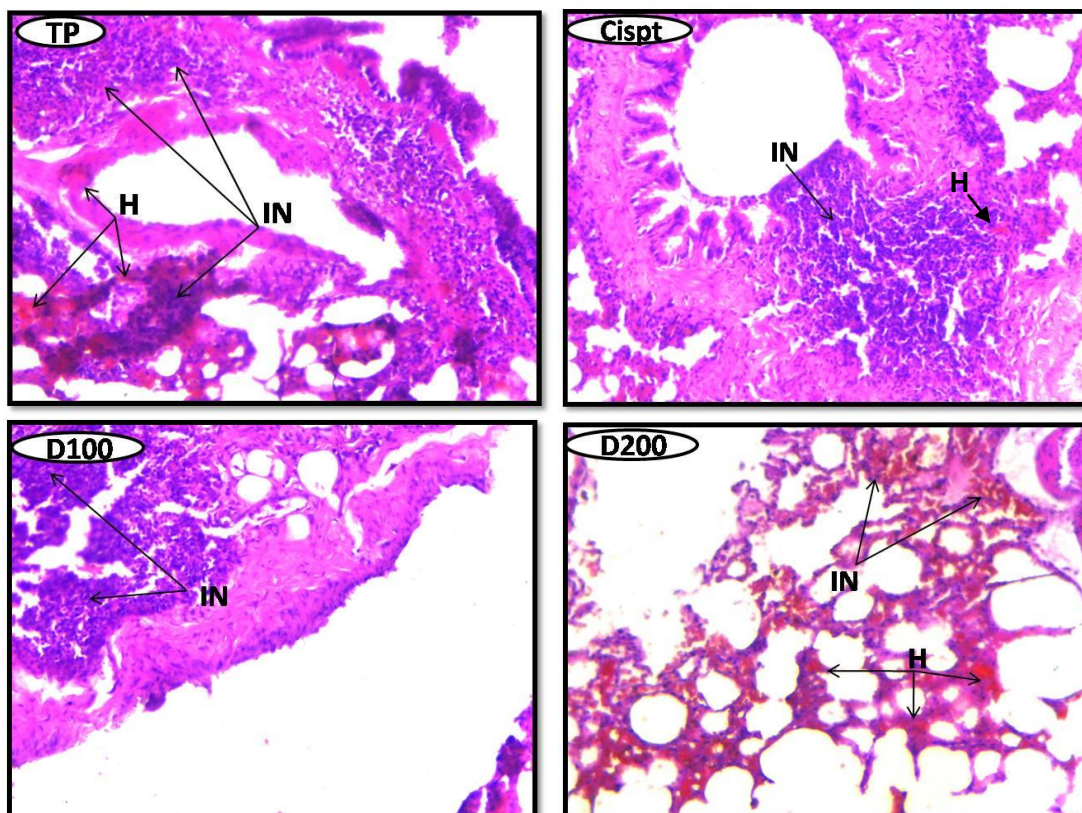


Figure 50: Observation microscopique d'une coupe histologique du poumon chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)

B: Poumon , **AP:** Alvéoles pulmonaires, **Cps:** Capillaires sanguins pulmonaires , **IN :** inflammation, **H:** hémorragie.

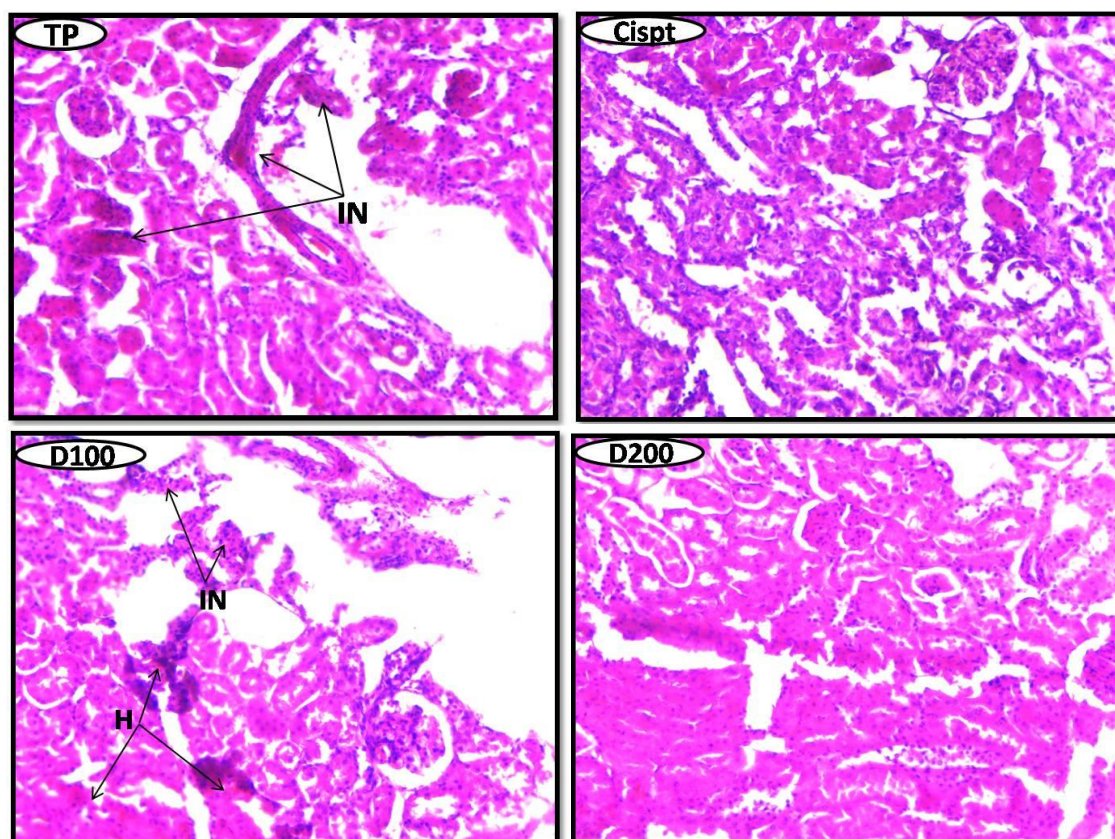


Figure 51: Observation microscopique d'une coupe histologique du rein chez les rats de différents lots (x40) (Photos originales, 2018)

IN : inflammation, H: hémorragie.

II.2. Discussion

Selon Agbogidi (2010) les études ethnobotaniques apparaissent comme une bonne approche pour comprendre dans une région donnée, les utilisations ainsi que les perceptions socioculturelles et économiques des ressources végétales par les populations locales.

Dans cette optique, une enquête ethnobotanique sur la plante médicinale *Ephedra alata alenda* a été entreprise dans la région d'El-oued et qui fut le thème de notre étude.

Le sexe féminin est dominant dans la région d'étude avec un pourcentage de 58% ce qui reflète la répartition des deux sexes dans notre société (nombre élevé du sexe féminin), 56,41%. Ces résultats confirment les résultats d'autres travaux ethnobotaniques réalisés à l'échelle nationale, qui ont montré que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel.

Les résultats obtenus montrent effectivement que les personnes âgées de 40 à 50 ans de 39,74 % ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres tranches d'âges. 100% des enquêtés connaissent *Ephedra alata alenda*. Donc une plante largement utilisée dans notre société. Ils utilisent la plante sèche 63,15% en fonction de sa disponibilité ce qui reflète leur efficacité.

La décoction reste la forme la plus utilisée 44,44%. Ces données indiquent que l'activité de principe active plus efficace dans ce mode d'utilisation.

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde surtout les pays en voie de développement, en absence d'un système médical moderne (Tabuti *et al.*, 2003)

L'*Ephedra* est traditionnellement utilisée en Chine pour l'asthme bronchique, le rhume, la grippe, la fièvre, la congestion nasale, l'œdème, les maux de tête, diaphorétique, antiallergique et antitussif,etc (Ling *et al.*, 1995; Abourashed *et al.*, 2003; Limberger *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2007; Soni *et al.*, 2004). Quant à son utilisation contre le cancer (24.24 %), « nouvelle propriété de la plante » ont déclaré quelques herboristes, et qu'elle est du à plusieurs recherches qui affirment que l'*Ephedra alata* à une activité anticancéreuse, mais rien n'est prouvé pour l'*Ephedra alata* de la région d'El Oued, alors que les recherches de Hyuga *et al* (2011), ont indiqué que les extraits de l'*éphedra herbicide* inhibe la croissance des cellules cancéreuses. En ce qui concerne le type de maladie soignée, 13.13% ont déclaré qu'elle soigne les inflammations d'estomac, certaines plantes sont utilisés comme traitement de rhume et de la fièvre, trouble d'estomac (Venderjagt *et al.*, 2002). Dans les traitements des maladies rénales (Aissaoui *et al.*, 2008), et plusieurs d'entre elles sont utilisées pour leurs

effets analgésique, antipyrétiques et anti inflammatoires (Rasekh *et al.*, 2001 ; Kanko *et al.*, 2004).

10.10% des enquêteurs ont déclaré qu'ils prescrivent l'*Ephédra alata* pour le diabète, ces résultats sont compatible avec l'étude de Kono (1985), qui déclare que l' *l'Ephédra* a réduit de manière significative le taux de glucose chez des souris Diabétiques normales et alloxanés Au Maroc, *l'Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (Ghourri *et al.*, 2013). En Egypte, *E. alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, antiasthmatique et agent astringent (Nawwar *et al.*, 1984). Selon l'enquête ethnobotanique de Ould El Hadj *et al.* (2003) en Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse.

Les résultats obtenus des rendements d'extraction après macération est de 8,21%, de matière sèche de la plante, ceux-ci concorde avec les travaux de Su *et al.*, (2006), qui déclare que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température, en effet, cette dernière induit la perturbation des cellules facilitant la pénétration de l'eau et la solubilisation des molécules , Ce ratio varie pour plusieurs conditions : l'emplacement de la récolte , zone climatique de la récolte et l'environnement de la plante (Atmani *et al.*, 2009 ; Ksouri *et al.*, 2008) .

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur les extraits aqueux de la partie aérienne d'*Ephédra alata* ont montré la présence de certains composés actifs, alcaloïdes, flavonoïdes, terpène, tanins , saponines et les sucres réducteurs dans l' extrait, alors que les stéroïdes sont absents . Ces résultats sont en accord avec la littérature (Amakura *et al.*, 1993 ; Hussein *et al.*, 1997 ; Nawwar, *et al.* 1984) . Les tanins sont responsables des propriétés hémostatiques (Asquith & Butler., 1986). Les alcaloïdes et des saponines ont une histoire dans les effets pharmacologiques pour leurs effets analgésiques et antispasmodiques (Njoku & OBI, 2009). Ainsi, les alcaloïdes jouent un rôle détoxifiant et un antihypertenseur (Awoyinka *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques sont bien connus comme des agents antioxydants et dirigé contre les radicaux libres associés aux dommages oxydatifs. La présence de ces composés, tels que des flavonoïdes, et des phénols dans l'extrait de *Ephedra alata alenda* susceptibles de donner crédibilité à son utilisation locale pour la gestion d'affection induit par le stress oxydatif.

De plus, le teneur en polyphénol était estimé à 57.59 mg EAG/g dans le macérât. Ce résultat est en accord avec la littérature (Taouzinet, 2017)

Les résultats quantitatifs des flavonoïdes, révèlent que sa teneur est plus importante dans notre extrait (30.60 ± 0.97 µg EQ/mg ES) et supérieur à celui trouvé par (Manallah, 2012) Alors que ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par (Touaibia *et al* 2014 ; Ahrizat & Sobti, 2017).

Cette variabilité est due à plusieurs facteurs : les conditions de séchage (Couto *et al.*, 2012), d'extraction en terme de méthode, temps, température, granulométrie, solvant, nombre d'étapes d'extraction, l'expression des résultats, l'état et la provenance géographique (Luthria, 2008 ; Kahouli, 2010 ; Rodriguez *et al.*, 2012)

Concernant l'activité antioxydante, diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturelles à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certains nombre de paramètres: la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (Mohamdi, 2013). L'évaluation de l'activité antioxydant s'est portée sur l'application de test de DPPH par méthode UV-Vis et la voltamétrie cyclique pour le test de scavenging de radical superoxyde anion.

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres (Bougandoura, 2011) ; celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi *et al.*, 2008). Concernant notre résultats , la vitamine C présente un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à nos extraits. De toute façon, selon Moure *et al.* (2001), les antioxydants naturels indiquent souvent un pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques. Aussi , nos résultats indiquent que le macérât présente une activité de piégeage du radical libre DPPH avec un IC₅₀ de 0.049 mg/ml.

Dans une étude similaire sur l'extrait de l'*Ephédra procréra* (même genre de notre espèce végétale), les auteurs ont signalé un taux d'IC₅₀ de l'ordre de 0.056 mg/ml (Dehkordi *et al.*, 2015), un taux très proche comparé de la notre. L'IC₅₀ de test antioxydant DPPH de l'espèce *Ephedra Alata* rapportée par les travaux de Gouasmia & Zoubiri (2017) est incluse entre 0.901 et 1.141 mg/ml; un taux plus élevé . Cette variation Peut expliquer que l'activité

antioxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante (Burda & Oleszek, 2001).

L'activité antioxydant est aussi confirmée par méthode électrochimique, d'ailleurs, les résultats de test $O^2\bullet-$ montrent une efficacité très importante dans l'inhibition du radical superoxyde anion par notre extrait. On peut dire qu'il est important que celle de l'acide ascorbique.

L'augmentation de la concentration en substrat antioxydant (extrait aqueux et antioxydants standards) conduit à une diminution de courant de pic anodique de $O^2\bullet-$ (Ipa), cette diminution de l'intensité du courant anodique de $O^2\bullet-$ suggère que l'extrait réagit de manière irréversible avec $O^2\bullet-$. Une série de valeurs de Ip est déterminée à partir des voltammogrammes cycliques enregistrés en augmentant les concentrations d'extrait étudiés.

Concernant l'activité antibactérienne les résultats montrent que l'extrait d'*E. alata* alanda n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsilla pneumonie*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*), Ces résultats sont en accord avec (Ghanem & El-Magly, 2008). Et d'après l'étude de (zarroque, 2015) l'absence du pouvoir antibactérien des extraits aqueux d'*E. alata* des pourrait s'expliquer par l'absence des principes actifs doués d'une activité antibactérienne. La membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries à GRAM négatif semble constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (Kebili, 2016).

In vivo, La métribuzine est l'herbicide le plus fréquemment appliqué dans les cultures de pommes de terre dans divers pays (Rathore & Nollet, 2012). Elle est capable d'induire un stress oxydatif intracellulaire (Medjdoub *et al.*, 2011); La métribuzine expose des différents effets nocifs, forte exposition ou autre répétée peut provoquer des modifications des enzymes hépatiques, le goitre, et peut affecter la fonction thyroïdienne (Pohanish., 2012). ainsi que cisplatine qui est un composé organométallique anticancéreux et qui interagit avec l'ADN (Nuhrich, 2015).

L'avantage des modèles *in vivo* est d'intégrer la totalité des effets potentiels d'un perturbateur donné et de ses métabolites dans un contexte physiologique. Les modèles de souris présentent l'avantage d'être plus proches de l'homme.

Parmi les paramètres étudiés du poids relatif des organes; qui est généralement un indicateur potentiel des effets de l'alimentation de l'organisme et le foie est l'organe de

détoxification le plus important du corps (Pooja *et al.*, 2016). L'augmentation remarquable du foie chez le groupe exposée au métribuzine (TP) peut être attribuée à l'augmentation de la circulation en raison des demandes accrues pour la détoxification des composés toxiques (Zama *et al.*, 2005). En outre, il désigne l'augmentation de la masse cellulaire ou de la densité cellulaire (Abston *et al.*, 1976).

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme pour maintenir le niveau d'énergie et la stabilité structurelle du corps. C'est également un site de biotransformation par lequel un composé toxique a été transformé sous une forme moins nuisible en une toxicité réduite. Toute diminution du poids du foie est considérée comme un paramètre de risque sensible, conduisant à une réduction de la toxicité (Hodgson, 2004; Guyton & Hall, 2006 ; Gathwan *et al.*, 2006), c'est ce qui clarifie la diminution de poids relative de foie pour les lots traités par 100mg/kg et 200mg/kg d'extrait aqueux d'*Ephedra alata*, aussi par le cisplatine. Ce ci est en accord avec l'étude de Gouasmia & Zoubiri (2017).

Aussi, l'étude de Boudebba & Boutera (2017) n'indique aucune variation significative de poids relatif de poumon de la rate. D'autre part, on peut expliquer l'augmentation du poids relatif du cœur de lot TP par l'effet de stress oxydative d'oxyder les protéines et les lipides de cœur (Dennis *et al.*, 2013).

Les enzymes sériques TGO, TGP, PAL sont des enzymes synthétisées au niveau du cytoplasme de la cellule et déchargées dans la circulation en cas des cellules endommagées (Singh *et al.*, 1998, Ozturk *et al.*, 2009). Nos résultats aussi montrent qu'il y a une augmentation de l'activité des transaminases (TGO, TGP) chez les lots exposés au métribuzine par rapport au lot témoin; Ces résultats sont en accord avec l'étude de Merzouk *et al.*, 2013. Une activité antihépatotoxique certaine de l'extrait brut de la plante étudiée et de cisplatine, puisque chez les animaux ayant reçus les doses d'extrait, il y a moins de TGP (et TGO uniquement pour lot de cisplatine) dans le sang par rapport aux animaux non traités. L'augmentation de l'activité de PAL chez les rattes provoqué par le métribuzine est en accord avec les conclusions rapportées par El-Fakharany *et al.* (2011).

En revanche, nos résultats montrent que le traitement des rattes par la dose 100mg/kg d'extrait végétale et par le Cisplatine a restaurée significativement l'activité enzymatique de PAL par rapport aux rattes exposées au pesticide, ce qui signifie que ces molécules inhibent les dommages hépatiques causés par le métribuzine. Ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydant (Boudebba & Boutera, 2017).

Concernant les marqueurs de la fonction rénale, notre étude montre qu'il y a une augmentation de la concentration sérique d'urée, chez le groupe exposé au métribuzine et de groupe traités par 100 mg/kg d'extrait aqueux. L'urée est la principale forme d'élimination des déchets azotés du catabolisme protéique chez l'homme, formée dans le foie à partir de l'ammoniac (produit par la désamination des acides aminés) (Kubab *et al.*, 2015). D'autre part, l'augmentation de la concentration de l'urée est probablement associée à une augmentation de la dégradation des protéines (Almeida *et al.*, 2012). La surcharge en fer peut provoquer un stress oxydative qui peut affecter à la fois les cellules rénales endothéliales et épithéliales conduisant à une dysfonction rénale (Beggat & Korti, 2016). Ainsi La créatinine est un métabolite de la créatine, qui dans le muscle squelettique est phosphorylée en créatine-phosphate, un composé riche en énergie libre (Bossuyt & Boeynaems, 2001). Un taux élevé de ces produits dans le sang, peut être traduit par d'un dysfonctionnement rénal du a la présence d'une néphropathie caractérisée par une réduction de la filtration glomérulaire (El-Nekeety *et al.* 2009).

Les résultats de notre étude présentent ainsi une augmentation de la glycémie chez les groupes traités par la métribuzine. Plusieurs études qui ont montré, quand un organisme est exposé à des substances toxiques, réactions émotionnelles dans le système limbique actif l'hypothalamus pour produire la corticolibérine (CRH). Ce dernier stimule l'hypophyse pour libérer l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui est un activateur de glandes surrénales pour la production et la sécrétion de cortisol dans le sang (Pourramzanzidesaraei *et al.*, 2013). Le cortisol a de nombreuses actions dont certaines conduisent à l'élévation de la glycémie (Jacotot & Campillo, 2003). Ce qui expliquer le plus probable les résultats de glycémie.

Bien que l'étude de l'ethnobotanique prouve que *Ephedra alata* utilisée contre le diabète, Nos résultats prouvent le contraire ; La plante a provoqué une augmentation, de plus en plus remarquable de la glycémie sanguine, ceux ci pourrait expliquer pourquoi cette plante est déconseillée pour les diabétiques (Fetrow et Avila, 1999).

En effet, la surcharge en fer est associée à la production de radicaux libres. Par conséquent, ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN, les protéines, les polysaccharides et les lipides *in vivo* (Kadiiska *et al.*, 1995). A l'état de santé, il existe un mécanisme de défense efficace pour empêcher et neutraliser les dommages induits par les radicaux libres. Ce mécanisme est assuré par un ensemble d'enzymes antioxydants endogènes tels que : MDA, GSH, et catalase. Ces enzymes constituent une équipe mutuellement de support de la défense contre les espèces réactives oxygénées (Djahra, 2014).

Les résultats de la métribuzine sur les paramètres de stress oxydatif présentent une augmentation de la concentration de MDA tissulaire dans tous les organes étudiés, sauf le cœur qui montre une diminution non significative. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Chiali *et al.*, 2013 qui montre une augmentation de la concentration de MDA tissulaire chez des rats exposés à des faibles doses de la métribuzine (Chiali *et al.*, 2013). Par contre, nos résultats montrent une diminution de la concentration de MDA dans tous les organes étudiés chez les lots traités par l'extrait aqueux d'*E. Alata* et de cisplatine, ce qui justifie le traitement par la plante végétale et le cisplatine pourrait empêcher l'altération induite par la métribuzine, en jouant un rôle important dans la prévention des complications induites par la peroxydation lipidique.

Nos résultats indiquent aussi une diminution de la concentration de glutathion réduit (GSH) dans le lot TP. Le glutathion constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres (Ogeturka *et al.*, 2005). Il est le principal agent antioxydant non enzymatique intracellulaire (Jacob, 2007). Une fonction majeure de GSH est la détoxification et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Ces composés sont conjugués avec GSH soit spontanément, soit par voie enzymatique dans des réactions catalysées par la GSH-S-transférase (GSTs). Les conjugués formés sont généralement éliminés à partir de la cellule ou dans la bile, comme dans le cas des hépatocytes. Bien que la plupart des réactions de conjugaison GSH entraînent la détoxification du composé, de temps en temps le produit lui-même est hautement réactif (DeLeve & Kaplowitz, 1990). La conjugaison GSH consomme de manière irréversible le GSH intracellulaire, ce qui peut être expliqué par la diminution de la concentration tissulaire de GSH dans le foie. D'autre part, une restauration des activités des enzymes antioxydantes chez les rats intoxiqués par le pesticide après l'administration d'extrait végétal et de cisplatine a été observée, ce qui suggère l'effet protecteur de ces molécules contre les dommages oxydatifs induits par la métribuzine.

D'autre part, les résultats indiquent une augmentation hautement significative de l'activité de catalase dans tous les organes chez le groupe exposé à la métribuzine dans le foie et le poumon, et une augmentation très hautement significative dans les reins aussi, mais, il n'indique aucune variation significative dans le cœur par rapport au témoin.

La catalase est une enzyme détoxifiante H_2O_2 en la réduisant à l'eau et l'oxygène (Birben *et al.*, 2012). La dégradation de H_2O_2 par catalase est réalisée par l'intermédiaire de la conversion entre 2 conformations de catalase. La catalase se lie également au NADPH comme un équivalent réducteur pour empêcher l'inactivation oxydative de l'enzyme par H_2O_2 comme il

est réduit à l'eau (Davies, 2000). L'augmentation de l'activité de ces enzymes peut expliquer par la capacité de défense équipé par l'organisme (le système antioxydant) qui servent à contrebalancer l'effet des oxydants. Donc, on peut dire que dans le cas de stress, l'organisme induit une augmentation de l'activité des enzymes antioxydants pour réduire l'effet des oxydants (Birben *et al.*, 2012). Donc, la restauration des activités des enzymes antioxydants chez les rattes traités par l'extrait végétale et cisplatine a retour a l'effet protecteur de ces molécules contre les dommages oxydatifs induits par le métribuzine.

En général, et d'après les résultats des stress oxydatifs tissulaires suggèrent que chaque organe a un effet antioxydant spécifique (Begget & Korti ,2016), ce qui rend la gravité de l'attaque oxydative différente entre les organes, c'est pourquoi on trouve que la variation des antioxydants défère d'un organe à autre.

En fin, les analyses histologiques viennent confirmés les résultats précédentes. Cependant les altérations histologiques observées au niveau des hépatocytes chez les rats exposée au métribuzine sont caractérisées par l'apparition des zones de nécroses tumorale légères avec des infiltrats inflammatoires. En plus de l'inflammation, des hémorragie sont apparus au niveau de poumon; aussi des inflammations au niveau les reins. Ces résultats sont confirmés par les résultats des paramètres de stress. Au cours des phénomènes inflammatoires, il existe une libération de médiateurs dérivés de l'oxygène et de radicaux libres toxiques par les cellules phagocytaires (Gorochov & Papo, 2000). Cependant, le traitement par l'extrait aqueux d'*Ephedra alata* avec les deux doses (100, 200 mg/kg) et par le cisplatine au groupe exposé aux métribuzine a entraîné une amélioration de tissu hépatique en diminuent les inflammations, et la progression tumorale.



Conclusion générale



Conclusion générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires

Dans notre travail, nous avons étudié des activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de l'extrait aqueux d'*Ephedra Alata*. L'extrait a été préparé par macération de la partie arienne dans l'eau distillée.

In Vitro, La détermination de rendement en extraits bruts a montré une rentabilité importante de 8.21%. Les principaux résultats de l'analyse phytochimique de la plante *Ephedra Alata* montrent une composition riche et variée, la présence des polyphénols, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des Sucres réducteurs, tanins et saponine due à leur rôle important dans la plante, dont ils sont des produits considérés comme métabolites secondaires. Aussi on remarque l'absence de stéroïdes dans l'extrait de plante étudiée.

Les analyses spectrophotométriques effectuées ont montré que l'extrait aqueux contient des polyphénols totaux $57.59 \pm 1.43 \mu\text{g eq/mg ES}$ et des flavonoïdes $30.60 \pm 0.97 \mu\text{g eq/mg ES}$. L'UV-Vis montre une activité antioxydante puissante par le Test du piégeage du radical libre DPPH, donne une Valeur IC_{50} de 0.049 mg/ml, qui est une valeur très importants par rapport l'acide ascorbique (0.014 mg/ml).

Les résultats de l'activité antioxydante, par la technique de la voltampérométrie cyclique, montrent que l'extrait aqueux a une activité antioxydante totale importante comparé par l'acide gallique, Ainsi par la même méthode, le test de piégeage de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ montre une inhibition du radical $O_2^{\cdot -}$ très importante par l'extrait aqueux d' *Ephedra Alata*

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux étudiée n'a montré aucun effet antibactérien par rapport aux antibiotiques standards utilisés.

In Vivo, Le traitement par l'*Ephedra alata* à des rattes exposées au métribuzine a induit une importante restauration de certains paramètres biochimiques, ce qui montre l'effet protecteur de cette plante. La diminution de l'état de stress oxydatif induit par l'exposition à la métribuzine est presque similaire par les deux doses. Et enfin notre étude histologique a confirme les résultats obtenus aussi bien *in vitro* que *in vivo*.



Références bibliographique



1. Abdel Hakim, S., (2009). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique du gingembre. Mémoire de magister en biochimie et physiologie expérimentales. Université Ferhat Abbas, Sétif
2. Abdoun, Y., (2012). Contribution À L'extraction Des Huiles Essentielles De L'inule Visqueuse Algérienne Par Diverses Méthodes, Étude De Ses Propriétés Antimicrobiennes Et Antioxydantes". Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en génie des procédés . Université des Sciences Et De La Technologie Houari Boumediene.
3. Abourashed, E.A., El-Alfy, A.T., Khan ,I.A. & Walker, L., (2003). *Ephedra* in perspective—a current review. *Phytother. Res.*, Vol. 17, PP. 703-712.
4. Abston, P.A.,& Yarbrough, J.D., (1976). The in vivo effects of Mirex on soluble hepatic sqa enzymes in the rat. *Pesti. Biochem. Physiol.*, 6: 192-199.
5. Academic press. Incorporation. Chap.1, P.1.
6. Aïra, R., (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse pour le doctorat en Phytochimie . Université des Antilles et de la Guyane . les Amériques .
7. Alilou, H. (2012). Etude Phytochimique Et Antifongique De Deux Plantes Du Sud Du Maroc : *Asteriscus Graveolens* Subsp. *Olorus* (Schousb.) Greuter Et *Asteriscus Imbricatus* (Cav) Dc. Thèse De Docorat En Sciences. Université Ibn Zohr. Agadir, Maroc. 215p.
8. Alis, S., (2003). Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging. *Annale de RSNA*. vol. 229 (3) : 1-9.
9. Almeida, D.A.T., Braga, C.P., Novelli, E.L.B., & Fernandes, A.A.H. (2012). Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ induced rats treated with antioxidant vitamin. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55(4), 527-536.
10. 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.*, Vol. 44, N°1, pp. 425-428 .
11. Aref, M., & Heded ,M.. (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biochimie Appliquée . Université Echahid Hamma Lakhdar , El OUED. P20.

12. Azzi, M., (2016) .Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de *Lavandula multifida*. L. mémoire En vue de l'obtention du diplôme de master en microbiologie appliquée. Université de Tlemcen, Algérie .
13. Babadi, Y., (2013). Evaluation of Iron Oxide nanoparticles effects on tissue and Enzymes of Thyroid in Rats. *Annale de l'ISSN*. vol. 2 (7) : 1-3.
14. Barlow, S.M., (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson . B.J.F. *Food Antioxidants*. pp 253-307.
15. Barry, T.N., Manley, T.R. & Duncan, S.J. (1986). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British Journal of Nutrition*. p55, 123-37.
16. Beggat, K., & Korti, N., (2016) . Etude de l'effet toxique des nanoparticules de l'oxyde de fer et l'effet antidote du quercétine chez les lapins. Mémoire fin d'étude de Master Académique en biochimie appliquée . Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED. P104 .
17. Bellibcir, L., (2008). Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales . Memoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biodiversité et production végétale. UNIVERSITE
18. Berra, D., (2015). Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*. Master en génie chimique. Université Echahid Hamma Lakhdar El -oued. P74.
19. Bidie, A.P., N'guessan, B. B., Yapo, A. F., N'guessan, J. D. & Djaman, A. J. (2011). Article Original Activités Antioxydantes De Dix Plantes Medicinales De La Pharmacopée Ivoirienne. *Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: 1 – 11.
20. Boubakri, C., (2014). "Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques". Thèse en vue de l'obtention Du diplôme de Doctorat en Chimie . Université Mohamed Khider – Biskra. P176.
21. Boubakri, N., (2014). Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout . Mémoire de MASTER ACADEMIQUE en Biochimie Appliquée. Université KASDI MERBAH, Ouargla, Algérie P15 .
22. Boudjouref, M., (2011). Etude De L'Activité Antioxydante Et Antimicrobienne D'Extraits D'*artemisia Campestris* L. Thèse De Magister En Biochimie. Université

- Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. 99 P.
23. Boussahel, S., (2011). Etude Biochimique Et Histologique De L'effet De Quelques Extraits Des Plantes Toxiques Dans La Région De Sétif. Mémoire De Magister. Université Ferhat Abbes. Sétif. P 74.
 24. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Technologie & Document. Éditions médicales internationales. P. 978-2-7430-1188-8.
 25. Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3 ème Ed Tec&Doc. Paris.P 1504.
 26. Caveny, S., Charlet , D.A., Freitgg H., Maier,S. M. & Starratt A. N. (2001). New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). American Journal of Botany.Vol.88, N°7.PP. 1199–1208.
 27. Chinbo, M., Moutachakkir, M ., Addebous, A., El Khoudri, N., Chabaa , L. & Soraa . N., (2014).Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* dans un hôpital pédiatrique marocain: implications thérapeutiques. International Journal of nnovation and Scientific Research, Vol. 11, N°. 2, pp. 283-290.
 28. Christophe, P. & Christophe, S.(2011). Physiologie pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain . paris : Ed. spriner-verlag .
 29. Collin, S.& Creast, G., (2011). Polyphynol Et Procédé. 1ère Ed, Lavoisier: Paris.
 30. Croteau, R., Kutchan ,T.M.& Lewis ,N.G. (2000).Naturel Products(Secondary Metabolites).Biochemistry And Molecular Biologie Of Plants.1250-1318.
 31. Crozier, E. J. , Michael, E.J. & Morag , S. M. (1997). Quantitative Analysis Of Flavonoids By Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, Journal Of Chromatography A, 761 315-321.
 32. Dacosta, Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs : 669 réfeérences bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris.
 33. Dennis, B.A., Ergul, A., Gower, B.A., Allison, J.D., & Davis, C.L. (2013). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk in Overweight Children in an Exercise Intervention Program. Childhood Obesity, 9(1), 15-21. doi:10.1089/chi.2011.0092.
 34. Derbel, S., Touzard, B., Triki, M.A. & Chaieb ,M., (2010). Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata ssp. alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. Flora, Vol. 205, pp. 471–474.
 35. Djahra, A.B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante,

- antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L. these de doctorat en science .Universite Badji Mokhtar –Annaba . P18.
36. Djeffal, A., (2014). Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. Thèse En vue de l'obtention du doctorat 3ème cycle en Biochimie appliquée. université Badji Mokhtar-Annaba. P170.
 37. Djouadi, A., (2017). Impact de l'épinard (*Spinacia oleracea*), Omega3 et supplémentation en zinc sur l'hypothyroïdie induite par le fluor chez les rats Wistar. Mémoire de master Pour l'obtention d'un diplôme de Master académique en sciences biologiques en biochimie appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued. P15.
 38. Donatien, K., (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes -caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat en chimie organique, université de Bamako : p 24 -33.
 39. Effendi, L. &Yajun, Y., (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylatedflavonols in *Escherichia coli* .*Metab.Eng.*8:172-181.
 40. El Gharas, H., (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44(12): 2512-2518.
 41. Elalaoui, R., (2015). Contribution à la recherche d'effet hemolytique à partir d'extraits de *berberisvulgaris* L. mémoire de master. Université, Tlemcen . p 06 .
 42. El-Nekeety, A.A., El-Kady, A.A., Soliman, M.S., Hassan, N.S. & Abdel-Wahhab, M.A., (2009). Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9).
 43. Favier, A. E., Nève, J. & Faure, P. (1994). Trace Elements and Free Radicals in
 44. Favier, A., (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. p108-11.
 45. Favier, A., (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr* . Mémoire de Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p64: 390-396.
 46. Ferradji, A., (2011). Activités anti oxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacialentiscus*.

- UniversiteFerhatAbbas ,Setif. P25.
47. Gathwan, K. H., Karkhi, I. H. T. & Yaseen, A. K. (2013). Organophosphorus insecticides induced alterations in liver of male albino rat. Chemical Sci. Transactions 2: 95-98. genre *Zygophyllum*, mémoire de master, Université Kasdi Merbah Ourgla
 48. Gee, J.M.,& Johnson, I.T. (2001). Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. Current Medicinal Chemistry. 8 : 1-182.
 49. Ghedjati, N., (2014). Toxicité aigue et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium*. *Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie en Biochimie ; Toxicologie, Environnement et Santé* . Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie. P12 .
 50. Ghestim, A., Seguin ,E., Paris ,M. .& ORECCHIONI A.M., (2001). Le préparateur en Pharmacie. 2ème ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 275p.
 51. Gobbi, R. & Khebbaz, W., (2014). Traçabilité De L'identification Des Métabolites Secondaires Végétaux. *Memoire De Licence, Universite Kasdi Merbah D'ouargla,Algérie*.
 52. Gori, Z. & Tebbale, H. , (2014). Impact de différents modes de conservation sur les caractéristiques biochimiques de quelques Plantes spontanées médicinales. *Mémoire de master .Universite Kasdi Merbah, Ouargla .P19*.
 53. Gouasmia, S. & Zoubiri, F., (2017). Étude de l'effet antioxydant de l'espèce Ephédra alata alenda de la région d'El Oued chez les rats Wistar albinos exposés à la Deltaméthrine. *Mémoire de fin d'étude En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biochimie Appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED . P93*.
 54. Guignard J.L. (1996). Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, P160.
 55. Guignard, J. L. (2000). Biochimie végétale. 2ème édition .Edition Dunod, Paris, pp 198-207.
 56. Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology, 9th Ed., Prism Book (Pvt) Ltd., Bangalore, India. XLIII, 1148.
 57. Hagerman, A. E. & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. J. Biol.Chem.; 256: 4494-4497.
 58. Hammoudi, R., (2015) .Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional Algérien. *Thèse de doctorat. "Sciences biologiques "*. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 147 p.

59. Harborne, J. B. & Williams , C. A. (2000) . advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 : 481-504.
60. Harrar, A., (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.. Mémoire Pour obtenir le diplôme de Magister en Biochimie et physiologie expérimentale . Université Ferhat Abbas – Sétif , Algérie
61. Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. p68, 2831–2846.
62. Hellali, Z., (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
63. Hidayat, R., & Fatma wati., (2016). Anti-cancer activity of *Aquilaria malacensis* leaves on human cervical cancer cells. *European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research*, 3(1), 46-49.
64. Hodgson, E. A., (2004). Textbook of modern Toxicol. pp.203-211. John Wiley and Sons, Inc, New Jersey.
65. Jacotot, B. & Campillo B., (2003) . Nutrition humaine. Ed. Elsevier Masson, Paris. 311p.
66. Kebbab R., (2014). Etude de pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété *chamal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Mémoire en vu de l'obtention du diplôme de magister en biochimie appliquée aux bio-industries. Université Mouloud Mammeri de tizi-ouzou.
67. Keerthi, M ., Prasanna , J., Aruna, M . & Rao, N., (2014). Review on polyphenols as nature's gift world. *Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 3 (4): 445-455.
68. Krief, S ., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Museum *national d'histoire naturelle - MNHN PARIS.
69. Kubab, N., Hakawati, I.& Alajati ,K . S., (2015) . Guide des examens biologiques. Ed: 6. Initiatives Sante, Malakoff. 792p .
70. Laamri F. & Mostefaoui C., (2017). Contribution à l'étude de quelques paramètres biochimiques et biologiques (antioxydante et anti bactérienne) de *Oudneya africana* R

- de la région de Ghardaïa. MEMOIRE DE FIN D'ETUDE En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biochimie Appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED.
71. Laraoui, H., (2007). Etude Phytochimique L'Extrait Chloroformique de *Bupleurum Atlanticum* Docteur de l'université Louis pasteur (Chimie Organique, UV El Hadj Lakhdar Batna).
 72. Larwence, A., Hammoda, F., Salah, A., Abada, S. & Oucha, N. Ñ. (1984). Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.* PP 533-543.
 73. Lowy, F. D., (1998) .*Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 339, N° 8, pp. 520-532.
 74. Lucienne, B.B., (1958). Les alcaloïdes dans les plantes, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 105:5-6, 266-291.
 75. Lugasi, A., Hovari, J., Sagi k., & Biro, L., (2003). The Role Of Antioxidant Phytonutrients In The Prevention Of Diseases. *J.Acta.Biologica. Szegediensis.* pp119-125.
 76. Makkar, H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, p49, 241-256.
 77. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C. R. & Jimenez, L., (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* PP 727-747.
 78. Mansor, S., (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L , *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboides*- Etude in vivo .Université, Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. P19.
 79. Martínez. C. M., (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, Vol. 77, pp: 147-161.
 80. Medjdoub, A., (2013). Evaluation des effets métaboliques d'un gavage par les pesticides (Mancozèbe, Métribuzine) chez le rat Wistar. Thèse doctorat Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 195p.
 81. Merghem, R., (2009). *Eléments De Biochimie Végétale* (16). Ed, Bahaeddine. Algérie. Documentation. Paris: Lavoisier. P171 .

82. Merzouk, H., Chiali, F.Z., Merzouk, S.A., Medjoub, A.& Narce, M ., (2013). Chronic low level Metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (106) .pp 38-44.
83. Messai L. , (2011). Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (*artemisia herba alba*). these Pour l'obtention de Doctorat des sciences En Chimie Organique non publié . Universite mentouri constantinen ,p :102.
84. Minisci, F., (1997). *Free Radicals in Biology and Environment*. Springer Science
85. Mohammedi, Z., (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat." *Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses*". Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen, p.52.
86. Muanda, F.,(2010). Identification de polyphénols , evaluation de leur activite antioxydante et etude de leur proprietes biologiques. Thèse de doctorat en chimie organique .Université Paul Verlaine-Metz : 55p.
87. Okba, O. E. & Rouissi ,R .Z . (2015). etude de l'effet toxique des nanoparticules de l'oxyde de fer sur quelques paramètres biologiques chez les lapins mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique Filière : Sciences Biologiques Spécialité , Biochimie Appliquée.
88. *Oxidative Diseases*, American Oil Chemists' Society Press, USA. P.1-3.
89. Ozenda, P., (1991). Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662 p.
90. Ozturk, I.C., Ozturk, F., Gul, M ., Ates, B.,& Cetin, A., (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*. 27: 309–315.
91. Packer, L. & Glazer, A. N. (1990). *Methods in Enzymology Volume 186,Oxygen*
92. Paris, M. H .(1981). Abrégé de matière médicinale. Pharmacognosie. Tome 1. Masson paris.
93. Paterson, D. L., (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*. Vol. 34, N°. 5, pp. 25-33.
94. Pekking, A., Picand, B., Hacene, K., Lokie F.& Guerin ,P., (1987) . Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF. Vol. (6) .pp 512-513.

95. Pénicaud, C., (2009). Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.
96. Perry, J.J., Staley ,J.T.& Lory S., (2004) . Microbiologie. Cours et questions de révision. Dunod. 912 p.
97. Pohanish, R. P.(2012) Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens. Volume 1. Ed: 6. Elsevier, USA. 3040p.
98. Pooja, H.S.S & Kaur S., (2016) .Studies on the liver histology and biochemistry due to pesticide exposure in rats inhabiting vegetable crop fields . International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture (IJAPSA) . e-ISSN: 2394-5532, p-ISSN: 2394-823X .
99. Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., & Gheesling,L.L.,(2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Rev Microbiol, 155: 568-570.
100. Pourramza , E. M., Mohammadi., L .M., Sahli, M., Farokhrouz, M ., Zamani, A. & Abbasianbbasi F., (2013). Determination of the Acute Toxicity of Pretilachlor on Liver and Gill Issues as well as Glucose and Cortisol Levels in Fingerling Grass Carps (*Ctenopharyngodon idella*). Journal of Fisheries and Aquatic Science. Vol. (8): 721-726.
101. Rathore, H.S.& Nollet, M .L .(2012) .Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution. Ed. CRC Press, Florida. 659p.
102. Raven ,H .,Evert, R .F. & Eichhom ,S.E. (2000). Biologie Végétale(6^é Ed).(B.Jules., Et M Charles, Trad.).Paris.
103. Roux, D. & Catier, O., (2007). Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Wolters Kluwer France Edition, p 74 .
104. Scalbert, A & Williamson, G., (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal of Nutrition 130, 2073-2085 .
105. Scalbert, A., Canach, C., Morand, C. & Rémésy, C., (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45,pp 287–306.
106. Servili, M. & Montedoro, G., (2002). Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. European Journal of Lipid Science and Technology. PP. 104, 602–613.
107. Séverine, Brunet., (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des

- ruminants. En vue de l'obtention du Doctorat, spécialité : Pathologie et Nutrition. Université De Toulouse. 246p.
108. Singh ,B., Saxena, A.K., Chandan B.K., Anand, K.K., Suri O.P., SuriSatti K.A., & SuriSatti, N.K. (1998). Hepatoprotective activity of verbenalin on experimental liver damage in rodents. *Fitoterapia*. 69: 134–140.
 109. Stobiecki, M. A., Skirycz, L., Kerhoas, P., Kachlicki, D., Muth, J.E. & Mueller, B., (2006). Roeber, Profiling Of Phenolic Glycosidic Conjugates In Leaves Of *Arabidopsis Thaliana* Using Lc/Ms, *Metabolomics*.197-219.
 110. Sylvia, S.M. (2010). *Biologie humaine*. Bruxelles: Ed. De Boeck & Larcier s.a.
 111. Tindall, B. J., Grimont ,P. A. D., Garrity, G. M. & . Euze´ , J. P.(2005) . Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 521–524 .
 112. Ueli, A., Cecillia, M. &Donald, A., (1991). Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Seeds Enhance Growth Rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*. vol. 95, N° 3, PP. 797-803.
 113. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol ,J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. &Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol. 39, pp. 44-84.
 114. Verhoeven, M. E., Bovy ,A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S. & DeVos C. H. R . (2006). Free Radicals, Metals And Antioxidants In Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chem. Biol Interact*, 160: 1 –4.
 115. Vermerris, W. & Nicholson, R., (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Ed, Springer:U.S.A P 276 .
 116. Zaika, L.L., (1988). Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination. *Journal of Food Safety* Vol. 9, N°2, pp: 97-118. In Pibiri M., 2006- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huil esessentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne. 161p .
 117. Zama, D., Meraihi, Z ., Boubaekri, N., Amrani ,A., Tebibel ,S.& Balli ,N., (2005). Assessment of the changes in some diagnostics enzymes and other parameters in wistar albino rats treated with pesticides during gestation. *Sciences & Technologie C – N°23*, pp. 51-56.
 118. Zeghad, N., (2008). *Etude Du Contenu Polyphénolique De Deux Plantes Médicinales D'intérêt Economique (Thymus Vulgaris, Rosmarinus Officinalis) Et*

Evaluation De Leur Activité Antibactérienne. Thèse Magister : Biotechnologie Végétale. Umc : Constantine, 130p

119. Site internet1 ([http ://www .google.com/maps/](http://www.google.com/maps/)).

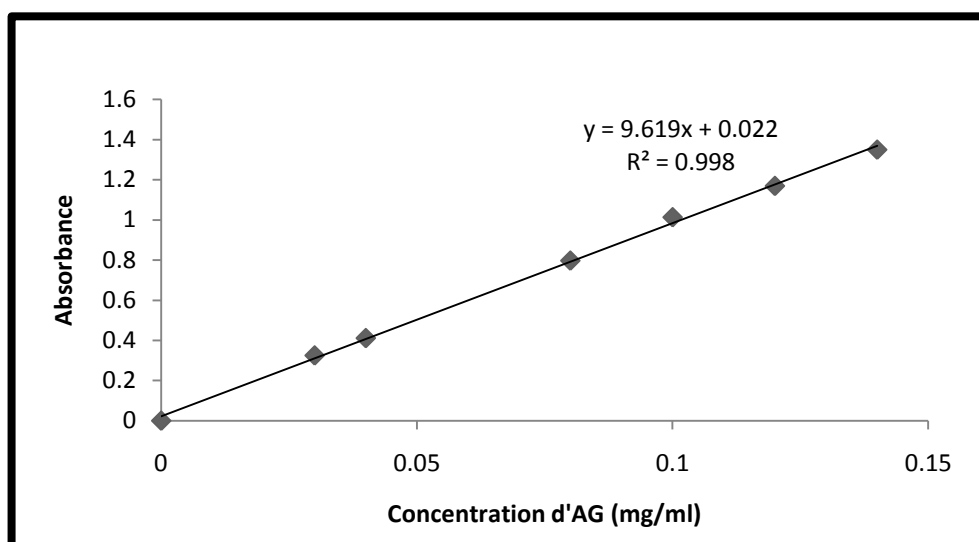


Annexes

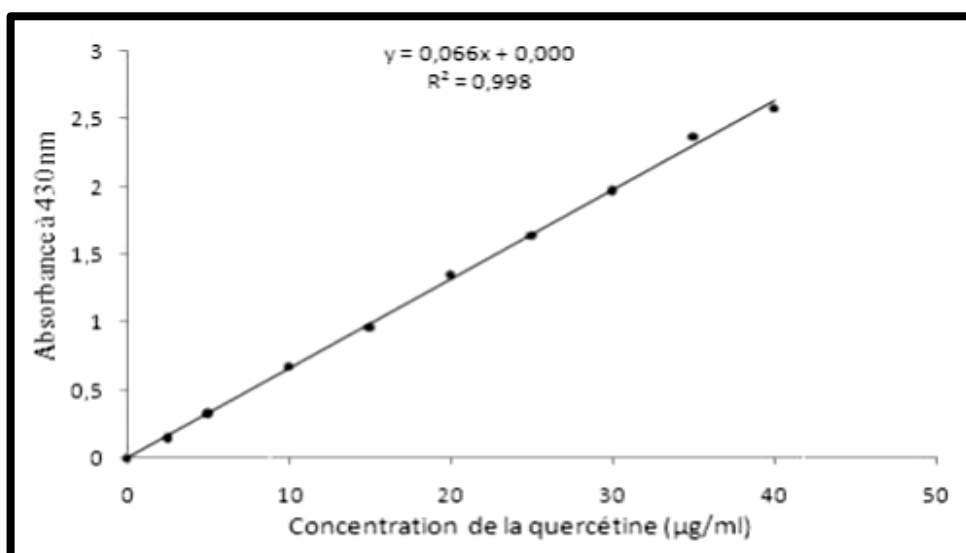


ANNEXE 1: Liste des matériels utilise dans notre travaille

Produits et réactifs	2,2'- diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH) ; 5,5'dithiodis-2- nitrobenzoïque (DTNB) ; acétate de sodium ;acide ascorbique ; Acide ascorbique C ₆ H ₈ O ₆ (99%) ; acide dithio-bis2-nitrobenzoïque (DTNB);acide galique ;Acide Gallique C ₇ H ₅ O ₆ (99%) ; acide gallique ; acide phosphorique (H ₃ PO ₄) ; acide alicylique ; butylhyroxtoluene (BHT) ; acide salicylique ; acide salicylique ; acide sulfurique (H ₂ SO ₄) ; Acide thiobarbiturique (TBA) ;acide thiobarbiturique (TBA) ; acide trichloroacétique (TCA) ; acide trichloroacétique (TCA) ; AlCl ₃ ; alloxane ;ammoniac ; Antiboitique (Gentamicine 120µg/disque) ;bleu de comassie ;bleu de Coomassie ; Butylhydroxytoluène (BHT) ; carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) ; chlorure d'hydrogène (HCL); Cisplatine ;diméthyle sulfoxyde (DMSO) ; Eau distillée ; eau oxygéné (H ₂ O ₂) ;FeCl ₃ ;acide acétique ;Folin Ciocolteu ; gélatine ; Gélose nutritive ; glutathion réduit (GSH) ; GSH, 1-chloro- 2,4-dinitrobenzène (CDNB) ; magnésium ; méthanol ;Métribuzine ; Milieu de culture type Hinton ;peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) ; Quercétine d'hydraté C ₁₅ H ₁₀ O ₇ (97%) ; rutine ; sérum albumine bovin (SBA) ; sérum bovin albumine (BSA) ; tampon phosphate (KH ₂ PO ₄) ; TPTZ (tripyridyltriazine) ; tris ; NaCl ; Tris, chlorure de sodium (NaCl) ;
Matériels de laboratoire	Autoclave de type Pbinternational; Bain marie; Balance analytique; Balance numérique; Centrifugeuse Etuve de type Lab tech model LIB-060 M; Evaporateur rotatif de type Rotavapor BUCHI Heating bath R-491; pHmètre 210 MeterLAB;UV spectrophotomètre de type UV-1240 SHIMADZU.
Verreries	Agitateur; Ans de platine; Bain ultrasonique; Bec Benzène; Béchers; Boites de pétrie; coton; Entonnoir; Entonnoir; Eprouvettes graduées; Erlenmeyers ; Gants; Les cuves; Papier Filtre; Pipette et micropipette (de 1000µl, de 100µl et de 10µl); Réfrigérateur; Rota vapeur; Seringue (5ml); Spectrophotométrie UV; Tubes à essais; Tubes d'analyses (tubes héparine) ;



Annexe 20: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.



Annexe 21: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes .



Université Echahid Hama Lakhdar El Oued

Faculté de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Pétrochimie

Et

Laboratoire de Valorisation Technologie des Ressources Sahariennes



Journée d'étude sur la chimie verte et substances bioactives

EL OUED : 17 Avril 2018

Attestation de Participation

Le président de la journée d'étude sur la chimie verte et substances bioactives atteste que (Mme/Melle) : **NESBA Safa.**

A participé avec une communication affichée intitulée : **Etude de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'EPHEDRA Alata.**

Co-auteur : HENKA F., ADAIKA A. et MEDILA I.

Directrice de la journée d'étude

د. بوعبدالله شرف

