الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
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

Contribution à l'étude phytochimique et biochimique (*In vitro* et *In vivo*) des cônes femelles d'*Ephedra alata* DC. de la région d'Oued Souf

Présentés Par :
M^{elle} HOUBA Zoubeida
M^{elle} HIMEUR Hadjer

Devant le jury composé de :

Président : Mr MEDJOUR Abdelhak	M.A.A	Université d'El Oued.
Examinatrice : M^{elle} MEHELLOU Zineb	M.A.B	Université d'El Oued.
Promoteur : Dr CHOUIKH Atef	M.C.A	Université d'El Oued

Année universitaire 2018/2019

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant ,qui m'a tracé le chemin de ma vie , j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux ,l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ***ma mère*** *qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude ,pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance ,courage et sécurité.*

A mon ***cher père*** *qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études ,pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

A mes chères sœurs Siham; Hayet ; Ouarda ;Kenza; Nachoia .

A mes chers frères Hicham ; Djamel Eddine et sa femme Radia .

*A ma nièce et à mon neveu Miral * Tayeb*

A mes très chère amis : Amriya ; Riham ; Sara ; Saida

A ma famille HOUBA et ADAIKA

A mon binome « Hadjer » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail .

A mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire en particulier monsieur Bouali Noureddine et madame Bouras Biya .

A tous mes collègues de la promotion 2019 de Biochimie Appliqué.

Je dédie ce mémoire

Zoubeida

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Avant tout je remercie Dieu tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guide mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

*A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse «**ma chère Mère**»*

A celui qui a fait des grands efforts pour mon bonheur

*A celui qui m'a orienté et m'a pris les secrets de la vie « **mon cher Père** »*

Je suis reconnaissant de leur soutien tout au long de mes études, Je souhaite que Dieu leur octroie une longue vie et qu'ils trouvent dans ce modeste travail le témoignage de ma reconnaissance et toutes mes affections.

A mon cher frère "Zakaria"

A mes chères sœurs "Safa", "Meriem ", "Serine", "Khadija "

A ma cher oncle DR : Abdelmadjid

A tous les oncles et tantes

A mon binôme « Zoubeida» qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail .

A toutes mes amies pour leurs encouragements

A tous la promotion 2019 De la 2ème master biochimie applique.

A tous ceux m'ont aidé de prêt ou de loin.

Hadjer

Remerciements

C'est avec un réel plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant pour m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Nous tenons tout d'abord à remercier : ***Dr CHOUIKH ATEF****, qui a encadré et dirigé ce travail depuis les premiers instants. Nous la remercions pour son sérieux et ses efforts Afin de nous aider, de nous conseiller et de nous orienter.*

Nous exprimons nos vifs remerciements à ***Mr MEDJOUR ABDELHAK*** *pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

Aussi, nous tenons à exprimer également notre profonde reconnaissance à ***M^{elle} MEHELLOU ZINEB*** *d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à lui exprimer notre grand respect.*

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail ont particulier ***M^{elle} ALIA .F et ADJEL. H,GURISSI .CH, CHENGEL .A, M^{me} BOURAS.B, Mr TLILI .L, AMRIOUI. N***

A qui nous ont beaucoup aidé et soutenu pendant notre travail.

Nous tenons à remercier profondément à tout l'ensemble des membres du laboratoire de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université d'El-Oued particulièrement ***M^{elle} GOUBI .S et Mr LAIB.I***

Un grande merci à ***Dr .FERIANI Anouar***

Unité de Recherche Biochimie et Génétique de Macromolécules ,faculté de sciences Gafsa, Tunisie

Pour leurs aides afin d'obtenir des bons résultats.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences de la nature et la vie

RESUME

Afin de valoriser les plantes médicinales désert, on a été menée ce travail pour faire une étude phytochimique et biochimique a travers une étude *in vivo* et *in vitro* de les cônes femelles de la plante *Ephédra alata* qu'il est développe dans la zone d'Oued-Souf.

In vitro les résultats de dosage des polyphénols et flavonoïdes sont respectivement (178.744 ±83.297mg ЄAG/g Extrait et 26.101±1.558 mg ЄQu/g Extrait. L'activité antioxydant de nos extraits a été évaluée par les tests de DPPH•, réduction de Fer et hémolyse. Les tanins qui sont montré une capacité d'inhibition mieux à les autres extraits d'une valeur (IC_{50}= 14.52µg/ml), et une activité réductrice du fer la plus élevée ,et le test de hémolyse montré que les extraits bruts donné la meilleure protection de érythrocytes (22.27% d'érythrocytes dissous dans la concentration 1 mg/ml), donc les résultats peuvent être dits que l'activité antioxydant des extraits des cônes femelles de la plante *Ephédra alata* faible comparaison aux acide ascorbique. L'analyse qualitative des extraits par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) a montré les différences de concentration et de qualité de composés phénoliques, par exemple : l'acide chloroginique , acide p-coumarique et quercitine.

In vivo il s'agit deux études expérimentales sur 48 rats mâles de la souche Wistar .Le premier étude pour évaluation de l'effet protecteur suite à une hyperlipidémie provoquée par Triton X-100, à partir de l'analyse de nos résultats, on observe des changements notables dans les paramètres biochimique et lipidiques étudiés, aussi pour les paramètres de stress oxydatif chez le lot exposé au Triton X-100. En revanche, le traitement par l'extrait méthanolique de la plante *Ephédra alata* donne des résultats similaires au lots témoins en normalisant paramètres biochimiques étudiés et en diminuant les paramètres lipidiques et l'état de stress. L'étude histologique a confirmé les résultats biochimiques.

Le pouvoir analgésique c'est la deuxièmes étude in vivo, d'après ces résultats, on observe l'extrait méthanolique *d'Ephédra alata* induit une diminution significative des crampes abdominales par rapport au groupe témoins et les valeurs obtenues sont très proches de celles obtenues avec l'anti-inflammatoire standard (indométacine). Ce résultat confirmé l'effet bénéfique de ce plante médicinale .

Les Mots Clé: *Ephédra alata,* activité antioxydants, paramètres biochimiques, paramètres lipidiques, stress oxydatif, Triton X-100, pouvoir analgésique, Indométacine.

الملخص

قصد تثمين النباتات الطبية الصحراوية، أُجري هذه البحث والذي يهدف إلى دراسة فيتوكيمائية وبيوكيميائية من خلال دراسة مخبرية (*in vitro*) وحيوية (*in vivo*) للمخاريط الأنثوية لنبات العلندة *Ephédra alata* النامي في منطقة وادي سوف.

مخبريا (*in vitro*) أظهرت نتائج التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات للمستخلص الميثانولي الخام قيما معتبرة قدرت بـ 83.297± 178.744 ملغ مكافئ من حمض الغاليك/غ من المستخلص و 1.558±26.101 ملغ مكافئ من الكرستين/غ من المستخلص على التوالي، بينما في النشاطية المضادة للأكسدة كان لمستخلص التانينات أحسن تأثير تثبيطي مع جذر الـ DPPH إذ قدرت قيمة IC_{50} بـ 14.52ميكروغرام/مل، وكذا في إختبار القدرة الإرجاعية للحديد غير أن المستخلص الميثانولي أظهر أفضل حماية لكريات الدم الحمراء في إختبار انحلال كريات الدم الحمراء بنسبة إنحلال قدرت بـ 22.27% عند التركيز 1ملغ/مل؛ أما التحليل النوعي للمستخلص الميثانولي الخام باستعمال الكرماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC والذي سمح بفصل 63 مركب فينولي تم التعرف على ثلاثة منها بتراكيز متباينة وهي حمض الكلوروجنيك، حمض ب-كوماريك والكرستين.

حيويا (*in vivo*) أجرينا إختبارين على 48 ذكر من الجرذان البيضاء، الإختبار الأول كان لغرض تقييم التأثير الوقائي بعد فرط الدهون الناجمة عن المعاملة بـTriton X-100 ومن تحليل النتائج لاحظنا تغييرات معتبرة في معايير الدهون، الخصائص البيوكيمائية ومعايير الإجهاد التأكسدي في المجموعة المعالجة بـTriton X-100 ، من ناحية أخرى العلاج بواسطة المستخلص النباتي أعطى نتائج مماثلة للنتائج المسجلة عند المجموعة الشاهد من خلال تعديل المعايير البيوكيميائية، الإجهاد التأكسدي و خفض معايير الدهون، وهذا كله أثبتته المقاطع النسيجية للكبد والتي كانت موافقة للنتائج البيوكيميائية .

أما الإختبار الثاني فقد خصص لتقدير النشاطية المضادة للألم والذي أظهرت نتائجه أن لمستخلص النبات أثر كبير في خفض تشنجات البطن مقارنة مع المجموعة الشاهد كما أن القيم المتحصل عليها قريبة جدا من تلك التي تم الحصول عليها مع مضاد الإلتهابات القياسي (الاندوميثاسين).

الكلمات المفتاحية: نبات العلندة *Ephédra alata*، النشاطية المضادة للأكسدة ، المعايير البيو كيميائية، معايير الدهون، الاجهاد التأكسدي، Triton X-100 ، النشاطية المضادة للألم، الاندوميثاسين .

ABSTRACT

In order to evaluate the desert medicinal plant, we conducted this work which is based on a photochemical and biochemical study through a *in vivo* and *in vitro* study to the female cones of *Ephédra alata* plant which is growing in Oued-Souf region.

In vitro The assay results of polyphenols and flavonoids are respectively (178,744 ± 83.297 mg ЄAG/g extract and 26.101 ± 1.558 mg ЄQu/g extract. The antioxidant activity of our extracts was evaluated by the tests of DPPH •, reduction of iron and hemolysis. The tannins that are shown a better inhibition ability to the other extracts of a value (IC50 = 14.52 µg/ml), and a reductive activity of the highest iron, and the hemolysis test showed that the polyphenols gave the best protection of erythrocytes (22.27 % of erythrocytes dissolved in the concentration 1 mg/ml), therefore the results can be said that the antioxidant activity of extracts of the female cones of the plant *Ephédra alata* low comparison with Ascorbic acid. Chromatographic analysis by HPLC has identified three polyphenols in the crude extract are: chloroginic acid, p-coumaric acid and quercitine.

In vivo these are two experimental studies on 48 male rats of the Wistar strain. The first study for the evaluation of the protective effect following a Hyperlipidemia caused by Triton X-100, from the analysis of our results, there are noticeable changes in the biochemical and lipid parameters studied, also for the parameters of oxidative stress in the batch exposed to Triton X-100. On the other hand, treatment with the methanolic extract of the plant *Ephédra alata* yields similar results to the control batches by normalising the biochemical parameters studied and by decreasing the lipid parameters and the stress state. The histological study confirmed the biochemical results..

The analgesic power is the second in vivo study, according to these results, the methanolic extract of *Ephédra alata* induces a significant decrease in abdominal cramps compared to the control group and the values obtained are very close from those obtained with the standard anti-inflammatory drug (indomethacin). This result confirmed the beneficial effect of this medicinal plant.

Key words: *Ephédra alata*, antioxidant activity, biochemical parameters, lipid parameters, oxidative stress, Triton X-100, analgesic power, indomethacin.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

Ac : Absorbance du control.

AG :Acide gallique.

AGPI: Acides gras polyinsaturés.

ALAT : Alanine aminotransférase.

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.

ASAT : Aspartate aminotransférase.

At : Absorbance de l'echantillion.

C

CT :Cholestérol total

D

DPPH : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

DTNB : Acide dithio-bis2-nitrobenzoique

E

EDTA: Éthylène diamine tetra-acetique

EME alata: Extrait méthanolique *Ephédra alata*

F

Falv **:** Flavonoïdes totaux

G

GSH: Glutathion réduite

GPx : Glutathion peroxydase

H

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

HDL-C : Lipoprotéines de haute densité

H-E : Hématoxyline et à l'éosine

HMG-CoA réductase: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase

HOCl :Acide hypochloreux

HPLC :Chromatographie liquide à haute performance.

HSV : Herpes simplex virus

Hyp : Groupes des rats traité par Triton X-100

I

IC_{50} :Concentration inhibitrice.

L

LDL-C : Lipoprotéines de basse densité

LPO : peroxydation lipidique

M

MCV : Maladies cardiovasculaires

MDA: Malondialdéhyde

MPO: Myéloperoxidase

N

$NO^{\cdot}$: Monoxyde d'azote

O

$O_2^{\cdot -}$: Anion super oxyde

$OH^{\bullet}$:Radical hydroxyle

ORO :Huile de rouge O

P

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

PMV: Poids de Matière Végétale(g).

Ppt : Polyphénols totaux

Q

Qu : Quercitine

R

R : Rendement.

RLO : Radicaux libres oxygénés

ROS : Reactive oxygen species

T

TAG : Triglycérides

TBS : Tris-buffered saline

TBRAS:Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

Te: Groupes témoins

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

U

UV : Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Répartition géographique de genre Ephedra dans le monde.	**6**
Figure 2	La structure chimique générale des polyphénols.	**11**
Figure 3	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.	**12**
Figure 4	Structure de base des flavonoïde.	**14**
Figure 5	Structure générale de tanins hydrolysable.	**18**
Figure 6	Structure générale de tanins condensés.	**19**
Figure 7	Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène	**27**
Figure 8	Photo originale de l'espèce végétale *E.alata* à partir du site de prélèvement.	**32**
Figure 9	Localisation géographique de la zone d'étude ADHEL-HASSI KHALIFA.	**33**
Figure 10	Protocole d'extraction des extraits bruts.	**34**
Figure 11	Protocole d'extraction des flavonoïdes	**35**
Figure 12	Protocole d'extraction des tanins	**36**
Figure 13	Protocole de dosage des polyphénols et flavonoïdes	**38**
Figure 14	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	**38**
Figure 15	Différentes parties d'une chaîne HPLC	**41**
Figure 16	Protocol expérimental	**42**

Figure 17	Protocol expérimentale de l'étude anti-hyperlipidémie.	**43**
Figure 18	Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	**53**
Figure 19	Teneurs des polyphénols totaux et flavonoïdes.	**54**
Figure 20	Courbe d'étalonnage de quercétine.	**54**
Figure 21	les valeurs d'IC_{50} des différents extraits et acide Ascorbique en (µg/ml).	**55**
Figure 22	Pouvoir réducteur des différents extraits et de l'acide ascorbique	**56**
Figure 23	Les pourcentages de hémolyse des globules rouges des différents extraits et de l'acide ascorbique.	**57**
Figure 24	Profil chromatographique HPLC d'extrait brut méthanolique d'*Ephedra alata.*	**58**
Figure 25	Variations des enzymes ALAT et ASAT chez le groupe témoin et les différents groupes expérimentaux.	**59**
Figure 26	Variation de la concentration sérique en cholestérols,triglycérides ,HDL-C et LDL-C chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	**60**
Figure 27	Variation de la Malondialdéhyde (MDA) dans le foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	**61**
Figure 28	Variations de l'activité de SOD, CAT et GPx au niveau du foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	**62**
Figure 29	Observation microscopique d'une coupe histologique du foie (Exploration structurale) chez les rats de différents lots (X400)	**63**
Figure 30	Observation microscopique d'une coupe histologique du foie (Exploration histologique du dépôt lipidique) chez les rats de différents lots (X400)	**64**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titres	Pages
Tableau 1	La position systématique *d'Ephera alata*	**6**
Tableau 2	Principales classes des flavonoïdes	**15**
Tableau 3	L'ensemble des différents types des espèces radicalaire	**24**
Tableau 4	Composition du complément minéral vitaminé : CMV (Kg/100 Kg de granulés)	**33**
Tableau 5	Mode opératoire du dosage de l'activité de la SOD	**45**
Tableau 6	Mode opératoire du dosage de l'activité de la GPx	**46**
Tableau 7	Rendements des extraits *d'Ephedra alata*	**52**
Tableau 8	Temps de rétention et la concentration des composés standards	**58**
Tableau 9	Effet de l'extrait méthanolique *d'Ephedra alata* sur les crampes abdominales induites par l'acide acétique chez les rat	**65**

SOMMAIRE

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Première partie synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur la plante étudiée *(Ephedra alata)*

1. La famille des Ephédraceae 5
2. Présentation du genre Ephédra 5
3. Description botanique de l'espèce *Ephédra alata* 6
4. Classification systématique de la plante 6
5. Composition chimique de la plante 7
6. Activités biologiques de la plante 7
6.1. Activité antimicrobienne 7
6.2. Effet sur la masse corporelle 7
6.3 Effet hypoglycémiant 7
6.4. Effet anti-inflammatoire 7
7. Utilisation 7
8. Pharmacologie 8
9. Toxicologie 8

Chapitre II : métabolites secondaires

1. Généralité 10
2. Les composés phénoliques 10
2.1. Structure chimique 10
2.2. Biosynthèse des polyphénols 11
2.2.1. La voie de l'acide shikimique 11
2.2.2. Voie de l'acétate 11
2.3. Les Propriétés biologiques des composés phénoliques 13
2.4. Rôle et intérêt des composés phénoliques 13
3. Les flavonoïdes 14
3.1. Généralités 14
3.2. Structure 14
3.3. Classification 15
3.4. Localisation et distribution 16
3.5. Propriété biologique des flavonoïdes 16
4. Les tanins 17
4.1. Généralités 17
4.2. Structure chimique et classification 18
4.2.1. Tanins hydrolysables 18
4.2.2. Tanins condensées 18
4.3. Répartition et localisation 19
4.4. Effets bénéfiques des tanins 19
4.5. Effets toxiques 20
4.6. Rôle des tanins dans les plantes 20

Chapitre III : Le stress oxydatif

1. Définition 22

2. Radicaux libres 22
3.Différentes types des radicaux libres 22
3.1. Dérivés activés de l'oxygène 22
3.1.1. Oxygène 22
3.1.2. Anion super oxyde ($O_2^{\cdot -}$) 23
3.1.3. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 23
3.1.4. Radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) 23
3.1.5. Acide hypochloreux (HOCl) 23
3.2. Monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) 23
4. Origine des radicaux libres 24
5. Cibles biologiques des radicaux libres 25
5.1. Lipide 25
5.2. Protéines 25
5.3. Acides nucléiques 25
6. Systèmes antioxydants 25
6.1. Antioxydants enzymatiques 26
6.1.1.Superoxyde dismutases (SOD) 26
6.1.2. Catalase 26
6.1.3. Glutathion peroxydase (GSH-PX) 26
6.1.4. Système thiorédoxine 27
6.2. Antioxydants non enzymatiques 27
6.2.1. L'acide Ascorbique ou Vitamine C 27
6.2.2. L'α-tocophérol (Vitamine E) 28
6.2.3. Glutathion (GSH) 28
6.2.4. Caroténoïdes 28
6.2.5. Polyphénols 28
7. Pathologie liée aux stress oxydant 29

Deuxième partie : Etudes expérimentales

Chapitre I: Matériels et Méthodes

I. Matériel et méthodes 32
I.1.Matériel 32
I.1.1.Le matériel végétal 32
I.1.2.Matériel animal 33
I. 2.Méthodes suivies 34
I.2.1.Extraction des composés phénoliques 34
I.2.1.1.Préparation des extraits bruts 34
I.2.1.2.Extraction des flavonoïdes 34
I.2.2.Détermination du rendement d'extraction 36
I.3. Etude *in vitro* 36
I.3.1.Dosage des polyphénols totaux 36
I.3.2.Dosage des flavonoïdes 37
I.3.3.Activité antioxydants 38
I.3.3.1.Test du piégeage du radical libre DPPH 38
I.3.3.2.Réduction du fer 39
I.3.3.3.Test d'hémolyse 40
I.3.4.Analyse chromatographique par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance) 40
I.4. Etude *in vivo* 42
I.4.1.Evaluation de l'effet protecteur provoquée par Triton X-100 (suite à une hyperlipidémie) 42
I.4.1.1.Protocol expérimental 42
I.4.1.2.1.Sacrifice 44

I.4.1.2.2.Prélèvement sanguin 44
I.4.1.2.3.Prélèvement des organes 44
I.4.1.2.4.Évaluation du stress oxydant 44
I.4.1.2.5.Dosage des paramètres biochimiques plasmatiques 46
I.4.1.2.6.Etude histologique 48
I.4.2.Pouvoir Pouvoir analgésique: Test du Writhing 50
I.4.3.Analyses statistiques 50
Chapitre II : Résultats et Discussion
II.1.Etude *in vitro* 52
II.1.1.Rendements des extraits 52
II.1.2.Analyse quantitative des composés phénoliques 52
II.1.2.1.Dosage des polyphénols totaux 52
II.1.2.2.Dosage des flavonoïdes 54
II.1.3.Activité antioxydants 55
II.1.3.1.Test du piégeage du radical libre DPPH 55
II.1.3.2.Réduction du fer 56
II.1.3.3.Test hémolyse 57
II.1.4.Analyse chromatographique par HPLC(Chromatographie liquide à haute performance) 58
II.2.Etude *in vivo* 59
II.2.1.Evaluation de l'effet protecteur provoquée par Triton X-100 (suite à une hyperlipidémie) 59
II.2.1.1.Variations des biomarqueurs enzymatiques hépatiques au niveau du plasma 59
II.2.1.2.Les paramètres lipidiques au niveau du plasma 60
II.2.1.3.Evaluation du profil pro oxydant / antioxydant au niveau du foie 61
II.2.1.3.1.Dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires 61
II.2.1.3.2.Variations de l'activité des enzymes antioxydantes tissulaires 62
II.2.1.4.Etude histologique 63
II.2.2.Pouvoir analgésique (Test du Writhing) 65
Conclusion et Perspectives 52
Références bibliographiques 68
Annexes

Introduction générale

Introduction général

Les plantes sont une source formidable pour la découverte de nouveaux produits de valeur médicinale pour le développement de médicaments. aujourd'hui plusieurs produits chimiques distincts dérivés de plantes sont des médicaments importants actuellement utilisés dans un ou plusieurs pays du monde .

De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti*et al*, 2003). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (Benkhnigue, 2010).

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

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 (Gaussen, 1982)**.** Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. Il en résulte une urgence à connaître et protéger ces espèces et les savoirs qui leur sont associés. La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue d'ailleurs un des axes prioritaires de l'industrie pharmaceutique algérienne mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle.

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (Banahmed, 2009). L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie (Konkon*et al*., 2006). En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches.

D'autre part, Les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention des maladies, et parce que certains antioxydants synthétiques ont montré un risque potentiel pour la santé, notamment un effet cancérigène possible (Safer et Al-Nughamish, 1999); il y'a lieu de trouver de nouvelles sources d'antioxydants peu dangereuses et peu coûteuses naturelles pour les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques et remplacer ainsi les antioxydants synthétiques.

Donc notre travail s'inscrit dans une perspective de valorisation et de développement de la recherche sur les plantes médicinales parmi elle *Ephédra alata* alanda , elle est connus pour leurs nombreux usages en médecine traditionnelle dans le monde .

Alors l'objectif de notre travail est d'établir une recherche phytochimique et biochimique et évalue l'activité antioxydant de les cônes femelles de la plante *Ephédra alata* .

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 la description de la plante étudiée. Les métabolites secondaires et les stress oxydative .

-La deuxième partie est expérimentale, subdivisée en deux chapitres l'un Présente les matériels et méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus .

Première partie

synthèse bibliographique

ChapitreI

Généralités sur la plante étudiée

(Ephédra alata)

1. La famille des Ephédraceae

La famille des Ephedraceae ne renferme qu'un seul genre Ephédra composé d'une cinquantaine d'espèces que l'on rencontre essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales. Il se plaît sur une terre désertique, sèche et caillouteuse autour de la Méditerranée et en Californie (Evans, 2009 ; Hegazi et El-Lamey, 2011).

Leurs branches longues restent vertes, ressemblant à des tiges de prêles. Elles ne possèdent ni feuilles vertes, ni aiguilles, des organes contenant de la chlorophylle participent à la formation de la plante, la tige à l'élaboration et à la circulation des aliments (Pellay, 2011).

2. Présentation du genre Ephédra

L'origine de l'Ephédra 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) (Price, 2003).

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

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques (figure 01), ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Hegazi et El-Lamey, 2011).

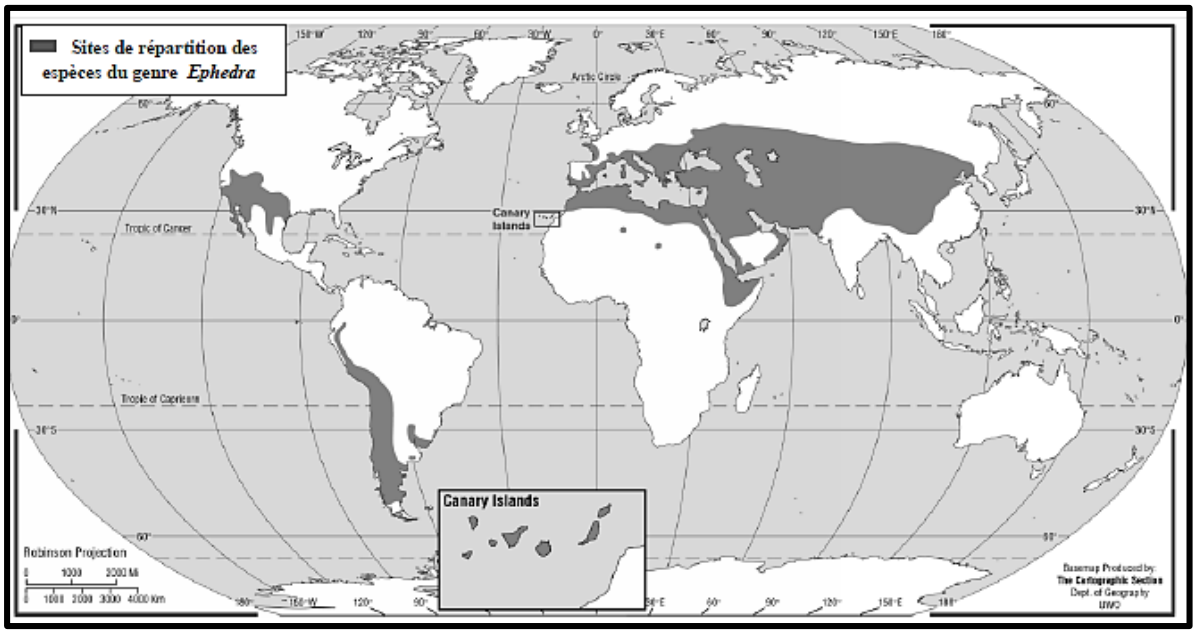


Figure 1: Répartition géographique de l'Ephédra dans le monde (Caveney et *al*., 2001).

3. Description botanique de l'espèce *Ephédra alata*

C'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 nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre. Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant. Elle est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes (Ozenda, 1991; Derbel et *al*., 2010).

4. Classification systématique de la plante

Tableau 1: La position systématique d'*Ephédra alata* (Ozenda, 1991).

Règne:	**Végétal**
Embranchement:	Spermaphytes
Sous Embranchement:	Gymnospermes
Classe:	Genetopsida
Ordre:	Ephedrales
Famille:	Ephedraceae
Genre:	Ephédra
Espèce :	*Ephédra alata*
Nom commun:	Alenda

5. Composition chimique de la plante

L'espèce *Ephédra alata* est une source naturelle de nombreux phyto-constituants incluant des alcaloïdes, des tanins, des anthocyanes, des flavonoïdes, des cardinolides, des terpènes et stérols, aussi que les huiles essentielles (Hegazi et El-Lamey, 2011).

6. Activités biologiques de la plante

6.1. Activité antimicrobienne

Ephédra alata s'est révélée avoir une activité antivirale élevée contre le HSV (Herpes simplex virus). L'extrait aqueux d'*E. alata* égyptienne présente un potentiel d'inhibition significatif *in vitro* et *in vivo* contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* (Al-Qarawi et *al*., 2011).

6.2. Effet sur la masse corporelle

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

6.3 Effet hypoglycémiant

Cinq glycanes actifs isolés de *E.distachya*: ephedranes A, B, C, D et E ont réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des souris normales et diabétiques (Konno *et al*., 1985). Ainsi que l'extrait alcoolique de *l'E. alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun (Shabana, 1990).

6.4. Effet anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de *l'E. sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue (Ling et *al*., 1995).

7. Utilisation

On a trouvé de l'ephédra parmi une série de plantes médicinales sur un site archéologique datant du Néandertal (il y a 6000 ans). En Inde ancienne, le jus d'ephédra était appelé *soma* et on le consommait pour s'assurer la longévité, ce sont assurément les Chinois qui ont développé, de la manière la plus systématique, l'usage médicinal de l'ephédra.

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

En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (Nawwar et al.,1984).

En Arabie Saoudite, Ephédra 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'Ephédra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (Ghourri et *al*., 2013).

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

Les 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).

8. Pharmacologie

La tige de l'*Ephédra alata* contient des alcaloïdes l'éphédrine et le pseudo éphédrine qui est une autre substance présente en quantité importante dans l'Ephedra qui sont utilisées pour le traitement de certaines maladies graves : cancer; maladies inflammatoires; asthme; maladies virales…etc, et aussi contient des flavonoïdes des qui constituant la catégorie la plus important de polyphénols des molécules très réputées pour leurs vertus antioxydants (Yahaioui et Silat ,2017).

9. Toxicologie

Les espèces de l'*Ephédra alata* ont des effets néfastes (Ma et *al*., 2007). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une broncho dilatation, une agitation et une mydriase. L'utilisation de l'Ephédra 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'Ephédra est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiqué pour une utilisation à long terme (Chen et *al*., 2010).

Chapitre II

métabolites secondaires

1. Généralité

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines, lipides et glucides). Ces métabolites secondaires interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (Mansour, 2009). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés : action anti-herbivore (menthe par exemple), inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sècheresse et lumière UV. Mais elles peuvent être antinutritifs. Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole (Sandrin, 2004).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (Mansour, 2009).

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes: les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Haven *et al.,* 2000; Krief, 2003).

2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal, sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Fleuriet, 1982; Yusuf, 2006).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulaire (Nkhili, 2009).

2.1. Structure chimique

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Manallah, 2012).

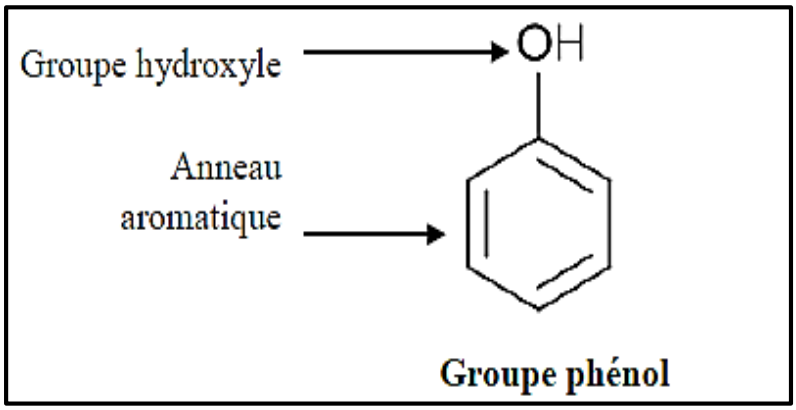


Figure 2: La structure chimique générale des polyphénols (Manallah, 2012).

2.2. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

2.2.1. La voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C_6-C_1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés.

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique (Haslam, 1994; Dewick, 1995).

2.2.2. Voie de l'acétate

La voie de l'acétate conduit (origine de ces poly à des poly ß-coesters (polyacétates) de longueur variable, menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (Bruneton, 1999; Naczk et Shahidi, 2004).

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies (du shikimate et de l'acétate) dans l'élaboration de composés d'origine mixte, comme les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

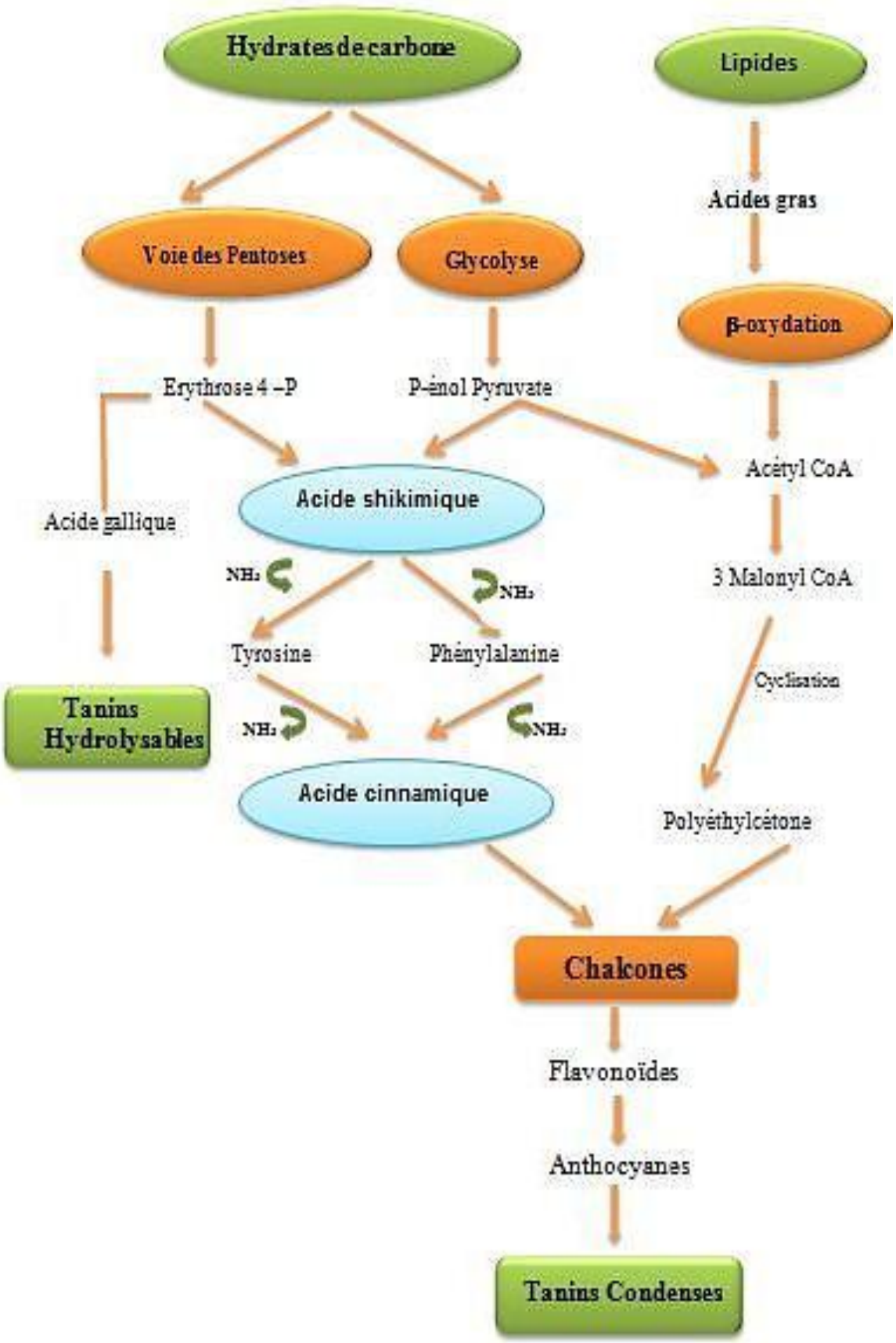


Figure 3: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum, 2011).

2.3. Les Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance et interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV),soit directement dans la nature , soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux, dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...), et des produits qui en dérivent par la transformation, dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...), pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (Fleuriet *et al.,* 2005).De nombreux travaux démontrent que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires, et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton *et al.,* 2000).

Ainsi que des propriétés antioxydants qui participent a la prévention de diverses pathologie impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire (Macheix *et al.,* 2005).
Les plantes ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (Macheix *et al.,* 2005).

2.4. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (Middelton *et al.,* 2000).

Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Pulido *et al.,* 2000).

En effet, leur rôle d'antioxydants naturels permet à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies, ce qui suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires *(*Stoclet *et al.,* 2004) et neurodégénératives (Ramassamy, 2006).

3. Les flavonoïdes

3.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus: jaune) (Maleśev et Kuntić, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al*., 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005; Maleśev et Kuntić, 2007). En 2004 près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medić-Šarić *et al*, 2004).

3.2. Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W-Erdman *et al*, 2007). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 (Emerenciano *et al*, 2007) en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana, 2001; Maleśev et Kuntić, 2007).

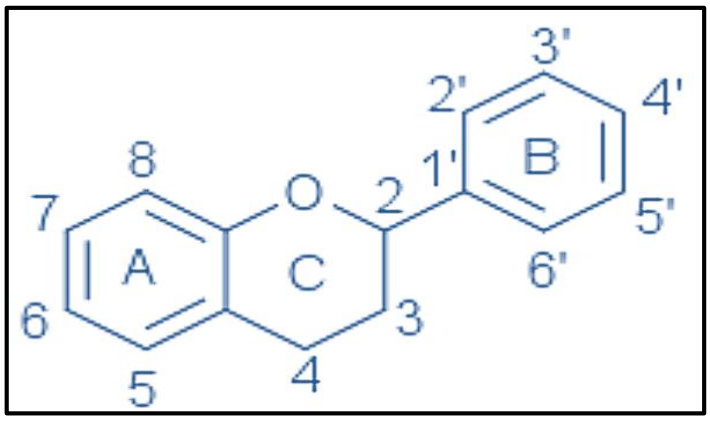
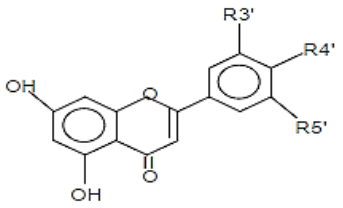
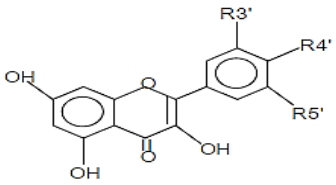
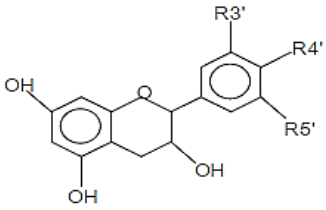
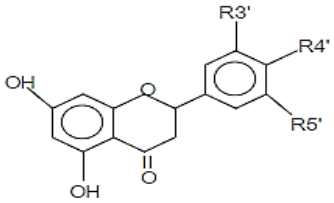
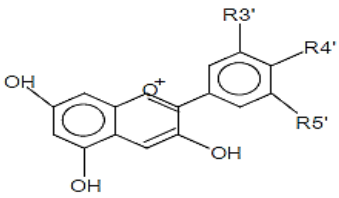
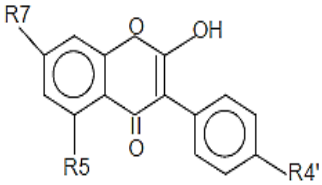


Figure 4: Structure de base des flavonoïde (W-Erdman et al., 2007).

3.3. Classification

Tableau 2: Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W-Erdman *et al.*,2007)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

3.4. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnements, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzelr *et al.,* 1998).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles, la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (Hutzelr *et al.,* 1998).

Ils sont présenté dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens. Ils peuvent aussi être rencontrés dans certaines boissons et chez certains fourrages (Verhoeyen *et al.,* 2002).

Certaines classe de flavonoïdes sont présentés exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavonoes dans les agrumes, le isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes, tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Hutzelr *et al.,* 1998).

3.5. Propriété biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités: antioxydantes, anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes, et préventions des maladies cardiovasculaires; en pharmacologie les aglycones sont particulièrement efficaces (Sharma *et al.,* 2008).

La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant et chélateur et les principales propriétés sont :

- Propriété antioxydant

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse. Ils inhibent en plus l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Sharma *et al.,* 2008).

- Propriété antiallergique

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPc phosphodiestérase et la Ca^{++} ATPase. En outre, la quercitrine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes (Formica et Regelson, 1995).

- Propriété anti-inflammatoire

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène (Sharma *et al.*, 2008).

- Propriété antibactérienne

Selon Cowan (1999) les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire.

- Propriété anticancéreuse

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles, de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993).

4. Les tanins

4.1. Généralités

On appelle communément «Tanins» des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente et ayant la propriété commune de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible et imperméable en se fixant sur les protéines. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides (Paris et Moyse, 1976).

Les tanins sont très importants dans l'industrie des cuirs, ils agissent en donnant des combinaisons insolubles avec les protéines et rendent ainsi les peaux moins perméable à l'eau et imputrescibles (Paris et Hurabielle, 1980).

4.2. Structure chimique et classification

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique, les tanins hydrosolubles et les tanins condensés.

4.2.1. Tanins hydrolysables

Sont des hétéro polymères (figure 5) possédant un noyau central constitué d'un polyol, il s'agit souvent d'un D-glucose; comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques (Leinmuller *et al*., 1991). Ils sont facilement scindés par les enzymes de tannase en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques (Gallo tanins), ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique et les tanins ellagiques (Ellagitanins), Ainsi sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (Paris et Hurabielle, 1980).

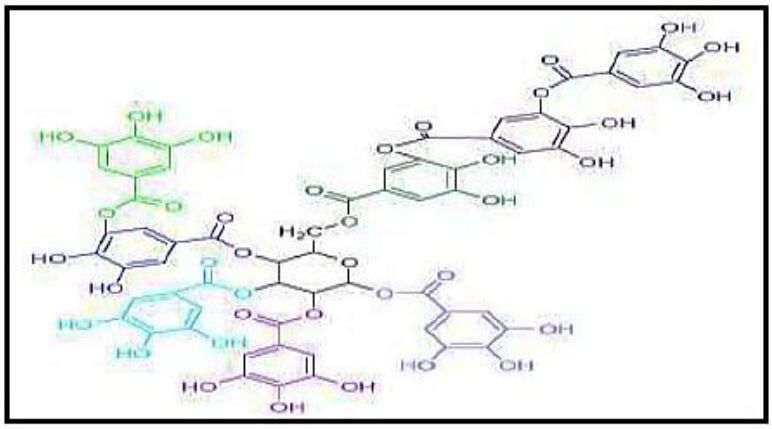


Figure 5: Structure générale de tanins hydrolysable (Gilbert et Norris, 1968).

4.2.2. Tanins condensées

Ce sont des tanins non hydrolysables (Dits catéchiques et proanthocyaniques), ils sont plus complexes que les tanins galliques (figure 6), ils possèdent une squelette phényl-2-chromane de flavonoïdes (Alilou, 2012). Il est admis aujourd'hui que ces tanins sont constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4- dioles), on peut les qualifier encore de tanins flavaniques (Richter, 1993).

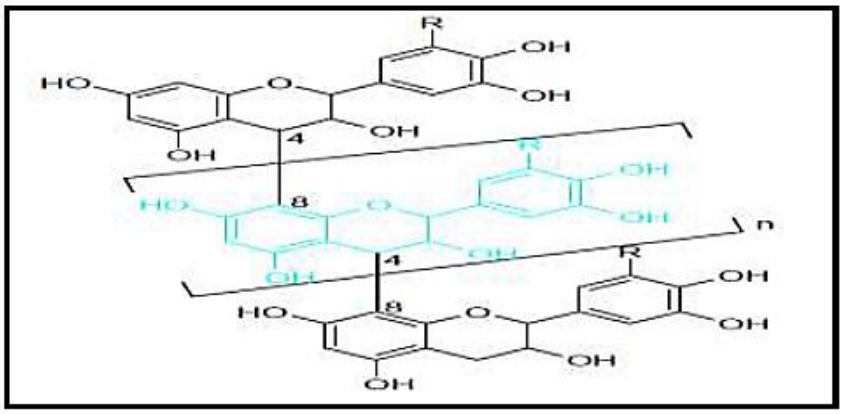


Figure 6: Structure générale de tanins condensés (Gilbert et Norris, 1968).

4.3. Répartition et localisation

Les tanins très répandus dans le règne végétal, sont particulièrement abondants dans certaines familles par exemples: Cupulifères, Polygonacées, Rosacées, Légumineuses, Myrtacées, Rubiacées.

Ils peuvent exister dans divers organes: racines ou rhizomes (Ratanhia, Rhubarbe), écorce (Chêne, Quinquina), bois (Acacia à cachou). Cependant, on note une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologique (Galles) (Paris et Hurabielle, 1980).

On les rencontre dans les vacuoles des cellules, souvent combinés à d'autres substances: alcaloïdes, protéines, oses (Tanosides), parfois dans des cellules spécifiques (idioblastes): ils sont aisément caractérisés par leur coloration brune ou verdâtre ou brune bleuâtre avec des sels ferriques. La teneur en tanins peut être très élevée : 50% à 70% dans les noix de galles, 20% dans les péricarpes du noyer, la racine de bistorte, 15% dans la racine de ratanhia, etc.… (Paris et Moyse, 1976).

4.4. Effets bénéfiques des tanins

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).

La précipitation des protéines par les tanins protège les microorganismes du rumen de leurs effets délétères. Elle permet également le recyclage de l'urée par la diminution de la concentration d'ammoniac dans le rumen. Elle participe également à l'activité anti-diarrhéique (Les tanins vont imperméabiliser les couches externes de la peau et des muqueuses et surtout la muqueuse intestinale), en protégeant les organes digestifs des attaques nuisibles.

Les tanins ont également un pouvoir cicatrisant car ils favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle (Makkar, 2003).

Les tanins des légumineuses peuvent améliorer la qualité des fourrages ensilés en empêchant la dégradation excessive des protéines diététiques (Makkar, 2003).

La présence naturelle des tanins dans les différents pâturages protège les herbivores contre les ballonnements (Makkar, 2003).

4.5. Effets toxiques

Chez l'Homme cette toxicité est mal connue. Chez les animaux, on peut observer une intoxication du bétail par ingestion de jeunes feuilles de chêne.

La toxicité des tanins se manifeste à trois niveaux: l'ingestion, la digestibilité et le microbiote ruminal. Cette toxicité varie en fonction des tanins ingérés et de la tolérance de l'animal qui à son tour, dépend de certaines caractéristiques telles que la nature du tractus digestif, le comportement alimentaire, la taille, l'âge et les mécanismes de détoxication (Bouchama et Yezza,2014).

4.6. Rôle des tanins dans les plantes

Les tanins jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agressions. La synthèse des tanins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes. Par exemple, une accumulation de tanins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui inhibe leurs développement (Feucht et *al.*,1997; Collingborn *et al.,* 2000).

Les tanins sont aussi un moyen de défense contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores (Woodward et Coppock, 1995; Feucht *et al.,* 1997).

La présence des tanins rend les plantes moins appétences pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation. Cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002).

Chapitre III

Le stress oxydatif

1. Définition

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemail et *al.,* 1999). Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (Pincemail et *al.,* 2002).

2. Radicaux libres

Après la découverte du radical superoxyde par McCord et Fridovich en 1968, les travaux sur les radicaux libres (R•) se sont multiplets dans des domaines aussi variés que la biochimie, la physiopathologie et la physiologie de l'exercice (Tessier et *al.,* 1995). Les radicaux libres (R•) sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (Poortmans et *al.*, 2003).

Ce sont des espèces chimiques, capables d'existence indépendante, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaitre au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente âpres laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre, donc sont des espèces chimiques instables, très réactives (Tessier et *al.*, 1995) et possèdent un temps demi-vie extrêmement court: 10^{-9} jusqu'à 10^{-6} second (Thiebauld et *al.,* 1998).

3.Différentes types des radicaux libres

Les espèces radicalaires les plus importantes en biologie sont les radicaux libres oxygénés (RLO) et le monoxyde d'azote (NO) (Lacollry et *al.,* 2007) (tableau 3).

3.1. Dérivés activés de l'oxygène

3.1.1. Oxygène

L'oxygène moléculaire ou dioxygène est en fait un biradical qui possède deux électrons non appariés (Lacollry et *al.*, 2007).

Elle est accepteur final des électrons (O_2+4 e^- + 4H $^+ \longrightarrow 2H_2O$), une fois leur énergie récupérée au long de la chaine respiratoire mitochondriale pour la synthèse de l'ATP, source même de la vie cellulaire. Mais elle est aussi l'accepteur intermédiaire d'électron donnant naissance à des radicaux libre oxygéné très réactifs (Moussard, 2006).

3.1.2. Anion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'ion radicale superoxyde, qui dérivé de l'oxygène moléculaire par fraction d'un électron supplémentaire ($O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$). Il contient 17 électron pour 16 proton : il porte une charge négative en même temps qu'un électron célibataire qui le rend instable (Borel et *al.*, 1997) .

3.1.3. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de ($O_2^{\bullet-}$) par la superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amine-oxydase (Jadot, 1994).

3.1.4. Radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$)

Le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours des réactions de Fenton et d'Haber- Weiss :

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

Réaction de Fenton

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

Réaction d'Haber-Weiss (Vergely et *al.*, 2003).

Les radicaux hydroxyles sont des espèces très réactives à durée de vie très courte. Ils sont également peu ou pas sélectifs (Crini et *al.*, 2007).

3.1.5. Acide hypochloreux (HOCl)

Dans le polynucléaire neutrophile, la myéloperoxidase (MPO) génère l'acide hypochloreux (HOCL), oxydant très puissant, à partir de H_2O_2 et du chlore (Lacollry et *al.*, 2007), capable de chlorer les molécules (Serteyn et *al.*, 2002).

$$H^+ + Cl^- + H_2O_2 \rightarrow HOCl + H_2O$$

3.2. Monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$)

Le NO est un élément radicalaire présent sous forme gazeuse, lui conférant ainsi un fort pouvoir de diffusion dans les milieux biologiques (Besnier et *al.*, 2015). Monoxyde d'azote NO est très réactif et la demi de vie très brève, de 1 à 5 secondes, il est vite dégrader par des processus non enzymatiques (Garrett et *al.*, 2000). Le $NO^{\cdot}$ est un molécule instable synthétisé par les cellules endothéliales (Haleng et *al.*, 2007) former par la conversion de l'arginine en citrulline sous la catalyse de NO-synthases (Hennen, 2001) (tableau 3).

Tableau 3: L'ensemble des différents types des espèces radicalaires(Fatmah et *al.*, 2012).

Radicaux	Non Radicaux
Espèces réactives d'oxygène	
Superoxide, $O^{\bullet}_2$ Hydroxyl, $OH^{\bullet}$ Peroxyl, $ROO^{\bullet}$ Alkoxyl, $RO^{\bullet}$ Hydroperoxyl, HO_2	Hydrogen peroxide, H_2O_2 Hypochlorous acid, $HOCl^-$ Ozone, O_3 Singlet oxygen,$^1O_2$ Peroxynitrite, $ONOO^-$
Espèces réactives d'azote	
Nitric oxide, (nitrogen mono) $NO^{\bullet}$ Nitrogen dioxide, $NO^{\bullet}_2$	Peroxynitrite, $ONOO^-$ Alkyl peroxynitrites, ROONO Dinitrogen trioxide, N_2O_3 Dinitrogen tetroxide, N_2O_4 Nitrous acid, HNO_2 Nitronium anion, NO_2^+ Nitroxyl anion, NO^- Nitrosyl cation, NO^+ Nitryl chloride, NO_2Cl
Espèces réactives chlorés	
Atomic chlorine, Cl^-	Hypochlorous acid, HOCl Chlorine, Cl_2 Nitronium (nitryl) Chloride, NO_2Cl

4. Origine des radicaux libres

Les ERO peuvent avoir différentes sources cellulaires, mais la mitochondrie représente une source importante (Bonnefont-Rousselot, 2014).

- **Les sources endogènes**

Se situent au niveau des chaines respiratoire de la mitochondriales des cellules aérobies de l'organisme (NADH déshydrogénase) (Aurousseau, 2002). Les radicaux libres peuvent également être formés au niveau du réticulum endoplasmique. Dans le muscle, les sites de production sont aussi les lysosomes, les peroxysomes, le réticulum nucléaire et sarcoplasmique, le sarcolemme et le sarcoplasme.

- **Les sources exogènes**

Sont multiples : l'oxygène et les radiations (ultra-violets, rayons gamma) et certains toxiques comme la bléomycine, le benzopyrène, les polluants atmosphériques, pour n'en citer que quelques-uns (Thiebauld et *al.*, 1998) .

5. Cibles biologiques des radicaux libres

5.1. Lipide

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidoniques sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH). Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits que sont les aldéhydes et les hydrocarbones (Pincemail et *al.,* 1999). La phase terminale de dégradation conduira à des aldéhydes, parmi lesquels on peut citer le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonénal(4-HNE),ou les isoprostanes (Poisson, 2013).

5.2. Protéines

Les protéines ayant des groupements sulfure ou un caractère insaturé sont particulièrement sensibles aux agressions radicalaires les conséquences sont multiples au niveau cutané: dépolymérisation du collagène, de l'élastine et de l'acide hyaluronique, rupture de molécules à l'origine d'inactivation enzymatique, de produits toxiques ou de formation d'agrégats protéiques (Revuz, 2009).

Ces ROS sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le radical OH• s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

5.3. Acides nucléiques

Les cibles biologiques des ERO sont avant tout : l'acide désoxyribonucléique, avec altérations et cassures des brins d'ADN, responsables de modifications de l'expression du matériel génétique avec le risque de mutation (Avril, 2002). L'un des marqueurs d'une attaque oxydative des acides nucléiques est la présence de 8-hydroxy-guanine (8-OHG). Les dommages causés aux ARNs ne sont pas réparés ; en revanche, les processus de réparation de l'ADN semblent pouvoir éliminer pratiquement sans erreurs les lésions oxydatives de l'ADN. Cependant, si les dommages excèdent les capacités de réparation, la récupération cellulaire après un stress oxydatif peut être compromise. Par ailleurs, les cassures des brins d'ADN causées par les ROS, activent la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et son activation prolongée peut rapidement épuiser les réserves énergétiques de la cellule (Ré et *al.*, 2005).

6. Systèmes antioxydants

Les organismes est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire (Dwassy, 2014). Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement

l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (Josem et *al.*, 1999; Suzy et *al.*, 2002 ; Droge et *al.*, 2002).

6.1. Antioxydants enzymatiques

6.1.1.Superoxyde dismutases (SOD)

Selon Claudine et *al* (2004) (CuZn-SOD; EC 1.15.1.1) Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Haleng et *al.*, 2007). Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Valéry et *al.*, 2007). La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine,endothéline 1,angiotensine II)et diminuées par l'homocystéine(Haleng et *al.*,2007).

6.1.2. Catalase

(EC1.11.1.6) elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l' oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes (Claudine et *al.*, 2004), Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Goudable et *al.*, 1996). L'enzyme agit sur le même substrat que la GSH-Px, avec laquelle elle peut entrer en compétition, mais son action prédomine si la production d'H_2O_2 est élevée (Tessier et *al.*, 1995).

6.1.3. Glutathion peroxydase (GSH-PX)

(GSH-Px; EC 1.11.1.9) (Claudine et *al.*, 2004). Les GSH-Px réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (figure 7) (Goudable et *al.*, 1996).

A ce titre, le GSH constitue l'antioxydant principal de l'organisme d'autant qu'il est aussi le cofacteur de toute une série d'enzymes antioxydants (glutathion peroxydases, glutathion réductase, thiorédoxines et peroxyrédoxines) (Defraigne et *al.*, 2007).

Dans la cellule, dans les conditions physiologiques, la forme glutathion réduit est prédominant (95 %). Les GSH-Px connues sont des enzymes à sélénium. Le sélénium est intégré dans la protéine sous forme de sélénocystéine. Le facteur limitant de la synthèse des

sélénoprotéines, et donc des GSH-Px, est la teneur intracellulaire en sélénium (Goudable et *al.*, 1996).

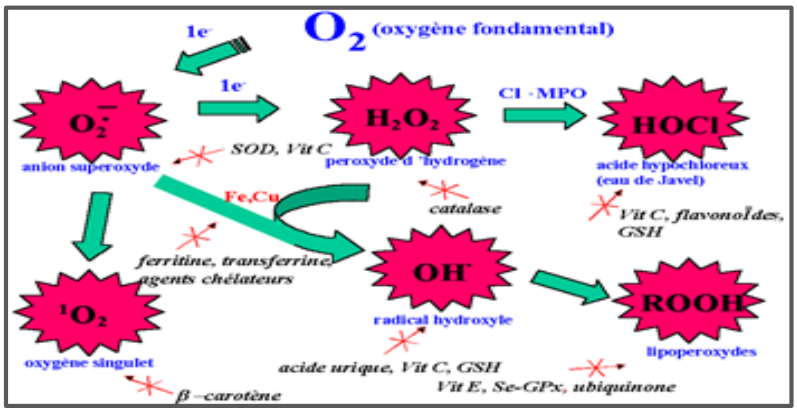


Figure 7 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène(Goudable et *al.*, 1996 ; Pincemail et *al.*, 1999).

6.1.4. Système thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène (Haleng et *al.*, 2007).

6.2. Antioxydants non enzymatiques

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont composés principalement de substances de faible poids moléculaire montrant des fonctions réductrices ou capables de piéger les radicaux libres (Amiard et *al.*, 2008).

6.2.1. L'acide Ascorbique ou Vitamine C

L'ascorbate ou vitamine C est antioxydant vis-à-vis des radicaux $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$ et $RO_2^{\cdot}$ (Moussard, 2006). La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits (Haleng et *al.*, 2007). Elle est capable de maintenir la vitamine E sous sa forme réduite active en réagissant avec le radical tocophéryle formé lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique membranaire par la vitamine E (Marcel et *al.*, 2008). Ses fonctions sont nombreuses: contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng et *al.*, 2007).

6.2.2. L'α-tocophérol (Vitamine E)

La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble vis-à-vis du radical $RO_2^{\cdot}$ (Moussard, 2006). Le terme vitamine E englobe différents isomères, l'α-tocophérol étant l'antioxydant le plus efficace, notamment dans la détoxification des radicaux peroxyles et alkoxyles et donc dans la prévention des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Ré et *al.*, 2005). Joue a priori un rôle indirect important, par l'efficacité de ses effets, pour préserver des peroxydations le membrane mitochondriales dont l'intégrité est indispensable au fonctionnement de cette dernière. Elle intervient en synergie avec la vitamine C ou le coenzyme Q (Aurousseau et *al.*, 2007).

6.2.3. Glutathion (GSH)

Le GSH est un tripeptide qui, sous sa forme réduite (GSH) (Lacollry et *al.*, 2007), c'est un antioxydant non enzymatiques présent dans l'organisme humain (Durand et *al.*, 2008). C'est aussi une forme de transport et de stockage de la cystéine et du NO, un régulateur de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, un partenaire dans les réactions de détoxification des xénobiotiques auxquels il est conjugué par la GSH S-transférase et un cofacteur des réactions d'isomérisation. D'autres composés thiolés comme l'acide α-lipoïque , ainsi que certaines hormones comme la mélatonine ou les eostrogènes, ont aussi été décrits comme possédant des propriétés antioxydants (Ré et *al.*, 2005).

6.2.4. Caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire ($C_{40}H_{56}$) avec de nombreuses doubles liaisons, le lycopène, pigment rouge présent notamment dans la tomate et le pamplemousse. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β-carotène (Haleng et *al.*, 2007), précurseur de la vitamine A a un rôle de protection des lipides membranaires en interrompant la chaine de lipo-peroxydation par un mécanisme de transfert d'électrons (Voyer et *al.*, 1998).

6.2.5. Polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux. Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à` leur défense contre les agressions environnementales (Edeas, 2007). L'activité antioxydant des composés phénoliques est principalement attribuable à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène et extincteurs de l'oxygène singlet. En outre, ils peuvent

également posséder des propriétés de chélation métallique (Ilhami et *al.*, 2009). La famille la plus abondante de polyphénols présents dans l'alimentation humaine, est les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont constitués de deux noyaux aromatiques, le phénol et la pyridine, reliés par trois atomes de carbone qui proviennent souvent d'un hétérocycle oxygéné (Mónica et *al.*, 2010). Les effets protecteurs des flavonoïdes contenus dans le système biologique sont attribués à leur capacité à activer les enzymes antioxydants, réduire les radicaux de l'α-tocophérol, inhiber les oxydases (Kelly et *al.*, 2002), se lier à des molécules telles que les enzymes, les transporteurs d'hormones et l'ADN, chélater les ions métalliques de transition, catalyser le transport des électrons, et piéger les radicaux libres, y compris des anions superoxydes (Katarzyna et *al.*, 2001).

7. Pathologie liée aux stress oxydant

L'état de stress induit des modifications oxydatives au niveau des lipides, l'ADN et les protéines. À des degrés variables, celles-ci sont impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, des cancers, des complications du diabète ou encore des affections neurologiques dégénératives (Joël et *al.*, 2007).

Plusieurs mécanismes pathogéniques conduisent à une augmentation du stress oxydant et semblent impliqués dans l'apparition des complications du diabète (Haleng et *al.*, 2007). En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53. Il est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles: la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

Deuxième partie

Etudes expérimentales

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1.Matériel

I.1.1. Matériel végétal

La plante utilisée dans ce travail expérimental est une espèce médicinale appartenant à la famille des Ephedraceae, qui est les cônes femelles *l'Ephedra alata* (Alenda), cette plante est la plus utilisée par les herboristes.Le choix du matériel végétal utilisé dans notre étude est principalement est du :a l'abondance de l'espèce *Ephedra alata* dans la région d'Oued Souf en particulier et en Algérie en général, la richesse de cette espèce en composes bioactives et finalement pour connaître l'importance pharmaceutique de cette plante.

La récolte s'est effectuée le 24 mars 2018 au niveau de la localité D'Adhel - Hassi Khalifa (wilaya d' El Oued) (Figure 8).

Le séchage s'est fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures (Catier et Roux., 2007). Après séchage, le partie de la plante a été broyée et stockée dans un endroit sec en vue de leurs analyses.

Figure 8 : L'espèce végétale *Ephedra alata* à partir du site de prélèvement.

a. Présentation du site de récolte

Les échantillons de la plante ont été prélevés à partir d'un site de la région ADHEL - HASSI KHALIFA , situé à 33°40'42" Nord et 7°13'35" Est. Le site fait partie de la wilaya d'El Oued, localisée au Sud -Est Algérien (Figure9).

Figure 9 : Localisation géographique de la zone d'étude ADHEL-HASSI KHALIFA (wilaya d'El Oued) (Google maps,2019).

I.1.2. Matériel animal

L'étude est réalisée sur des rats mâles pesant environ 140 ± 16 g, provenant d'un élevage de la pharmacie centrale de Tunis (SIPHAT). Ils sont élevés dans une animalerie ou la température est de 22±1°C avec une alternance de 12 heures d'éclairement et de 12 heures d'obscurité, l'humidité relative étant voisine de 40%. Les rats reçoivent un régime équilibré en protéines, lipides, glucides, vitamines et oligoéléments provenant de la société de nutrition animale(SNA, Sfax,Tunisie). Durant toute la période d'expérimentation (15jours), les animaux ont été traités selon les règles d'éthiques inhérentes à l'expérimentation animale.

Tableau 4 : Composition du complément minéral vitaminé : CMV (g/100 g de granulés)

Propriétés nutritionnelles du CMV g/100 g:	
-Humidité (maximale) (eau)	14
-Protéines	17,5
-Lipides (maximale)	3.5
-Fibres (maximale)	3.5
-Cendres	6.5
-Valeur calorifique	2900 (Kcal/Kg)
Acides aminés g/100 g:	
-Méthionine (0.4) -Cystéine (0.31) -Lysine (0.94) -Thréonine (0.67) -Tryptophane (0.21)	
Suppléments/100 Kg	
-Vit A (10.000 UI) -Vit D (2.500 UI) -Vit H (2.5 g) -Cu (0.8 g) –Flavophospholipol (0.3 g)	

I. 2. Méthodes suivies

I.2.1. Extraction des composés phénoliques

I.2.1.1. Préparation des extraits bruts

Dans ce travail nous avons utilisée la méthode le plus connue chez les phytochimistes (la macération).

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide qui consiste à faire tremper une substance (ici matière végétale) dans un solvant froid ou chaud pour extraire les espèces (molécules) solides ou liquides présentes dans une substance naturelle par sa dissolution dans ce solvant à température ambiante (Bellebcir, 2008).

En a placé 10g de matériel végétal (cônes femelles) dans un erlenmeyer avec 150 ml de méthanol, pendant 24 h, après filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 50°C (Matkowski et Piotrowska, 2006).

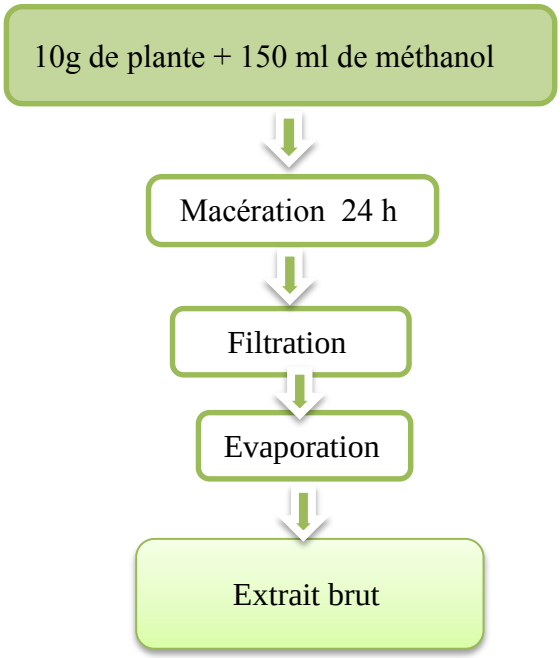


Figure 10: Protocole d'extraction des extraits bruts**.**

I.2.1.2. Extraction des flavonoïdes

10g de matériel végétal (cônes femelles)sont placé dans un erlenmeyer avec 150 ml de méthanol pendant 24 h, après filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C. Le solvant que nous avons employé pour le partage liquide-liquide est : l'acétate d'éthyle. Les résidus secs obtenus par évaporation du filtrat méthanolique de la plante étudiée, est partagé entre 150 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau

partagée avec 150 ml d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60°C. Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle (Bekkara *et al*,1998).

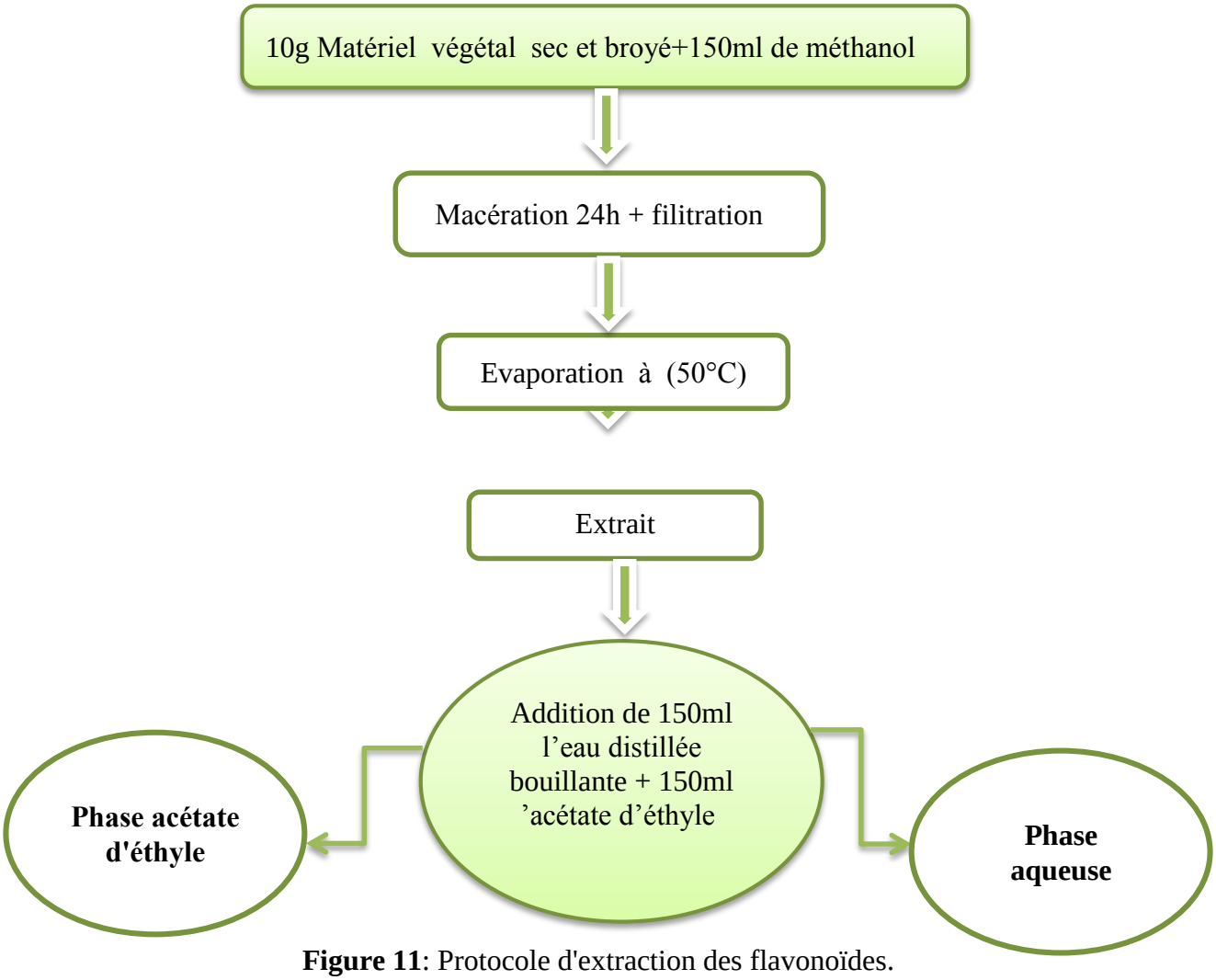


Figure 11: Protocole d'extraction des flavonoïdes.

I.2.1.3. Extraction des tanins

30g de poudre de matériel végétal a été extraite par 145 ml du mélange acétone/eau distillée (102/43, V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporez à 40°C par un rotavapeur type Buchi r-200 pour éliminer l'acétone puis, la phase aqueuse est lavée par 150 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraite deux fois avec 150 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée à sec à 40°C par un rotavapeur (Zhang *et al*, 2008).

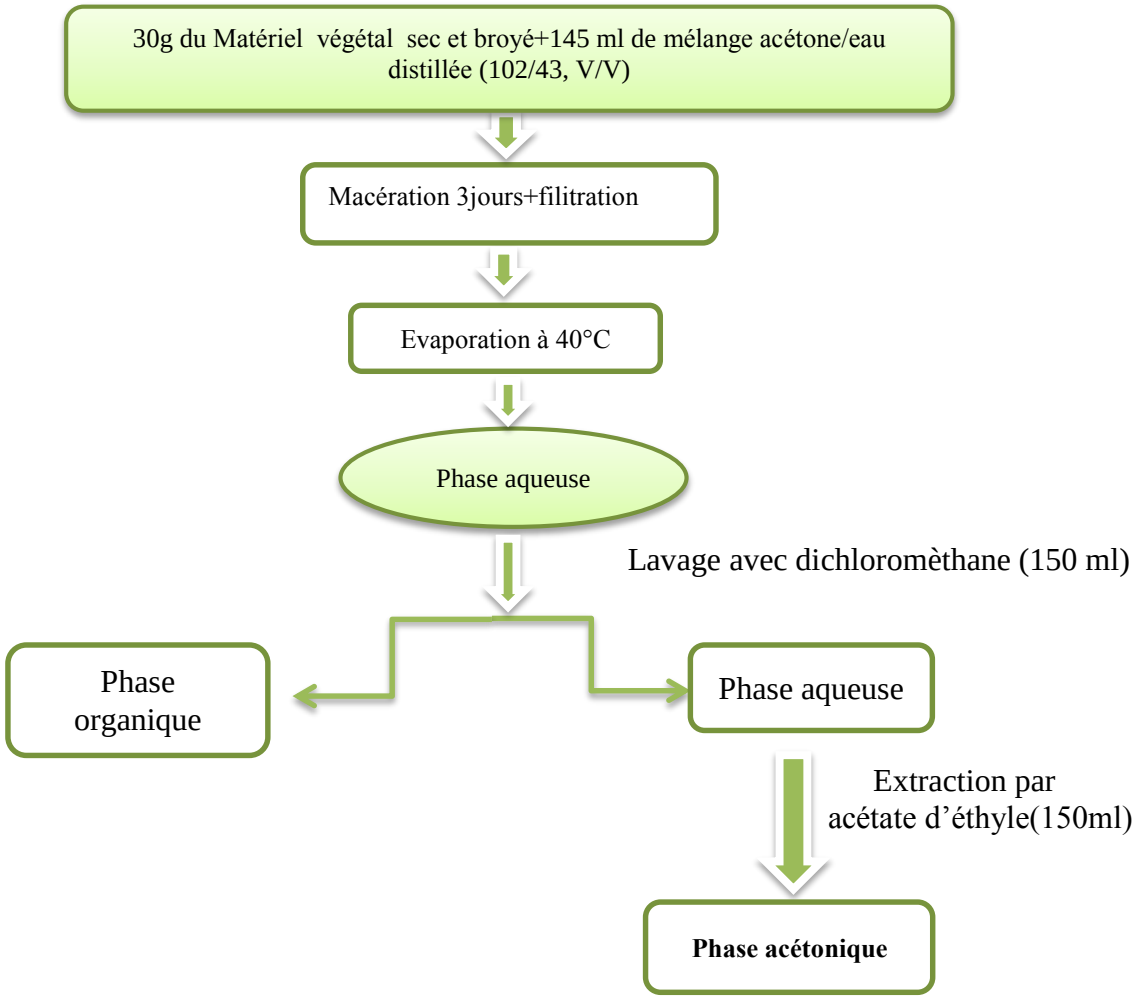


Figure 12: Protocole d'extraction des tanins**.**

I.2.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre le poids de l'extrait obtenue après l'extraction et le poids de la poudre utilisée.

Il est calculé par la formule suivante :

$$R\ \% = (PEB/PMV) \times 100$$

R : Rendement.

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

PMV: Poids de Matière Végétale(g).

I.3. Etude *in vitro*

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu selon la technique décrite par (Yap et *al.*, 2009) .

- **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). La méthode de folin-ciocalteu est basée sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction de l'acide phosphomolybdique (Castellucci, 2010).

Le réactif de folin-ciocalteu voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules, il réagit avec la fonction–OH des phénols, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues (Khatabi et *al.*, 2011).

- **Mode opératoire**

0.2 ml de la solution d'extrait brut sont additionnés à 1ml du réactif de folin-ciocalteu (diluer 10 fois) aprés 5 min , on ajouté 0.8ml de carbonate de sodium (Na_2 Co_3) à 7.5 % le mélange est incubé pendant 30 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue à 765 nm.

On a préparé la solution standard d'acide gallique de concentrations (0.01-0.12mg /ml) pour l'estimation totaux des composés phénoliques des extrais méthanoliques .

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent en acide gallique par gramme de l'extrait (Nabti et Belhattab, 2016).

I.3.2.Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux de notre extrait a été estimée par un dosage colorimétrique basée sur la méthode de (Abdou Bouba et *al.*, 2010) avec quelques modifications.

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Chang et *al.*, 2002). L'$AlCl_3$ forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols, ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm (Ribéreau- Gayon, 1968).

- **Mode opératoire**

0.5 ml de la solution d'extrait méthanolique sont additionnés à 0.5 ml d'$AlCl_3$(2%), le mélange est incubé pendant 1heure à l'abri de la lumière on mesure l'absorbance à 430 nm.
On a préparé la solution standard d'acide quercitine de concentrations (0.01-0.12mg /ml) pour l'estimation des flavonoïdes des extrais méthanoliques .

La concentration de flavonoïde est exprimée en milligramme d'équivalent en acide quercitine par gramme de l'extrait (Mbaebie et *al*.,2012).

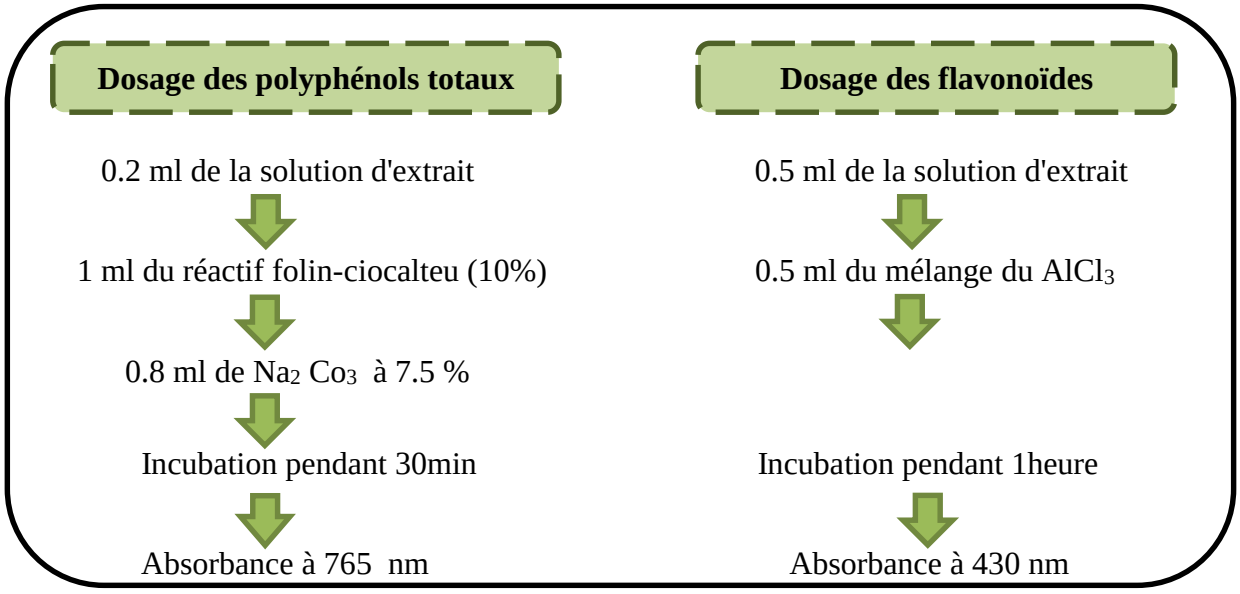


Figure 13: Protocole de dosage des polyphénols et flavonoids.

I.3.3.Activité antioxydants

I.3.3.1. 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) (figure14). 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).

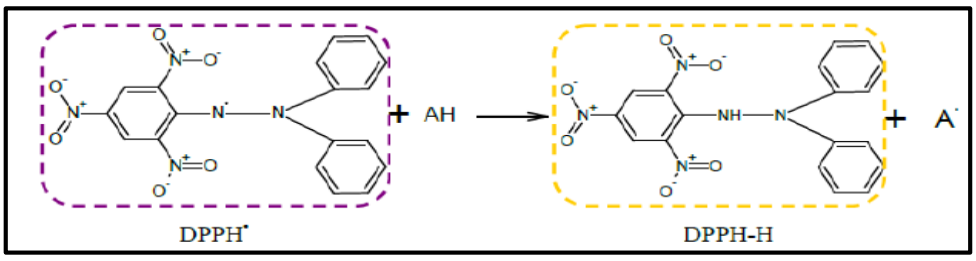


Figure 14: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)

- **Mode opératoire**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH•. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhammou *et al*, 2007).

.5ml des différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1 ml des solutions méthanolique du DPPH (4mg/100ml MeOH) fraichement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 0.5ml des différentes concentration d'extraits avec 1 ml du DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 15 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (Brand et *al*., 1995).

Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

I % = ((Ac-At)/Ac)*100

Ac : absorbance du control

At : absorbance de l'echantillion.

Une solution antioxydante d'acide ascorbique est également préparé pour servir des témoins positifs. Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant des extraits aqueux, nous avons introduit le paramètre IC_{50} (concentration inhibitrice 50% de DPPH).

L'IC_{50} est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, ils sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés Les résultats sont exprimés en mg/ml (Torres et *al*., 2006). La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC_{50} est petit (Popovici et *al.*, 2009).

I.3.3.2.Réduction du fer

- **Principe du test**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)$ 6 en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par (Oyaizu,1986). En effet, 0.5 ml de différentes concentrations de chaque extrait (0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mg/ml) dilué dans l'eau distillée sont mélangé avec 1.25 ml de la solution tampon

phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 1.25 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. après, 1.25 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min. 1.25 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1.25 ml d'eau distillée et 250ml $FeCl_3$ (0,1%).L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

I.3.3.3.Test d'hémolyse

Ce test vise à déterminer dans quelle mesure l'extrait végétal des globules rouges est protégé de l'explosion après exposition aux substances oxydantes et aux radicaux libres, en mesurant le pourcentage de residu dissous .Ce test est basé sur des globules rouges sains, qui sont obtenus après dilution avec de l'eau distillée et en utilisant le dispositif centrifuge à la vitesse 3000 tours pendant 10 minutes.

- **Mode opératoire**

Comme indiqué au (Abirami et *al*.,2014)on a pris 40 µl de globules rouges, ajout de 2 ml de différente concentrations d'extraits d' *Ephédra alata* et garder pendant 5 min à 37° c, puis ajouter au mélange 40 µl de la solution de peroxyde H_2O_2 (30 mmol), chlorure fer $FeCl_3$ (80 mmol) et de solution d'acide ascorbique (50 mmol), puis laisser le mélange pendant une heure dans l'incubateur à une température de 37 °C, puis transporté à la centrifugeuse et placé à la vitesse de 700 tour/min pendant 10 min, puis lire l'absorbance optique à la longueur d'onde de λ = 540nm. Le taux de décomposition des globules rouges est calculé selon la loi suivante:

% Hémolyse = [Abs contrôle /Abs échantillon]×100

I.3.4.Analyse chromatographique par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance)

L'HPLC est la technique séparative la plus fréquente qui permet la caractérisation des composés polyphénoliques (Gomez-Caravaca et *al*., 2006).

La chromatographie liquide à haute performance est la méthode la plus largement utilisée pour séparer et identifier les mélanges complexes en peu de temps, et la plus récente pour déterminer les espèces phénoliques dans les échantillons étudiés (Jiri et *al*., 2013). Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la

phase stationnaire et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme (Cuq, 2001).Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire.

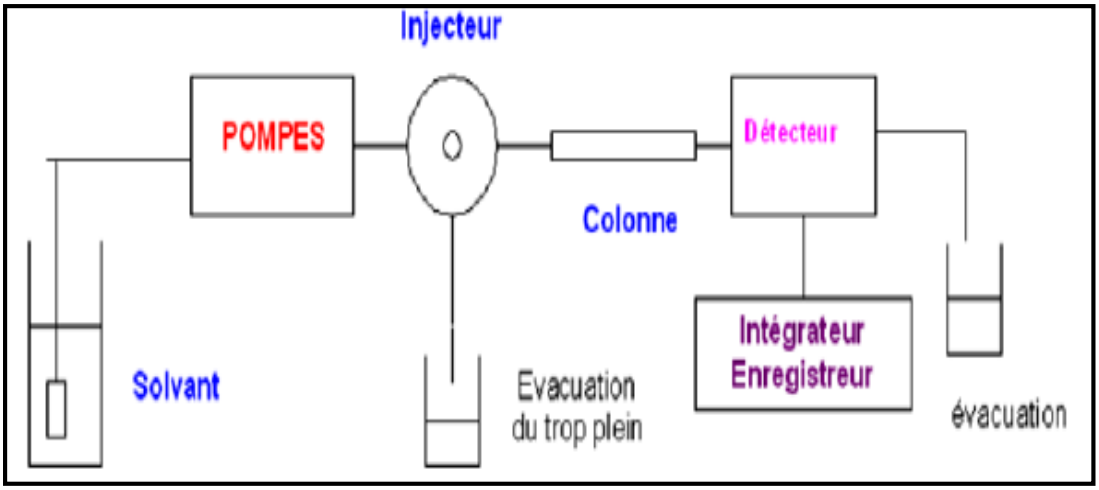


Figure 15: Différentes parties d'une chaîne HPLC (Brière, 2001).

- **Instruments et conditions chromatographique**

L'analyse a été réalisée par un HPLC (Shimadzu LC 20 AL), équipé avec un injecteur (Hamilton 25µl) et un détecteur (Shimadzu SPD 20 A). Cette chromatographie a été utilisée pour identifier les composants non volatils qui sont affectés par la température élevé (Folley and Crown, 1991).

- **Principe**

D'après (Ojeila et *al.*,2010). 20 µl de chaque extrait (1mg/ml) ont été injectés sur une colonne qui contient le gel de silice comme une phase stationnaire. La phase mobile est constituée d'un mélange de l'acétonitrile et l'acide acétique (0,1%). Le gradient d'élution appliqué est de type linéaire . Le débit est de 1ml / min. La détection a été effectuée par un détecteur UV visible à une longueur d'onde de 268 nm.

Les différentes molécules analysées ont été identifiés par comparaison avec les temps de rétention obtenus par des témoins .

I.4. Etude *in vivo*

I.4.1. Evaluation de l'effet protecteur provoquée par Triton X-100 (suite à une hyperlipidémie)

I.4.1.1. Protocol expérimental

Dans ce test, les rats ont été répartis en 4 groupes de 6 animaux chacun:

- Le 1ergroupe des rats a reçu par gavage d'eau. Il s'agit de **groupes témoins (Te)**.
- Le 2ème groupe des rats a reçu par gavage une solution de l'extrait méthanolique des *Ephédra alata* dissout dans l'eau à raison de 50 mg/kg de poids corporel. Il s'agit de **groupes EM*E. alata***.
- Le 3ème groupe des rats a reçu par injection une seule dose de Triton X-100 (100 mg / kg pc) dissout dans l'eau (Gundamaraju et *al*., 2014). Il s'agit des **groupes Hyp.**
- Le 4ème groupe des rats prétraité d'une manière journalière avec l'extrait méthanolique d'*E.alata* par gavage à l'ordre de 50 mg/kg puis traités par injection avec une dose de Triton X-100 (100 mg / kg pc). Il s'agit de groupe **EM*E. alata* + Hyp**.

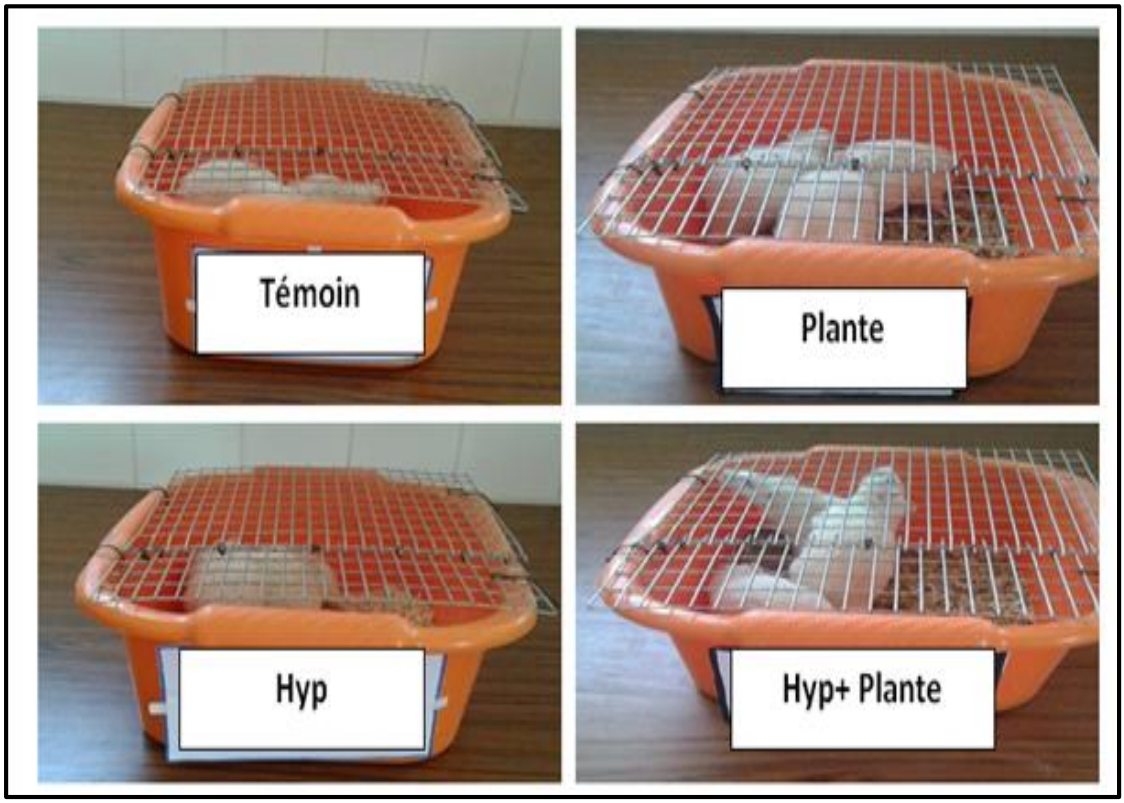


Figure 16: Protocol expérimental de l'effet protecteur provoquée par Triton X-100 (suite à une hyperlipidémie) .

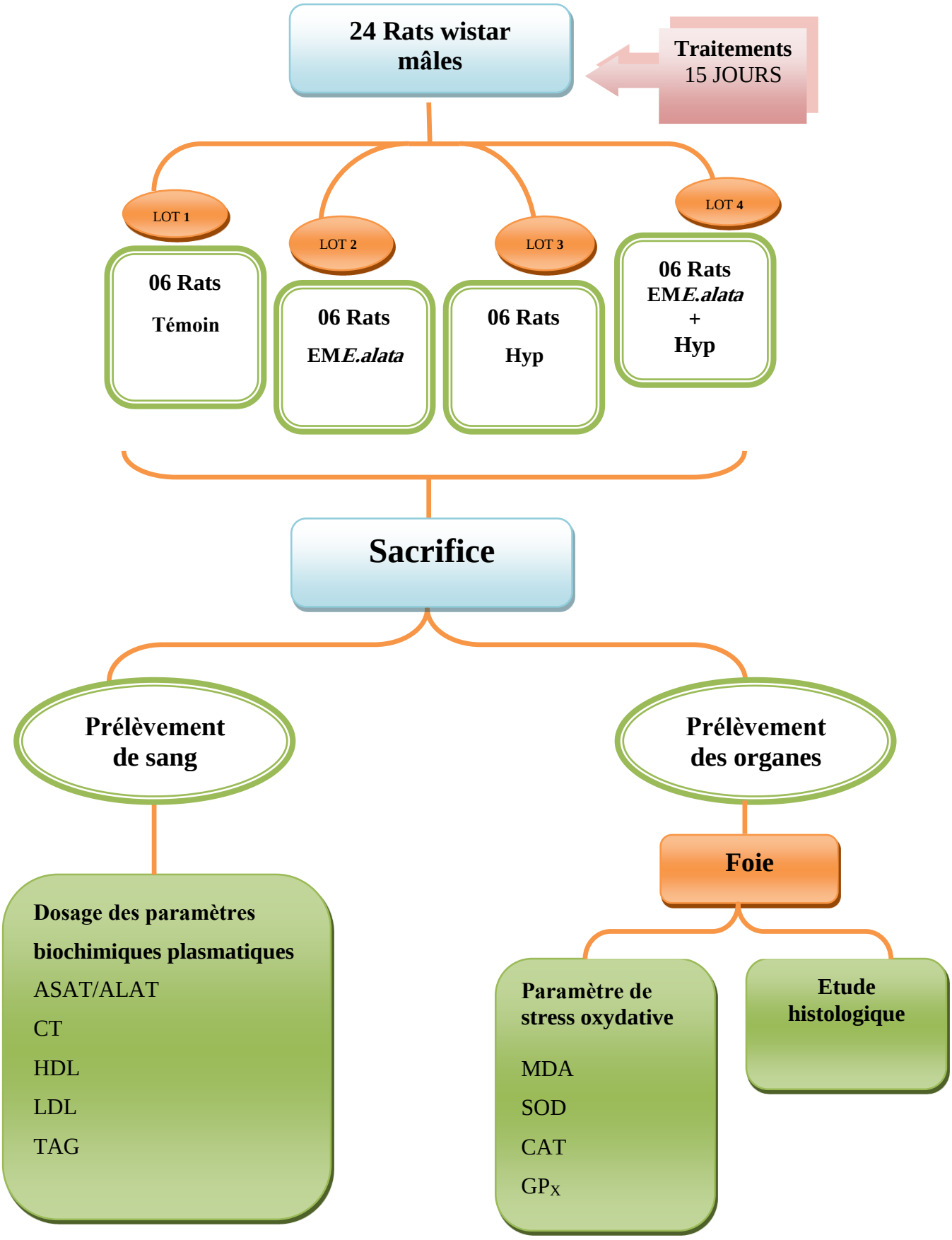


Figure 17: Protocol expérimentale de l'étude anti-hyperlipidémie**.**

I.4.1.2. Sacrifice et prélèvements

I.4.1.2.1. Sacrifice

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation sans anesthésie pour éviter tout état de stress. Le sacrifice des animaux de différents groupes étudiés a été réalisé à la même heure pour éviter les variations dues au rythme circadien.

I.4.1.2.2.Prélèvement sanguin

Le sang a été récupéré dans des tubes avec EDTA puis centrifugée pendant 15 min à 4000 tours/minute. Le plasma a été prélevé et congelé à -18 °C jusqu'à son utilisation pour le dosage de certains paramètres biochimiques et enzymatiques.

I.4.1.2.3. Prélèvement des organes

Le foie a été prélevé et pesé. Une partie de cet organe a été fixée dans du Bouin alcoolique pour réaliser les études histologiques, l'autre partie a été congelée à -80 °C pour l'étude du stress oxydant.

I.4.1.2.4.Évaluation du stress oxydant

a. Extraction du cytosol

Des fragments du foie (1 g) ont été broyés dans 2 ml de tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turax. Les contenus des tubes ont été centrifugés à 10000 tours/min à froid durant 10 minutes afin de récupérer le cytosol (surnageant) qui servira, par la suite, pour le dosage de TBARS, des protéines et de l'activité du catalase (CAT), du superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx).

b. Dosage des protéines totales tissulaires

Le dosage des protéines cytosoliques a été réalisé par la méthode de Lowry et *al*. (1951). A 200 µl d'extrait dilué, 2 ml de mélange réactionnel (Na_2CO_3 2% dans NaOH 0.1 N (4g/l), tartrate double de Na, K 2% et $CuSO_4$1% dans les proportions (50V/1V/1V), 200 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma) préalablement dilué au ½ avec l'eau distillée et maintenu à 4°C à l'obscurité) ont été ajoutés. Après agitation au vortex, les tubes ont été mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. Le réactif de Folin produit ainsi un complexe soluble, de couleur bleue, dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. La quantité de protéines, correspondant à chaque densité optique mesurée a été calculée en µg/ml, à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec une solution de sérum d'albumine bovine (BSA) à 0,5 mg/ml.

c. Dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires

La mesure du niveau de la peroxydation lipidique (LPO) a été estimée par la mesure des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) comprenant des aldéhydes (dont le MDA) et les lipides hydroperoxydés (Buege et Aust, 1978). Le Malondialdéhyde ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique.

Dans des tubes en plastique et à froid, ont été introduits, dans l'ordre :

- 125 µl d'homogénat ou 125 µl de TBS (Tube blanc),
- 50 µl de tampon TBS pH 7,4,
- 125 µl de TCA–BHT, pour déprotéiniser le cytosol.

Le contenu des tubes a été bien mélangé puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes. 200 µl de surnageant (S) ont été prélevés de chaque tube et 40 µl de HCl (0,6 M) et 160 µl Tris-TBA (solution 2) ont été additionnés. Les mélanges ont été mélangés de nouveau puis incubés à 80 °C pendant 10 min. La lecture des densités optiques a été faite à 530 nm. Cette densité optique, correspondant à la formation du complexe (TBA–MDA), est directement proportionnelle à la concentration de MDA.

d.Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes tissulaires

d.1. Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

La méthode proposée par Marklund et Marklund (1974) a été utilisée pour le dosage de l'activité SOD. Le mode opératoire pour le dosage de l'activité SOD est résumé dans le tableau5. La densité optique (DO) a été mesurée à 560 nm

d.2. Détermination de l'activité catalase (CAT)

La méthode proposé par Aebi (1984) a été utilisé pour estimé l'activité de la catalase (CAT) en utilisant un spectrophotomètre UV visible (JENWAY 6105). La variation de la densité optique a été mesurée à 240 nm. En faite cette variation dépend de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène

Tableau 5: Mode opératoire du dosage de l'activité de la SOD

	Essai	**Blanc**
EDTA+ Met (0.1Mm EDTA)	1000µl	1000µl
Tampon phosphate (Met13mM)	892.2µl	892.2µl
Echantilion		50µl
Tampon phosphate (50mM)	1000µl	950µl
NBT (75µM)	85.2µl	85.2µl
Riboflavine (2µM)	22.6 µl	22.6 µl

En faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7,4 un volume de 200 µl de H_2O_2 (500 mM) et 20 µl de l'extrait à une température d'incubation de 25 °C.

d.3. Détermination de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité GPx a été déterminée en utilisant la méthode décrite par Flohe et Gunzler (1984). Le mode opératoire pour le dosage de l'activité SOD est résumé dans le tableau 6. L'activité GPx a été mesurée à 412 nm.

Tableau 6: Mode opératoire du dosage de l'activité de la GPx

	Essai	**Blanc**
Echantillon	200 µl	200 µl eau distilé
GSH réduite (0.1 mM)	400 µl	400 µl
Tampon PO_4	200 µl	400 µl
Incubation au bain marie à 25 C° (5 min)		
H_2O_2 (1.3 mM)	200 µl	200 µl
Laisser 10 min au repos		
TCA (1 %)	1ml	1ml
Mettre 30mindans la glace Centrifugation à 3000 tours /min (10min)		
Surnageant	480 µl	480 µl
Na2HPO4 (0.32M)	2.2 ml	2.2ml
DTNB (1mM)	320 µl	320 µl

I.4.1.2.5.Dosage des paramètres biochimiques plasmatiques

a.Exploration des enzymes hépatiques

Les paramètres évaluant la fonction hépatique mesurés dans cette étude dans le plasma sont l'aspartate aminotransférase (ASAT), et l'alanine aminotransférase (ALAT),

- **L'activité aspartate aminotransférase (ASAT)**

Le dosage est effectué par la méthode cinétique colorimétrique NADH sans phosphate de pyridoxal à l'aide du réactif aspartate aminotransférase Architect/Aeroset (Réf : 7D 81-21) de la maison ABBOTT.

La détermination de cette activité se fait selon le schéma réactionnel suivant :

$$\alpha \text{ cétoglutarate} + \text{L-Aspartate} \xrightarrow{\text{Aspartate aminotransférase}} \text{L-Glutamate} + \text{oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacétate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MalateDéhydrogenase}} \text{Malate} + NAD^+$$

La diminution de la concentration en NADH (révélée par la diminution de l'absorbance à 340 nm) est directement proportionnelle à l'activité aspartate amino transférase dans l'échantillon. La concentration en ASAT est déterminée selon la formule suivante :

[ASAT] U/I= DO/min×1750.

- **L'activité alanine aminotransferase (ALAT)**

L'activité de l'ALAT est déterminée par la méthode cinétique NADH sans phosphate de pyridoxal à l'aide du réactif ALAT Architect/Aeroset (Réf : 7D 56-21) de la maison ABBOTT. La détermination de cette activité se fait selon le schéma réactionnel suivant :

$$\text{L-Alanine} + \alpha\text{ cétoglutarate} \xrightarrow{\text{Alanine aminotransférase}} \text{Pyruvate} + \text{L-Glutamate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{Lactate Dehydrogénase}} \text{Lactate} + NAD^+$$

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine amino transférase dans l'échantillon. Les densités optiques ont été mesurées à 340 nm. La concentration en ALAT est déterminée par la formule suivante :

[ALAT] U/I = DO/min × 1750

b.Dosage des paramètres plasmatiques lipidiques

- **Dosage du cholestérol total**

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique au cholestérol oxydase à l'aide d'un Kit provenant de Biolabo, France (Réf. 80106).

Le cholestérol a été dosé selon le principe suivant :

$$\text{Esters de cholestérol} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholestérol estérase}} \text{Cholestérol} + \text{Acides gras}$$

$$\text{Cholestérol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholestérol oxydase}} \text{Cholestène-4-one-3} + H_2O$$

$$H_2O_2 + \text{Phénol} + \text{Amino-4-antipyrine} \xrightarrow{\text{Péroxydase}} \text{Quinoneimine rose}$$

L'intensité de la coloration rose est proportionnelle à la concentration en cholestérol. Les densités optiques ont été mesurées à 505 nm et la stabilité de la coloration est de 30 minutes environ.

La concentration des échantillons en cholestérol est évaluée à l'aide de l'équation suivante :

[Cholestérol Total] = [DO (Echantillon)/ DO (Standard)]* n (Concentration du réactif standard)

- **Dosage du triglycéride**

Le dosage de triglycéride est déterminé par la méthode cinétique para-nitrophenyl phosphate en utilisant le réactif triglycéride (Architect/Aeroset Réf : 7D 55-21/-31) de la maison ABBOTT.

- **Dosage du HDL-cholestérol**

Le dosage du HDL-Cholestérol a été réalisé par une méthode enzymatique à l'aide d'un Kit provenant de Biolabo, France (Réf. 90206). Les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) contenus dans l'échantillon sont précipités par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Le surnageant obtenu, après centrifugation, contient les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont le cholestérol est dosé par le réactif cholestérol enzymatique. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en HDL-cholestérol. Cette coloration est évaluée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 500 nm.

La concentration en HDL-Cholestérol est évaluée par la formule suivante :

[Cholestérol-HDL] = [DO (Echantillon)/ DO (Standard)]* n (Concentration du réactif standard)

- **Dosage du LDL-Cholestérol**

Le taux plasmatique en LDL-Cholestérol est déterminé par simple calcul en se basant sur la formule de Frielwald

[LDL-Cholestérol] = Cholestérol total - [(Triglycérides/5) + HDL-Cholestérol]

I.4.1.2.6. Etude histologique

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la technique décrite par Gabe (1968) comportant les étapes suivantes :

- **Fixation:**

La fixation des organes après prélèvement se fait rapidement dans une solution de formol à 4% durant 48 h.

- **Déshydratation:**

Elle est réalisée dans les bains d'alcool:

1-Des bains d'alcool éthylique 70° jusqu'à avoir un liquide clair ;

2-Un bain d'alcool éthylique 95° de 1 h;

3-Trois bains d'alcool butylique de 3 h chacun.

- **Inclusion:**

Elle est réalisée à une température de 58-60 °C dans les bains suivants:

1- Butyle paraffine pendant 2 h;

2- Paraffine pendant 2 h 30;

3- Paraffine pure et filtrée 3 h, puis une nuit;

4- La mise en blocs des organes dans de la paraffine pure et filtrée se fait le matin.

- **Préparation des coupes :**

Les coupes de paraffine sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica) à une épaisseur de 6 µm et les coupes congelées.Elles sont ensuite collées sur des lames par l'albumine glycérinée.

- **Déparaffinage des coupes :**

Elle se fait sur plaque chauffante puis avec deux bains de toluène (2×15min) et deux bains d'alcool absolu 100° (2×5min). Les coupes sont ensuite réhydratées par des rinçages, une fois à l'eau de robinet et par deux fois à l'eau distillée.

- **Coloration à l'hématoxyline-éosine:**

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant cationique, dit également basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement (= anioniques ou acides) dits basophiles. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. Au contraire, l'éosine est un colorant anionique, dit également acide, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement (= cationiques ou basiques) dits éosinophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie.

- **Coloration au rouge huile O :**

Le rouge huile O est un colorant pour la mise en évidence des lipides dans des coupes histologiques animales. La coloration avec l'huile rouge O met en évidence tous les lipides. Il faut utiliser des coupes à congélation, car les solvants utilisés dans le processus histologique et lors du déparaffinage pourraient dissoudre les lipides.

- **Le collage des lamelles sur les lames:**

le collage des coupes paraffinées a été réalisé à l'aide du baume de canada. Tandis que le collage de coupes congelées sur des lames gélatinées est assuré par du glycérol. Les préparations ont été ensuite séchées dans une étuve à 20°C pendant 10mn, puis observées au microscope optique (Leitz Dialux E22) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique assisté par ordinateur. Les photos sont traitées par le logiciel ″Adobe photoshop 5,5.

- **Quantification**

L'évaluation de l'hyperlipidémie au niveau du foie a été étudiée semi-quantitative en se référant sur les gouttelettes lipidiques teinté en rouge par le colorant rouge huile O, en utilisant un système d'analyse d'image informatisée par le logiciel image J. Dix domaines ont été sélectionnés aléatoirement à partir de chaque section de six rats dans chaque groupe. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de dépôts lipidiques selon la méthode de Feriani et *al*., 2018.

I.4.2. Pouvoir analgésique: Test du Writhing

L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique chez les rats induit une sensation de douleur qui se manifeste par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales. L'effet analgésique est apprécié par le dénombrement de ces crampes pendant 30 minutes après l'injection de l'agent algogène.

Quatre lots de six rats, mises à jeun 16 heures avant l'essai, ont reçu par voie orale respectivement l'extrait méthanolique d'*E. alata* aux doses de 50 mg/kg de pc, l'indométacine (10 mg/kg de pc) et l'eau distillée (5 ml/kg). Une heure après l'administration des substances, chaque rats a reçu par voie intra-péritonéale de l'acide acétique (0,1%). Trente minutes après cette injection, le nombre de contorsions abdominales par rats a été compté pendant 15 minutes. L'effet analgésique a été évalué en utilisant la formule suivante :

% d'inhibition des crampes= [Moyenne témoin – Moyenne essai] / Moyenne témoin. (Koster et *al*., 1959)

I.4.3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. L'analyse des données a été effectuée par application du test T de Student, qui est basé sur la comparaison entre deux moyennes, en utilisant le logiciel SPSS et EXCEL (Version 2010) dont on s'est servit pour réaliser les testes ainsi qui les courbes.

Chapitre II

Résultats et Discussions

II.1.Etude *in vitro*

II.1.1. Rendements des extraits

Les valeurs obtenues du rendement des différents extraits sont représentées dans le tableau suivant (tableau 7).

Tableau 7: Rendements des extraits d'*Ephedra alata*.

Extraits	Solvants utilisés	Rendement%
Extrait brut	Méthanol	12.26
Flavonoïde	Acétate d'éthyle	1.08
Tanins	Acétone/eau / Acétate d'éthyle	0.227

Les résultats de rendements des extraits le plus élève a enregistré en l'extrait brut (12.26 %) et celui l'extraits de flavonoïdes (1.08%) et suive les tanins (0.22%).

Notre plante a une rendements plus proches à celui trouvé par (Gouasmia et Zoubiri, 2017),mais plus (faible)de ceux trouvé par (kebili , 2016) pour la mémé plante .

Cette variabilité est due à plusieurs facteurs: l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Mohammedi, 2013).

II.1.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

II.1.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (AG) par gramme de l'extrait (mg ЄAG/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (figure 18).

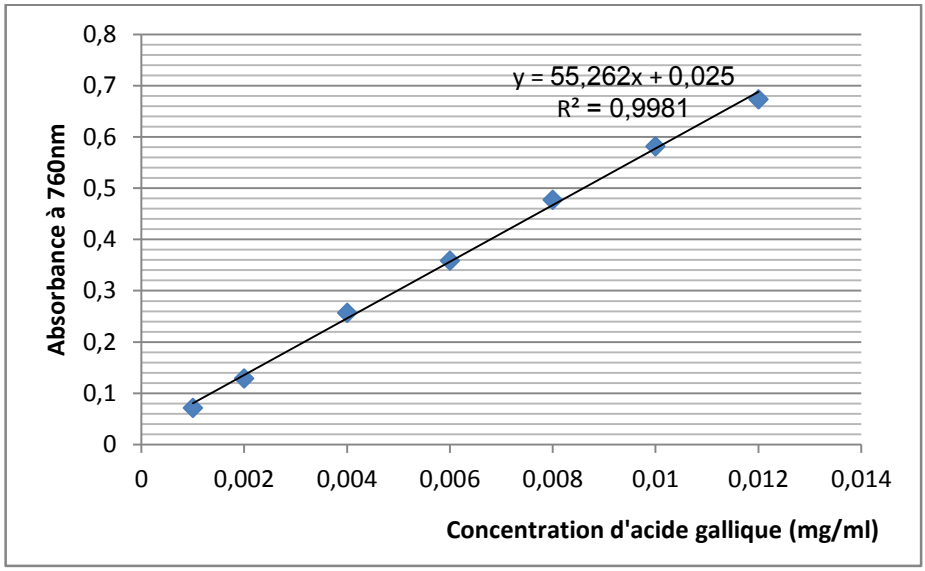


Figure 18: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

D'après l'histogramme illustré dans la (figure 19) on observe que la polyphénols totaux contient une teneur (178.744 ±83.297mg ЄAG/g Extrait).

La teneur élevé en polyphénols dans l'extrait méthanolique est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires (Ghedadba et *al*., 2014).

Les résultats révèlent que la teneur de polyphénoles est très importante et dépasse celle trouvé par (Gouasmia et Zoubiri, 2017) qui ont étudié la même espèce récoltée de la région d'Oued Souf, Cette variabilité est due à plusieurs facteurs: l'organe analysé, les conditions de séchage et la période de la récolte .

D'autre part cette teneur inférieur à celle rapportée par Kebili (2016) qui est (291.45±4.37 mg ЄAG/g Extrait) pour même plante de la région d'Ouargla cette variation peut être liée à la distribution des métabolites secondaires, qui se changement pendant le développement de la plante, la stress environnemental, (sécheresse, pauvreté de sol en nutriments) ainsi que le fort ensoleillement, peuvent contribuer à l'augmentation du niveau de la production des composés phénoliques dans certaines plantes (Timmermann et *al*., 1984).

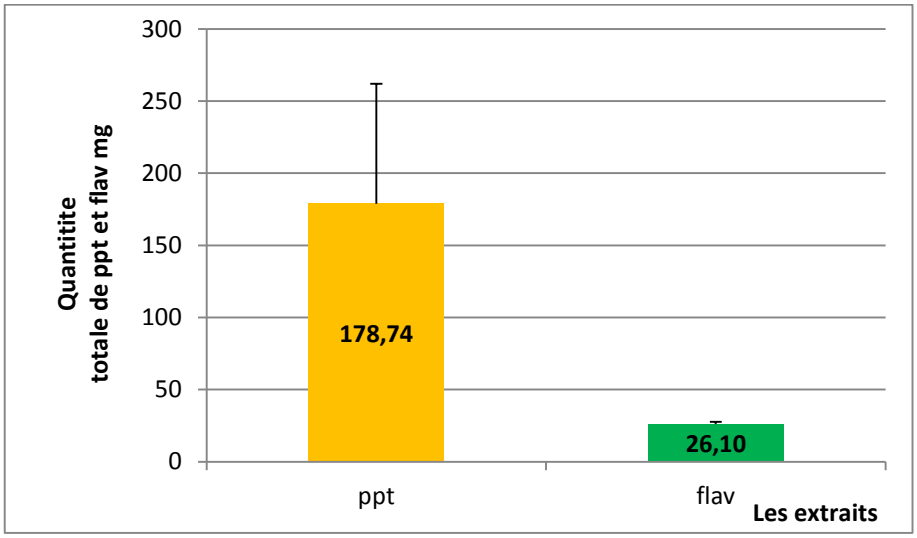


Figure 19: Teneurs des polyphénols totaux et flavonoïdes.

II.1.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par Abdou Bouba et *al (*2010). La quercitine considérée comme standard a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, dont on a utilisé pour teneur de flavonoïdes qui est exprimé en mg équivalent de quercitine (Qu) par gramme de l'extrait (figure 20).

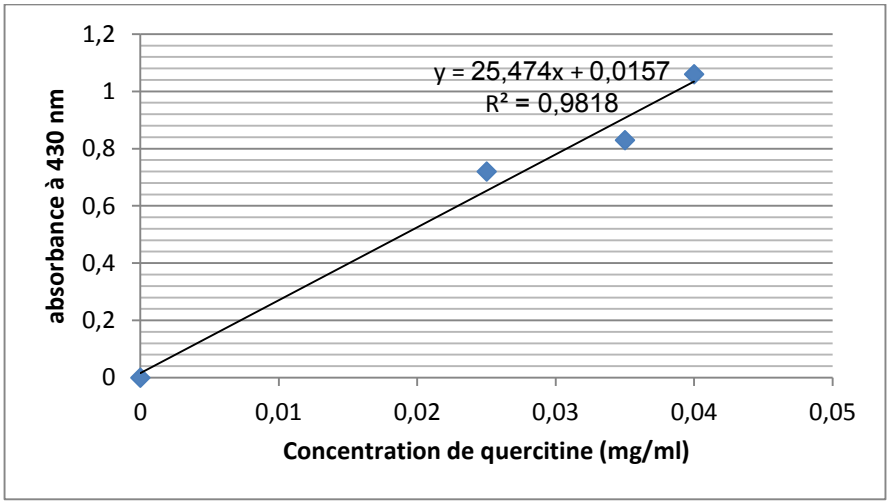


Figure 20: Courbe d'étalonnage de quercétine.

La teneur obtenue (figure 19) de flavonoïde à une valeur de (26.101±1.558 mg ЄQu/g Extrait). Ce résultat quantitatif est inférieur à celui trouvé par Nesba et Henka(2018) qui est (30.60±0.97 µg EQ/mg Extrait) .

Cette variabilité est due à plusieurs facteurs: les conditions de séchage, d'extraction en terme de méthode, temps, température, granulométrie, solvant, nombre

d'étapes d'extraction, l'expression des résultats et l'état et la provenance géographique (Luthria, 2008).

II.1.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée par des tests: DPPH•, réduction du fer et hémolyse.

II.1.3.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts, flavonoïdes et de tanins. Dans ce test, on utilise l'acide ascorbique comme standard. L'IC_{50} de chaque extrait est déduit à partir de l'équation de régression correspondant à sa courbe d'étalonnage est exprimée en µg/ml. Les résultats sont représentés graphiquement sur histogramme (figure 21).

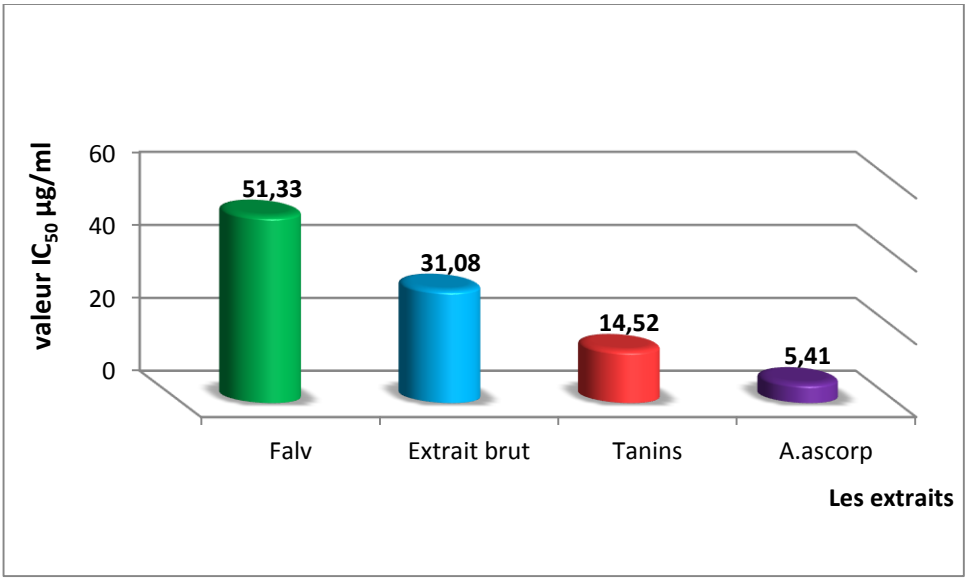


Figure 21: les valeurs d'IC_{50} des différents extraits et acide ascorbique en (µg/ml).

D'après l'histogramme illustré dans la (figure 21), qui représente l'IC_{50} des différents extraits et le standard (acide ascorbique), nous remarquons que les valeurs des IC_{50} des extraits sont de l'ordre de 14.52 µg/ml, 31.08 µg/ml et 51.33 µg/ml, pour les tanins ,l' extrait brut et les flavonoïdes respectivement. Un pouvoir anti-radicalaire remarquable pour les tanins comparé avec les autres. Concernant nos résultats, l'acide Ascorbique présente un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à nos extraits.

Dans une étude similaire sur l'extrait d'*Ephedra alata* les chercheurs ont signalé une valeur d'IC_{50} 0.901mg/ml (Gouasmia et Zoubiri,2017) cette valeur plus élevé indiquant une activité antioxydant plus faible comparée à notre étude, parce qu'il y a une corrélation directe

entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim et *al.*, 2001; Jeong et *al*., 2004).

Les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).

II.1.3.2. Réduction du fer

C'est une activité antioxydants rapide, reproductible et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+}. La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants. Dans notre travail nous avons opté pour tester les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés (figure 22)

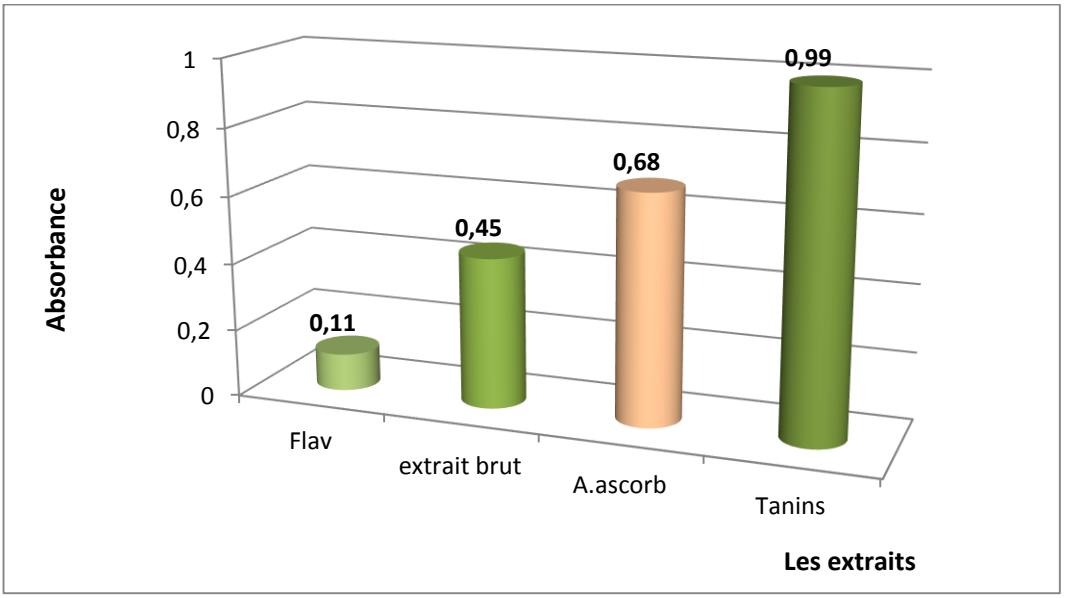


Figure 22: Pouvoir réducteur des différents extraits et de l'acide ascorbique (avec une concentration de **1mg/ml** pour chacun **).**

Nous avons remarqué dans la (figure 22) une augmentation proportionnelle de la réduction du fer avec l'augmentation des concentrations des extraits étudiées (reflétée par l'augmentation des absorbances). Comme nous avons voir que le extrait de tanin présente une activité réductrice du fer la plus élevée par rapport aux autres, car à la présence des réducteurs dans l'extrait provoque la réduction de Fe^{3+}/ complexe ferricyanide à la forme ferreux Fe^{+2}.

Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inti activateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur

significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong et *al*.,2004 ; Kumaran et Karunakaran ,2007).

II.1.3.3.Test hémolyse

Pour estimation de l'activité antioxydants des extraits végétaux étudiés in vivo, le teste d'hémolyse a été adopté comme le test le plus facile et rapide, on a déterminés le pourcentagede décomposition des globules rouges dans le cas de chaque extrait. L'efficacité est estimée en fonction de l'activité de l'acide ascorbique (figure 23) comme référence standard.

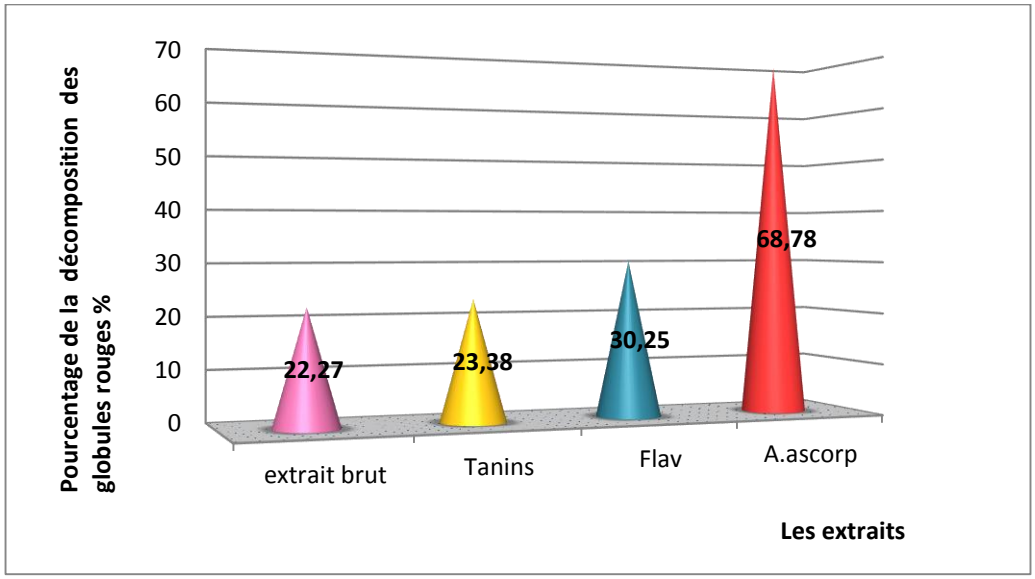


Figure 23: Les pourcentages d'hémolyse des globules rouges des différents extraits et de l'acide ascorbique(avec une concentration de **1mg/ml** pour chacun).

Les érythrocytes sont considérés comme la cible majeure des radicaux libres en raison de la présence d'une concentration élevée d'acides gras polyinsaturés (AGPI), tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique. Le taux d'hémolyse a été montré beaucoup plus élevé lorsque les globules rouges sont traités par le peroxyde d'hydrogène. Cela pourrait être attribué à la nature oxydante du peroxyde d'hydrogène et sa capacité à détruire la membrane cellulaire et en conséquence la libération de l'hémoglobine des cellules. Le peroxyde d'hydrogène peut également causer une toxicité par le radical hydroxyle: selon Kose et Dogan (1995) le H_2O_2 peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine libérant ainsi les ions Fe^{2+} ce qui génère par la réaction de fenton le radical hydroxyle OH, plus puissant contribuant ainsi à la peroxydation lipidique. L'activité anti-hémolytique des extraits de plantes peut être due à l'inhibition du radical par les composés bioactifs de l'extrait qui libèrent des électrons à H_2O_2 neutralisant ainsi une molécule d'eau (Larab et Makhlouf ,2017). Dans notre étude, l'effet protecteur des globules rouges à la concentration de 1 mg/ml est proche dans tous les

extraits, à l'exception de l'extrait brut qui présente la valeur de dégradation la plus faible (la meilleure protection de érythrocytes).

Cette différence d'activité pourra être due à l'effet de la solubilité des composés dans le milieu réactionnel (Maamri, 2008) ,Donc les polyphénols présentent un effet anti-hémolytique et protège les hématites contre le H_2O_2(Larab et Makhlouf ,2017).

II.1.4.Analyse chromatographique par HPLC (Chromatographie liquide à haute performance)

Le résultat de séparation d'extrait méthanolique de la plante *Ephedra alata* par la chromatographie liquide à haute performance HPLC est illustré dans la chromatogramme ,(figure 24).

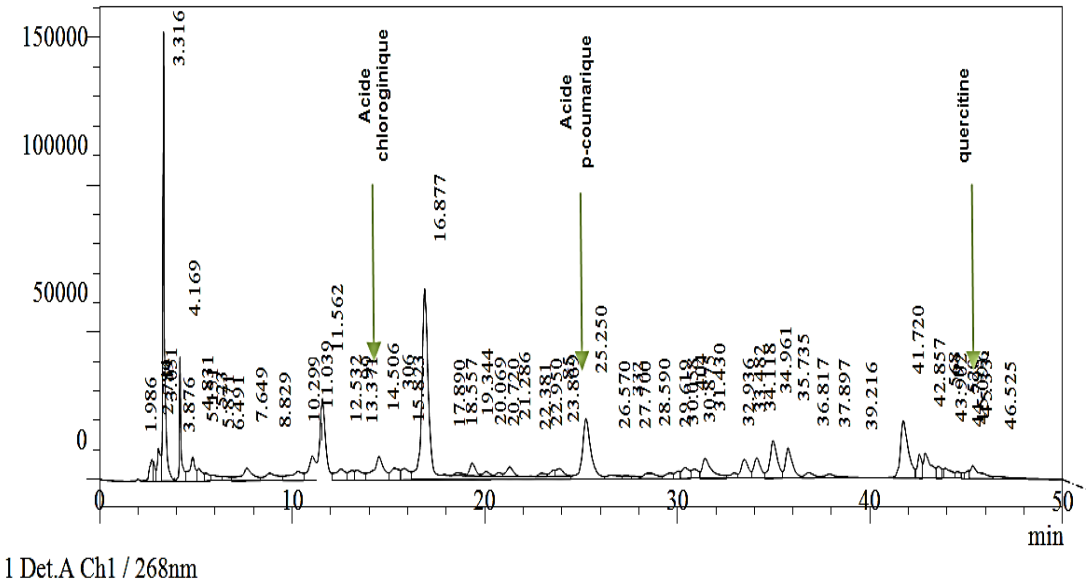


Figure 24: Profil chromatographique par HPLC d'extrait brut méthanolique d'*Ephedra alata*.

Le temps de rétention des standards enregistré dans le tableau 8.

Tableau 8: Temps de rétention et la concentration des standards utilisés .

Temps de retention(min)	Composants	Concentration (µg/mg extrait)
13.371	acide chloroginique	0.926
23.869	acide p-coumarique	0.278
45.096	quercitine	0.166

La comparaison des temps de rétention (tableau 8) des standards avec ceux enregistrés dans la chromatogramme (tableau;Annexes1) pour l'éxtrait méthanolique a permis d'identifier certains composés phénoliques dans notre l'extrait .

L'HPLC a permis d'identifier trois polyphénols dans le extrait brut de la plante *Ephédra alata* ,l'acide chloroginique, acide p-coumarique et quercitine. De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des composés polyphénoliques dans le extrait d'*Ephédra alata* par analyse HPLC (Hegazi et El-Lamey, 2011 ; Mighri et *al*.,2017).

Ces études sont en accord avec nos résultats, malgré les différences géographiques des sites étudiées, nous constatons que la plante *Ephédra alata* a les mêmes profils phénoliques. Cela montre qu'il n'y a pas de différence qualitative significative.

II.2. Etude *in vivo*

II.2.1. Evaluation de l'effet protecteur provoquée par Triton X-100 (suite à une hyperlipidémie)

II.2.1.1. Variations des biomarqueurs enzymatiques hépatiques au niveau du plasma

Des nombreuses enzymes sont présentes dans le foie. Les plus couramment utilisés dans le diagnostic sont : l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT), qui sont des transaminases connus comme marqueurs d'hépato-toxicité par des produits chimiques (Govindwar et Dalvi, 1990).

Les effets de la Triton X-100 et de l'*Ephédra alata* sur le bilan hépatique chez les différents lots étudiés sont représentés dans la figure 25 .

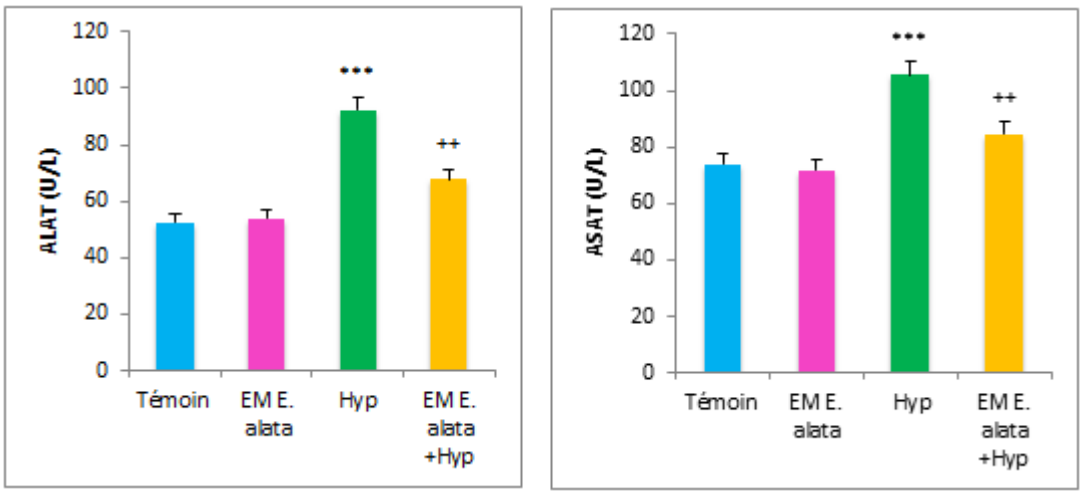


Figure 25: Variations des enzymes ALAT et ASAT chez le groupe témoin et les différents groupes expérimentaux.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type pour les groupes de 6 animaux chacun.
Les valeurs sont statistiquement présentées comme suit:
***: p≤ 0.001 comparé au groupe témoin normal (Te).
$^{++}$: p≤0.01 comparé au groupe traité (Hyp)

.

L'analyse des résultats, présentés dans la figure 25 , a révélé que le Triton X-100 a induit une augmentation significative de l'activité de l'ALAT et l'ASAT, comparaison aux rats témoins. L'augmentation de l'activité de ces deux enzymes dans le plasma est habituellement l'indice d'une cytolyse hépatique (Gowri et *al*., 2008). L'augmentation de l'activité des aminotransférases (ALAT et ASAT) est un indicateur de fuite cellulaire et de défaillance de l'intégrité fonctionnelle de la membrane résultant de lésions hépatiques (Saraswat et *al*., 1993 ; Lin et *al*., 1996). Toutefois, chez le groupe traité parallèlement par Triton X-100 et EM*E.alata* (Hyp + EM*E. alata*) a restauré partiellement l'activité enzymatique sans rejoindre les valeurs de celle des témoins (Te) ou traité uniquement avec l'extrait *d'E.alata* (EM*E.alata*). Ceci implique un effet hépatoprotecteur potentiel de l'extrait d'*E.alata* probablement due à une éventuelle stabilisation de la membrane plasmique avec une répasourision des lésions tissulaires hépatiques provoquées par le toxique, comme il a été suggéré par d'autres auteurs (Ravikumar et Gnanadesigan, 2011).

II.2.1.2.Les paramètres lipidiques au niveau du plasma

Une hyperlipidémie aiguë chez des modèles animaux utilisant le Triton X-100 a été largement utilisé. Les perturbations du métabolisme des lipides pourraient être impliquées dans les maladies cardiovasculaires, MCV. L'hyperlipidémie jouent un rôle clé dans l'apparition et le développement de la pathogenèse du cœur et de l'infarctus du myocarde (Su et *al.*, 2006).

Les effets de la Triton X-100 et de l'*Ephédra alata* sur le bilan lipidique chez les différents lots étudiés sont représentés dans la figure 26 .

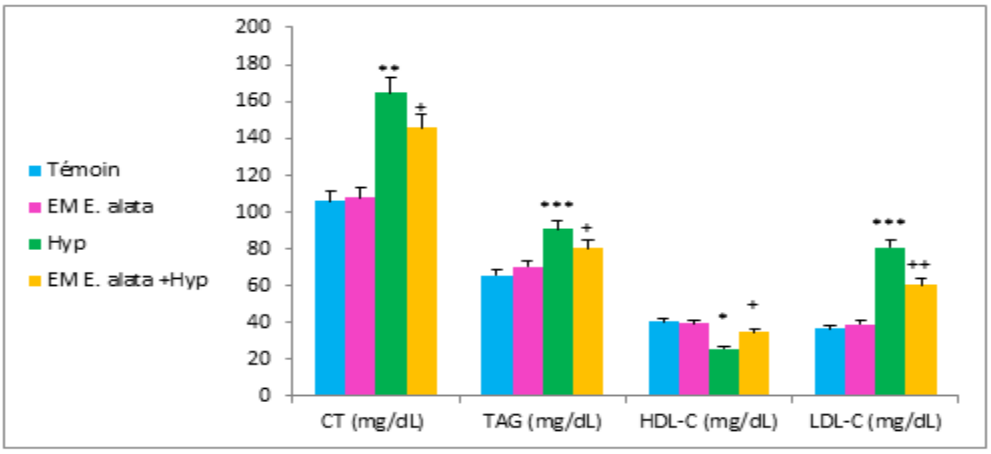


Figure 26: Variation de la concentration sérique en CT,TAG,HDL-C et LDL-C chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux**.**

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type pour les groupes de 6 animaux chacun.
Les valeurs sont statistiquement présentées comme suit:
*: p≤ 0.05 ; **: p≤ 0.01 et ***: p≤ 0.001 comparé au groupe témoin normal (Te).
$^{+}$ p≤0.05 ; $^{++}$: p≤0.01 comparé au groupe traité (Hyp)

Nos résultats ont montré que le Triton X-100 a induit une augmentation significative des concentrations de ces paramètres lipidiques au niveau du plasma chez les rats témoins .
Ces modifications du profil lipidique pourraient être attribuées soit à une hydrolyse accrue du triglycéride stocké via une activité lipase hormono-sensible stimulée par une protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate (AMPc) cyclique, soit à une biogénèse des lipides via l'AMPc cardiaque. Au contraire, chez le groupe (Hyp + EM *E. alata*), le co-traitement avec l'extrait d'*E.alata* a provoqué la restauration de ces paramètres dans le plasma. Cependant, il n'y avait aucune différence significative observée pour le taux de cholestérol total chez les rats traitées avec l'extrait d'*E.alata* seul par rapport au groupe témoin ($p \geq 0,05$). Cet effet anti-hyperlipidémique pourra s'expliquer par la capacité de cet extrait à favoriser l'inhibition de l'HMG-CoA réductase, à favoriser la réactivité, provoquant un effet hypolipémiant (Hao et *al*., 2011).

II.2.1.3.Evaluation du profil pro oxydant / antioxydant au niveau du foie

II.2.1.3.1.Dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires

Les effets de la Triton X-100 et de l'*Ephédra alata* sur les paramètres tissulaires du stress oxydatif chez les différents lots étudiés sont représentés dans la figure 27.

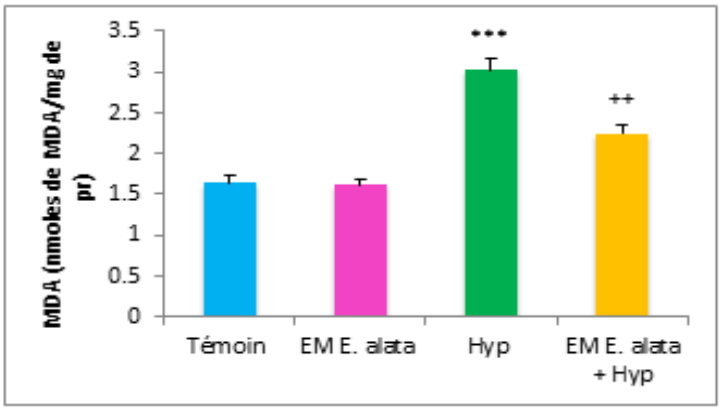


Figure 27: Variation de la Malondialdéhyde (MDA) dans le foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type pour les groupes de 6 animaux chacun.
Les valeurs sont statistiquement présentées comme suit:
***: $p \leq 0.001$ comparé au groupe témoin normal (Te).
$^{++}$: $p \leq 0.01$ comparé au groupe traité (Hyp).

L'analyse de ces résultats ont montré que chez les rats traités par le Triton X-100 les taux hépatiques en MDA augmentent de façon significative ($p < 0,001$) par comparaison à ceux du groupe témoin, ce qui suggère qu'il y a une augmentation de la production des radicaux libres.

Les conclusions actuelles sont en accord avec les résultats rapportés par Chargui et *al.*, (2012) et Abdel-Daim et *al.*, (2013). Les métabolites de l'oxygène hautement réactifs, en particulier les radicaux hydroxyles, agissent sur les acides gras membranaires, conduisant à la production de peroxydes lipidiques instables, qui tendent à se décomposer en produits tels que MDA (Esterbauer et *al.*, 1991).Toutefois, la co-administration journalière de l'extrait d'*E.alata* avec le Triton X-100 a abaissé significativement le taux de MDA ($p < 0,01$). Ce résultat attire l'attention sur un pouvoir antioxydant de l'extrait d'*E.alata* et encourage une analyse plus approfondie.

II.2.1.3.2.Variations de l'activité des enzymes antioxydantes tissulaires

La surproduction rapide des radicaux libres inhibe la désintoxication et la capacité de piégeage des enzymes antioxydants à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT), résultant des dommages aux macromolécules par la formation de lipo-peroxydes toxiques contribuant ainsi à l'hépatotoxicité cellulaire (Perry et *al.*, 2010).

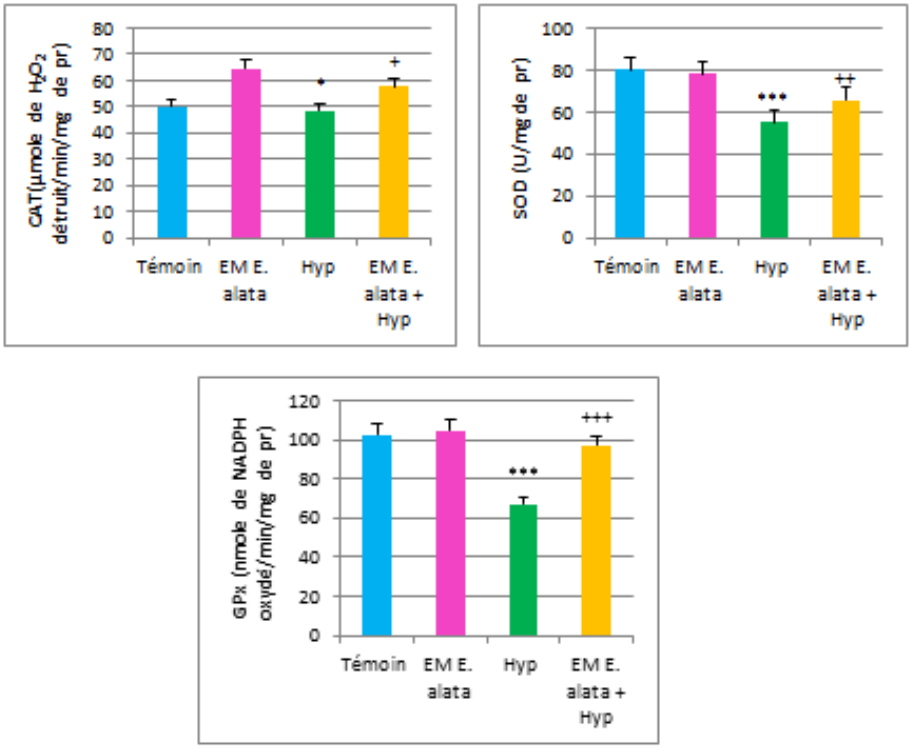


Figure 28: Variations de l'activité de SOD, CAT et GPx au niveau du foie chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux**.**

EM *E alata* : extrait méthanolique d'*Ephedra alata* , Hyp : Triton X-100.
Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type pour les groupes de 6 animaux chacun.
Les valeurs sont statistiquement présentées comme suit:
*: $p \leq 0.05$; ***: $p \leq 0.001$ comparé au groupe témoin normal (Te).
$^{+}$: $p \leq 0.05$; $^{++}$: $p \leq 0.01$ et $^{+++}$: $p \leq 0.001$ comparé au groupe traité (Hyp).

Les résultats dans l'histogramme 28 ont montré une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) chez les rats traités par Triton X-100 a été observée quand elles sont comparées aux cas témoins. Cette réduction des activités ne peut être due qu'à l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène qui conduit à des résultats néfastes, tels que diminution de l'intégrité de la membrane cellulaire et des pertes de fonction (Gundamaraju et *al*., 2014). Nos résultats sont en conformité avec les travaux de Abdou et *al.,* (2014) et Uchendu et *al.,* (2015) qui ont décrit une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes suite à l'exposition par le triton X-100 en raison de leur épuisement rapide par la production excessive des radicaux libres.

Les résultats ont montré également que le traitement aigu associé au prétraitement avec l'extrait *d'E alata* entraine une restauration nette de l'activité de ces enzymes et qui ce rapproche des valeurs notées chez les cas témoins. Cet effet protecteur pourrait être causé par l'effet indirect des molécules bioactives présente dans l'*E.alata* qui ont réduit les niveaux des espèces réactives d'oxygène. En effet, les molécules antioxydantes puissent réduire la peroxydation lipidique en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes endogènes (Bansal et *al.,* 2005 ; Tsai et *al.,* 2013).

II.2.1.4.Etude histologique

Des coupes histologiques ont été réalisées au niveau des tissus du foie pour avoir l'effet des substances actives de l'espèce *Ephédra alata* vis-à-vis de l'intoxication provoqué par Triton X-100.

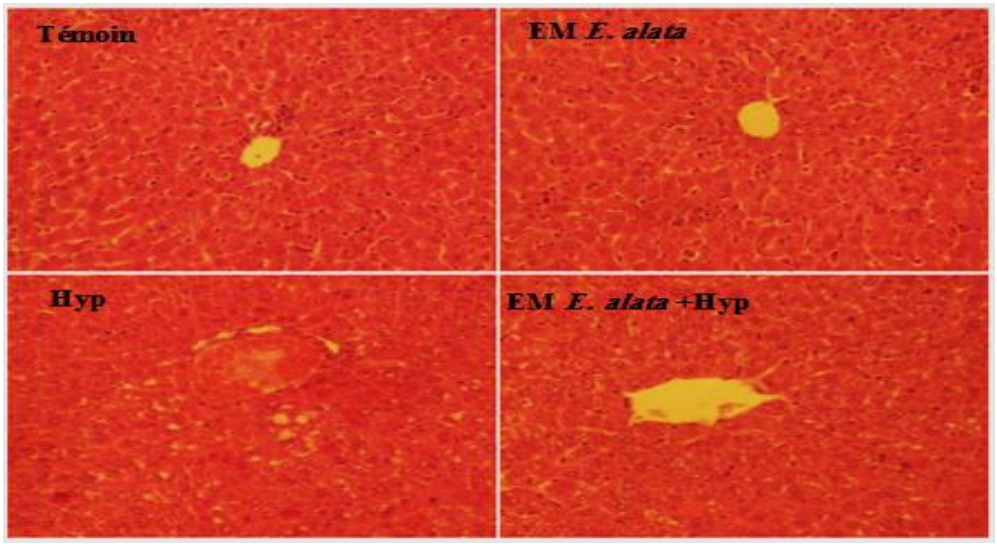


Figure 29: Observation microscopique d'une coupe histologique du foie (Exploration structurale) chez les rats de différents lots (X400) (Photos originales, 2019)

Témoin: lot des rats témoin . EM *E. alata*: lots des rats traité par extrait méthanolique *Ephédra alata* .Hyp : lots des rats traités par Triton X-100. EM *E. alata* +Hyp :lots des rats traité par extrait méthanolique *d'Ephédra alata* + Triton X-100 .

La figure 29 montre des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H-E) réalisées au niveau du foie chez différents groupes. Nos résultats montrent que chez les rats témoins (Te), le tissu hépatique se présente sous la forme de lobules hépatiques hexagonaux et chaque lobule est formé par des hépatocytes bien anastomosés qui sont disposés en travées aplaties autour d'une veine centro- lobulaire, et à la périphérie de chaque lobule naissent des sinusoïdes cheminant entre les lames hépatocytaires, menés chacun d'une cellule endothéliale rappelant une structure hépatique ordinaire. Cependant, les sections du foie chez les rats traités par le triton X-100 ont montré des changements remarquables, en comparaison avec ceux du témoins, reflétant la présence de certains hépatocytes disposés irrégulièrement et présentent une vacuolisation cytoplasmique, une hémorragie avec congestion de la veine centrale, une grande zone de nécrose, des espaces sinusoïdaux dilatés, un nombre élevé de cellules de kupffer, des infiltrations cellulaires au niveau de la veine centrale des lobules, ainsi que des foyers lipidiques. Des observations similaires ont été prouvées par Tlili et *al.*,(2017) ; El-haskoury et *al.*,(2018) et Sun et *al.*,(2018**)** lors du traitement des rats avec le tétrachlorure de carbone.

Toutefois, l'association de l'extrait méthanolique d'*E.alata* (EM *E. alata* +Hyp) a révélé une protection contre la toxicité du triton X-100, qui se traduit par l'amélioration des atteintes structurales mises en évidence chez les animaux traités au triton X-100 seule (Hyp), ainsi, nous avons noté une restauration de l'architecture des hépatocytes avec atténuation du nombre de dilatations sinusoïdales et régression des zones de nécrose et la restausourision du nombre de cellules de kupffer.

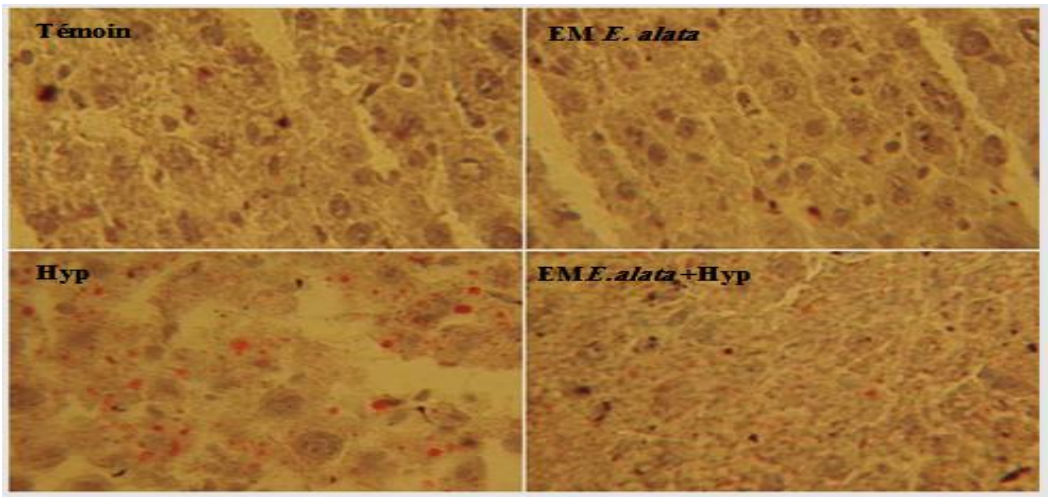


Figure 30: Observation microscopique d'une coupe histologique du foie (Exploration histologique du dépôt lipidique) chez les rats de différents lots (X400) (Photos originales, 2019)

Témoin: lot des rats témoin . EM *E. alata*: lots des rats traité par extrait méthanolique *Ephédra alata* .Hyp : lots des rats traités par Triton X-100. EM *E. alata* +Hyp :lots des rats traité par extrait méthanolique *d'Ephédra alata* + Triton X-100 .

Les lipides sont des composés insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Dans le présent travail (figure 30), nous avons utilisé des coupes congelées en utilisant un cryostat pour préserver les dépôts lipidiques au niveau du foie.

L'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du foie des rats témoins et des rats prétraités avec l'extrait méthanolique d'*Ephédra alata* montre une structure normale du parenchyme hépatique présentant de faibles quantités de lipides distribués au niveau des hépatocytes avec une faible coloration rouge. Toutefois, une augmentation notable du dépôt de lipides a été observée dans le groupe traité par de le triton X-100 comparativement aux rats témoins, qui se manifeste par l'augmentation de l'intensité de la coloration rouge indiquant l'installation d'un état d'hyperlipidémie au niveau du foie. Concernant l'association avec l'extrait méthanolique d'*Ephédra alata*, l'étude a révélé que cet extrait a fourni une protection contre les perturbations lipidiques induites par le triton X-100, qui se manifestent par une diminution de l'intensité de la coloration rouge. L'analyse semi-quantitative confirme l'éventuel effet thérapeutique d' *Ephédra alata* . Des effet similaires ont été observés dans des travaux de García-Díaz et *al*.,(2016) ; Subramani et *al*.,(2017) et Latifi et *al*., (2019).

Cet effet positif d'*Ephédra alata* pourrait être dû au degré élevé des composés phytochimiques (surtout les composées phénoliques et les flavonoïde) .

II.2.2.Pouvoir analgésique (Test du Writhing)

Le tableau 9 montre les effets des dose de l'extrait méthanolique *Ephédra alata* ainsi que l'anti-inflammatoire standard (Indométacine) administrées chez des lots des rats ayant reçu l'acide acétique (1%, IP). Ces effets sont exprimés en pourcentage d'inhibition des crampes.

Tableau 9: Effet de l'extrait méthanolique *d'Ephédra alata* sur les crampes abdominales induites par l'acide acétique chez les rat

Traitement	Dose	Nombre des crampes abdominales (15 min)	Inhibition (%)
Control (acetic acid 0.1%)	10ml/kg	26±1.32	-
Eau	5 ml/kg	26±1.32	
Indométacine	10 mg/kg	13±1,06 **	50
EM *E. alata*	50 mg/kg	18±0,52 *	30.7

Valeurs représentées en moyenne ± l'écart-type de trois mesures.
Les valeurs sont statistiquement présentées comme suit:
*: p≤ 0.05 ; **: p≤ 0.01 comparé au groupe témoin normal (Control).

D’après ces résultats, il devient de plus en plus clair l’effet bénéfique de l’extrait méthanolique *d'Ephédra alata* En effet le prétraitement avec EM *E. alata* induit une diminution significative des crampes abdominales par rapport au groupe témoins. Les valeurs obtenues avec EM *E. alata* sont très proches de celles obtenues avec l’anti-inflammatoire standard.

En faite, l’apparition des torsions abdominales sous l’effet de l’acide acétique engage l’effet des récepteurs péritonéaux locaux (Ouédraogo et *al.,* 2012) ainsi que la libération de médiateurs tels que les prostaglandines et des cytokines (Negus et *al.,* 2006). L’effet analgésique de l’extrait nous laisse supposé que les biomolécules contenus dans la plante *Ephédra alata* pourrait inhibé de la libération des médiateurs chimiques, comme a été signalé par d’autres chercheurs (Perez-Guerrero et *al.,* 2001).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante. Cet intérêt de ces plantes médicinales représentent d'une part une source inépuisable des substances et des composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Dans notre travail, nous avons étudié des activités biologiques (antioxydant et anti-hyperlipidimique) de l'extrait méthanolique des cônes femelles d'*Ephédra alata*. L'extrait à été préparé par macération.

In vitro, La détermination de rendement en extraits bruts a montré une rentabilité importante 12.26 %. Les principaux résultats de l'analyse phytochimique de la plante *Ephédra alata* montrent une composition riche et variée, la présence des polyphénols, des Tanins et des flavonoïdes due à leur rôle important dans la plante, dont ils sont des produits considérés comme métabolites secondaires. Les analyses quantitatives effectuées ont montré que l'extrait brut a une teneur des polyphénols totaux(178.744 ±83.297mg ЄAG/g Extrait) et des flavonoïdes (26.101±1.558 mg ЄQu/g Extrait).

L'activité antioxydant de nos extraits a été évaluée en utilisant les tests de DPPH•, réduction de Fer et hémolyse. Le tanins qui sont montré une capacité d'inhibition mieux à les autres extraits d'une valeur (IC_{50}= 14.52µg/ml), et une activité réductrice du fer la plus élevée ,et test de hémolyse montré que les polyphénols donné la meilleure protection de érythrocytes (22.27% d'érythrocytes dissous dans la concentration 1 mg/ml), donc les résultats peuvent être dits que l'activité antioxydant des extraits des cônes femelles de la plante *Ephédra alata* faible comparaison aux acide ascorbique.

Analyse chromatographique par HPLC a permis d'identifier trois polyphénols dans le extrait de la plante *Ephédra alata* ,l'acide chloroginique , acide p-coumarique et quercitine.

In vivo il s'agit deux études expérimentales sur 48 rats mâles de la souche Wistar .Le premier étude pour évaluation de l'effet protecteur suite à une hyperlipidémie provoquée par Triton X-100, cette étude c'est fait sur un 24 rats réparties en quatre lots de six rats chacun dont le premier lot sert de témoin, le second est un lot de l'extrait méthanolique de la plante, le troisième est un lot traité par Triton X-100 , le quatrième est un lot contaminé par Triton X-100 et co- traité par extrait de la plante. Après 15 jours de traitements les rats ont été sacrifiés.

Conclusion et Perspectives

À partir de l'analyse de nos résultats, on observe des changements notables dans les paramètres biochimique et lipidiques étudiés, aussi pour les paramètres de stress oxydatif chez le lot exposé au Triton X-100. En revanche, le traitement par l'extrait méthanolique de la plante *Ephédra alata* donne des résultats similaires au lots témoins en normalisant paramètres biochimiques étudiés et en diminuant les paramètres lipidiques et l'état de stress. L'étude histologique a confirmé les résultats biochimiques.

Le pouvoir analgésique ce la deuxièmes étude in vivo, c'est fait sur un 24 rats réparties en quatre lots de six rattes chacun dont le premier lot sert de témoin, le second est un lot traité par extrait de la plante, le troisième est un lot traité par eau distillé , le quatrième est un lot traité par médicament Indométacine , ces lots mises à jeun 16 heures avant l'essai.

D'après ces résultats, on observe l'extrait méthanolique *d'Ephédra alata* induit une diminution significative des crampes abdominales par rapport au groupe témoins et les valeurs obtenues sont très proches de celles obtenues avec l'anti-inflammatoire standard (indométacine). Ce résultat confirmé l'effet bénéfique de ce plante médicinale .

Perspectives

Vu l'importance de ces résultats :

-Ce travail nécessite d'autres études approfondies pour déterminer des nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

- ll est nécessaire déterminer la dose optimal pour éviter les effets indésirables de la plante .

- Déterminer d'autres activités comme : l'activité anticancéreuse, antidiabétique, antibactérienne etc.…

Références bibliographiques

1- **Abdel-Daim, MM., Abuzead, SM., & Halawa SM. (2013).** Protective role of Spirulina platensis against acute deltamethrin-induced toxicity in rats. PLoS One.vol. 8 (9): 72991.

2- **Abdou Bouba, A., Njintang, Y.N., Scher ,J., & Mbofung, C M F. (2010).** Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices; *Agric. Biol. J. N. Am*.vol.1(3):213-224.

3- **Abdou,R.H., & Abdel-DaimM.M..(2014).** Alpha-lipoic acid improves acute deltamethrininduced toxicity in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.vol.92: 773–779.

4- **Abirami, A., Gunasekaran, N., & Perumal, S.(2014).** *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosine inhibitiry potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. Food Science and Human Wellness,vol.(3): 18-22.

5- **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.

6- **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**.**

7- **Aebi, H.(1984).**Catalase *in vitro*, Methods in Enzymology.vol.105, 121–126.

8- **Akroum, S. (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. 125p.

9- **Alilou ,H.(2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus (Schousb.) Greuter* et *Asteriscus imbricatus* (Cav) DC. Thése de Docorat en sciences. Université Ibn Zohr. Agadir, Maroc. 215p.

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

12- **Amiard, J-C., & Amiard-Triquet, C. (Ed.). (2008)**. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Paris : Lavoisier.

13- **Aurousseau, B., (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.*, 15(1) , 67-82. En ligne: http://www6.inra.fr/productions-animales/2002.

14- **Aurousseau, B., Durand, D., &Gruffat, D. (2007).** Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 17(5), 339-

354.Enligne https://www6.inra.fr/productions-animales/2004-Volume-17/Numero-5-: 2004/Controle-des-phenomenes-oxydatifs-pendant-la-gestation

15- **Avril, M-F. (Ed.). (2002)**. Soleil et peaux: bénéfices, risques et prévention. Paris : Masson.

16- **Banahmed, M.(2009).**Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des Apiaceae Carum montanum Coss. & Dur. et Bupleurum montanum Coss. Thése de Docorat en sciences.Universite Mentouri,Constantine.199p.

17- **Bansal AK., Bansal M., Soni G., & Bhatnagar D.(2005).**N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. Chemico-Biological Interactions.vol.156, 101–111.

18- **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.vol.(55), 123-37.

19- **Bekkara, F.,Jay, M., &Viricel, M.R. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*.vol. 203: 27-36.

20- **Bellebcir ,L.(2008).** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales ; Mémoire de magister; option Biodiversité et production végétale .Université Mentouri de Constantine.69p.

21- **Benhammou, N., Atik Bekkara, F., & Kadifkova, P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf, Advances in Food Sciences, 29(3), 155-161.

22- **Benkhnigue O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A., &Douira1 A.(2011)**.Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Bot. Barc., Vol. 53, pp.191-216.

23- **Bennick, A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* Vol.13 (2), 184-196.

24- **Besnier, E., Delile, E., Coquerel, D., & Tamion, F.(2015).** Les voies du monoxyde d'azote dans le sepsis. *Réanimation*, 24(2) , 191-200 . doi 10.1007/s13546-015-1044-8.

25- **Bonnefont-Rousselot, D.(2014).**Obésité et stress oxydant. *Obésité*, 9, 8-13. Springer-Verlag . doi 10.1007/s11690-013-0408-3.

26- **Boozer, C.N., Nasser, JA., Heymsfield ,S.B., Wang, V., Chen, G., &Solomon,J.L. (2001).** An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, doubleblind trial. Int J Obes Relat Metab Disord., Vol. 25; N°3, pp. 316-324.

27- **Borel, J-P., &Randoux, A. (Ed.). (1997).** *Biochimie dynamique.* Paris : Bruxelles.

28- **Bouchama, S.,Yezza, S.(2014).**Index Des Métabolites Secondaires Vegetaux.Mém de Licence , Université Kasdi Merbah, Ouargla,26p**.**

29- **Brand-Williams, W., Cuvelier M. E., & BERSET,C. (1995).**Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. U. Technol.vol.28(1):25-30.

30- **Brière T. (2001).**Valorisation des ressources naturelles, Creative Commons. Département de Chimie. Université de La Réunion. 36-37p.

31- **Bruneton,J.(1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationnales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.

32- **Castellucci, F. (2010).** Overall determination of phenolic compound in spirituou beverage of vitivinicultural origin without added caramel.vol.1: 1-4.

33- **Catier, O., & Roux, D(2007).**Botanique pharmacognosie phytothérapie. Wolters Kluwar (3^{eme} Ed.), 141p.

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

35- **Cavin, A. (1999).** Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvalacées) *et Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne. 241p .

36- **Claudine , B.,Marie-Jeanne, R, Veronique, G, Catherine, G ., &Alain, F .(2004)**.Enzymatic antioxidant balance and cognitive decline in aging - the EVA study. *European Journal of Epidemiolog1y* ,19 (2), 133-138. doi 10.1023/B:EJEP.0000017830.27594.e9.

37- **Chang, C.C.,Yang, M. H.,Wen H. M., &Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis.vol.10 (3):178-182.

38- **Chargui, I., Grissa I., BenSassi F., Hrira M.Y., & Haouem S.(2012).** Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): A molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*. Vol.25: 672-683.

39- **Chen ,W.L.,Tsai T.H., Yang C.C.H., & Kuo T.B.J.(2010).**Effects of ephedra on autonomic nervous modulation in healthy young adults. Journal of ethnopharmacology, Vol. 130, pp. 563–568.

40- **Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., &Mueller-Harvey, I. (2000).** Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *J. Agric. Food Chem.* Vol.(48)pp.5297-5301. Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*. Vol.1, N°8,pp.158-163.

41- **Cowan ,M .(1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbioloy reviews*.vol.12 (4):564-570.

42- **Crini , G., & Badot, P-M. (2007).**Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique. France : Presses Univ. Franche-Comt.

43- **Cuq J L. (2001).** Cours chromatographie liquide. Université Montpellier. 3p.

44- **Decloitre, F.(1993).** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique*.vol.28 (2) : 85-95.

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

46- **Dewick, PM.(1995).**The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Product Reports. Vol.12, 579-607.

47- **Droge,W. (2002) .** Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol.Rev*, 82 :47-95.doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

48- **Durand, G., & Beaudeux, J-L. (Ed.). (2008).** *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. Paris : Elsevier.

49- **Dwassy, A.(2014)**. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Thèse doctorat en pharmacie.134p.

50- **Edeas, M.(2007) .**Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264–270 . doi 10.1007/s10298-007-0268-9.

51- **El-haskoury, R., Al-Waili, N., Kamoun, Z., Makni, M., Al-Waili, H., & Lyoussi, B. (2018).** Antioxidant Activity and Protective Effect of Carob Honey in CCl4-induced Kidney and Liver Injury. *Archives of Medical Research.*vol.49(5),306-313.

52- **Emerenciano,V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T., & Ferriro M. J. P.(2007).** Self organisating maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*.vol.18 (5): 891-899.

53- **Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., & Waeg G. (1991).** Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *American Journal of Clinical Nutrition* .vol.53(1):314-321.

54- **Evans ,W.C.(2009).** Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).616p.

55- **Fatmah, A., Siti, B., Zariyantey, A., Nasar, A., &Jamaludin, M.(2012).** The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *REVIEW, 12(1),5-18.* En ligne: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3286717/pdf/squmj-12-5.pdf.

56- **Favier, A .(2003).** Le stress oxydant. *l'actualité chimique*,11(12) , 108-115. doi: 10.1155/2013/150780.

57- **Feucht, W., Treutter, D., & Christ, E. (1997).** Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.* Vol.(17)pp.335-340.

58- **Fleuriet, A.(1982).**Expression et régulation du métabolisme des dérives hydroxy cinnamiques au cours de la croissance, de la maturation et de la reaction aux blessures du fruit de la tomate "cerise" (*lycopersicum esculentum var*. Cerasiforme) thèse de doctorat**.** Etat, Université de Montpellier.france.269p**.**

59- **Fleuriet, A., Jay-Allemand ,C., & Macheix JJ.(2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* .pp 121-216.

60- **Flohe L., &Gunzler W A.(1984).**Assays of glutathione peroxidase, Methods in Enzymology.vol.105, 114–121.

61- **Folley J P., & Crown J A. (1991).** Supercritical fluid chromatography for the analysis of natural products. Recent advances in phytochemistry. Stattford, USA. Helen A Edit. 25 :113.

62- **Formica, JV., &Regelson W. (1995).** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Journal of Food Chemistry* Toxicol.vol. 33: 1061-1080.

63- **Gabe M.(1968).**Techniques Histologiques, Massie et Cie, Paris.1113 p.

64- **García-Díaz, J. A., Navarrete-Vázquez, G., García-Jiménez, S., Hidalgo-Figueroa, S., Almanza-Pérez, J. C., Alarcón-Aguilar, F. J., & Estrada-Soto, S. (2016).** Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.vol.83, 667-675.

65- **Gaussen H., &Leroy H. F.(1982).** Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2éme Ed : Masson.Paris. 426 p.

66- **Ghedira, k. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Journal de Phytothérapie*.vol.3 (4) : 162-169.

67- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, M. C., Aberkane, H., Bousselsela, S. M., & Oueld- Moukhtar. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydant et antimicrobienne des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie*.vol.13.pp.118 – 129.

68- **Ghourri, M., Zidane, L., &Douira,A.(2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). Journal of Animal &Plant Sciences, vol. 17, N° 1, p. 2388-2411.

69- **Gilbert ,B.L., Norris D.M.(1968).** Achemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. *J Insect physiol*. Vol.(14): 1063-1068.

70- **Gomez-Caravaca, A M., Gomez Romero, M., Arraez Roman D., Segura Carretero A., & Fernandez Gutierrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.vol. 41: 1220- 1234.

71- **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 Master Académique en Biochimie Appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED.93p.

72- **Goudable, J., & Favie, A. (1996)**. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11, 2, 115-120. doi:10.1016/S0985-0562(97)80058-1.

73- **Govindwar, S.P., & Dalvi, R.R.(1991).**Stimulatory and inhibitory effects of dimethyl sulfoxide on microsomal aniline hydroxylase activity. Toxicology Letters.vol.55, 317-323.

74- **Gowri Shankar NL., Manavalan R., Venkappayya D., & David Raj C.(2008).** Hepatoprotective and antioxidant effects of Commiphora berryi (Arn) Engl bark extract against CCl-induced oxidative damage in rats. Food Chemical and Toxicology.vol.46, 3182-3185.

75- **Gundamaraju R., Hwi KK., Singla RK., Vemuri RC., &Mulapalli SB.(2014).** Antihyperlipidemic potential of Albizia amara (R ox b) Bo iv.bark against Triton X-100 induced hyperlipidemic condition in rats. Pharm Res.vol. 6:267–273.

76- **Haleng, J. Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P.(2007).** Le stressoxydant. *Med*, 62(10), 628-638. Enligne http://www.chu.ulg.ac.be/upload/docs/application/pdf/201001/stress_oxydant_rmlg_2007.pdf.

77- **Hao, C., Hao J., Wang W., Han Z, Li G., Zhang L., Zhao X., &Yu G. (2011).** Insulin sensitizing effects of oligomannuronate –chromium(III) complexes in C2C12 skeletal muscle cells.Journal of PLoS One. 6:e24598.

78- **Haslam, E., &Cai,Y.(1994).**Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism.Natural Product Reports.vol. 11, 41–66.

79- **Hegazi, G.A.E., & El-Lamey T.M.(2011).***In vitro* Production of Some Phenolic Compounds from *Ephédra alata* Decne. J. Appl. Environ. Biol. Sci.Vol.1.N°8, pp.158-163.

80- **Hennen ,G.,(Ed.). (2001)**. *Endocrinologie*. Paris :Bruxelles.

81- **Huang,J.,& Price,R.A. (2003).**Estimation of the Age of Extant Ephedra Using Chloroplast rbcL Sequence Data. Mol. Biol. Evol.Vol. 20, N°3, pp435–440.

82- **Hubert, A.J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.174p.

83- **Hutzler, P., Fishbach, R., Heller,W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M.,Weissenböck G., & Schnitzler J. P.(1998).** Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scaning microscopy. *Journal of experimental botany*.vol.49 (323) : 953-965.

84- **Ilhami, G., Zubeyr, H., Mahfuz, E., & Hassan, Y. A.(2009).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1) , 43 53. doi:10.1016/j.arabjc.2009.12.008.

85- **Jadot, G. (Ed.).(1994).** *Antioxydants et vieillissement*. Paris : John Libbey Eurotext.

86- **Jean-Blain, C. (1998).** Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev.Méd. Vét.* .vol.149, 911- 920.

87- **Jeong, S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., & Lee S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52, 3389–3393.

88- **Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., & Lee S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52: 3389–3393.

89- **Jiri D., Ondrej Z., Jiri S., Branislav R. N., Petr B., Miroslava B., Jindrich K., Jaromir H., Borivoj K., Rene K., &Vojtech A. (2013).** Electrochemical tools for determination of phenolic compound in plants. *Int. J. Electrochem. Sci*. 8 : 4521.

90- **Joël, P., Fabian, D., Sylvain, V., Christian, M., Nicolas, P., & Jean-Olivier, D. (2007)**. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21, 66–75. doi:10.1016/j.nupar.2007.04.005.

91- **Josem, M., Cristina, P., & Ignacio, N. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32 (8), 595–603, doi: 10.1016/S0009-9120(99)00075-2.

92- **Katarzyna, L., Henryk, S., Bożena, T., Ryszard, Z., Ans, E., & Ivonne, M. (2001)**. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(7) , 869–881. doi:10.1016/S0891-5849(01)00638-4.

93- **Kebili, Z.(2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephédra alata* de la région de Ouargla. Mémoire de magister : Biochimie et Analyse des Bioproduits UniversitéKasdiMerbah-Ouargla.102p.

94- **Kelly, E., Anthony, R., &Dennis, J. (2002)**. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584 . doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.

95- **Khatabi O., Hanine H., Elothmani D., &Hasib A.(2011).** Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (Opuntia ficus indica), *Arabian Journal of Chemistry* .Vol.9(1): 278-281.

96- **Koechlin-Ramonatxo, C.(2006).** Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(4) ,165–177.doi: 10.1016/j.nupar.2006.10.178 .

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

98- **Konkon N.G., Simaga D., &Adjoungova A.L.(2006).**Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. Pharm. Méd. Trad. Afr. 2006, Vol. 14, pp. 73-80.

99- **Konno, C., Mizuno, T., & Hikino, H. (1985).** Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A, B, C, D and E, glycans of Ephedra distachya Herbs. Planta medica, vol. 51, N°2, pp. 162-163.

100- **Kose, K., & Dogan,P. (1995).** Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membrane. Protective effect of Ginkgo Biolabo Extract (EGB761). *The Journal of International Medical Rescearch* .vol.23: 1-8.

101- **Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse de doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

102- **Kumaran, A., & Karunakaran, R.J.(2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.vol. 40, 344–352.

103- **Lacollry,P., Babuty,D., Boulanger, C., Chaler, B.,Loirand, C.,Pinet, F., & Samuel, J-L. (Eds.). (2007).** *Biologie et pathologie du Coeur et des vaisseaux* . Paris : John Libbey Eurotext.

104- **Larab, S.,& Makhlouf, A.(2017).** Caractérisation phytochimique et activité antihémolytique des extraits de *Citrus*. Mémoire de master Option : Biochimie et Biologie Moléculaire .Université A. MIRA – Bejaia.36p.

105- **Latifi, E., Mohammadpour, A. A., H, B. F., & Nourani, H. (2019).** Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic Ferula assa-foetida oleo-gum-resin extract in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy.*vol.110, 197-202.

106- **Leinmüller,E.,Steingass H., &Menke KH.(1991).** Tannins in feeds for ruminants. II Effects on rumen metabolism in vitro. Übersichten zur Tierernährung. Vol. (19):45–70.

107- **Limberger, R.P., Jacques, A., Schmitt GC., &Arbo, MD.(2013).** Pharmacological Effects of Ephedrine. Natural Products, pp. 1218- 1237.

108- **Lin, SC., Yao CJ., Lin CC., & Lin YH.(1996).**Hepatoprotective activity of Taiwan folk medicine: Eclipta prostrate Linn. against various hepatotoxins induced acute hepatotoxicity. Phytotherapy Research.vol.10, 483–490.

109- **Ling, M., Piddlesden ,S. J., &Morgan, B. P.(1995).**A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. Clinical & Experimental Immunology, Vol. 102, N° 3, p. 582–588.

110- **Luthria, DL .(2008).** Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. Food Chem. 107(2):745-752.

111- **Ma G., Bavadekar, S.A., Davis, Y.M., Lalchandani S.G., Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A., &Feller D.R.(2007).**Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human a1- and a2 Adrenergic Receptor Subtypes. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Vol. 322, N°1, pp. 214- 221.

112- **Maamri,S.(2008).** Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de magister Option Biochimie et Microbiologie appliquées. Université M'HAMED BOUGARA Boumerdes.108p.

113- **Macheix ,JJ., Fleuriet, A., & Jay-allemand C. (2005).** les composes phenoliques des végétaux : un exemple de matabolites secondaires d'importance economique , 1 ere edition , presses polytechniques et universitaires romandes , lausanne bio ed. 54-65.

114- **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.vol.(49), 241-256.

115- **Malešev D., &Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*.vol.72 (10) :921-939.

116- **Malešev, D., & Kuntić V.(2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*.vol.72 (10) : 921-939.

117- **Manallah, A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.

118- **Mansour, A.(2009).**Investigation photochimique de l'extrait n- butanol de l'espèce centaurea AFricana. Mém de Magister,Université Mentouri Constantine, 6p

119- **Marcel, B.R., & Véronique, C., D.(Ed.). (2008)**. *Aliments fonctionnels (2e ed)*.Paris : Lavoisier.

120- **Marklund S., & Marklund G.(1974).**Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, European Journal of Biochemistry.vol.16, 469–474.

121- **Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. Vol.51, 304–315.

122- **Matkowski, A., & Piotrowska, P. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia.vol. 77(5): 346-353.

123- **Mbaebie, B., Edeoga, H., & Afolayan,A.(2012).**Phytochemical analysis and antioxidants activiities of aqueous stem bark extract of Schotia latifolia Jacq. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.vol.2 (2): 118-124.

124- **Medić-Šarić M.,Jasprica I., Smolćić-Bubalo A., &Monar A.(2004).** Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*.vol.77 (1-2) : 361-366.

125- **Middleton, EJ.,Kandaswami, C., & Theoharides, TC.(2000) .**The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev vol.52: 673-751.

126- **Mighri, H., Bennour N., Eljeni H., Neffati M., & Akrout A. (2017).**Chromatography Analysis of Fatty Acids, Volatile Compounds and Alkaloids of *Ephedra alata* Growing Wild in Southern Tunisia and Evaluation of their Antioxidant Activity. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research .vol.9(9),pp 1249-1259.

127- **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.52p.

128- **Molyneux P.(2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol, Vol, 26, N°2, pp.211-219.

129- **Mónica, G., Sandra, V., Patricia, I., & Cesar, G.(2010)**. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1) , 23–30 .doi:10.1016/j.abb.2010.04.005.

130- **Moussard, C. (Ed.).(2006).** *Biochimie structurale et métabolique*. Paris : Bruxelles.

131- **Nabti, L. Z., & Belhattab, R.(2016).** in vitro antioxidant activity of Oudneya africana R. Br. Aerial parts. Issues in Biological Science and Pharmaceutical Research.vol.4(6): 58-64.

132- **Naczk, M., & Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A.vol.10(54), 95–111.

133- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., &Krishna D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*.vol.33 : 2-16.

134- **Nawwar, M.A.M., El-Sissi ,H.I., &Barakat ,H.H.(1984).**Flavonoid constituents of Ephedra alata. Phytochemistry, Vol. 23, N°. 12, pp. 2937-2939

135- **Negus S., Vanderah T., &Brandt M.(2006).**Evaluation préclinique de médicaments analgésiques candidats: avancées récentes et futur défi. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.vol.319, 507–514.

136- **Nesba, S., & Henka, F.(2018).** Evaluation de l'activité biologique de la plante médicinale de la région d'Eloued *Ephédra alata "*alenda*"*(*In vitro* et *In vivo*).Mémoire de Master Académique en Biochimie Appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED.97p.

137- **Nijveldt, R. J., Van Nood E.,Van Hoorn D. E.C., Boelens P. G., Van Norren K., &VanLeeuwen P. A. M. (2001).** Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition*.vol.74 : 418-425.

138- **Nkhili ,EZ-Z.(2004).**Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 - SPSA, Montpellier.7p.

139- **Ojeil A., EL darra N., EL hajj Y., Bou moncef P., Rizk T. J., & Maroun R G. (2010).** Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château ksara. *Lebanese Science Journal.* Vol. 11 (2) :118.

140- **Ouédraogo N., Lompo M., &Sawadogo R.(2012).**Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). Phytothérapie.vol.10, 286–292.

141- **Ould El Hadj, M.D., Hadj-Mahammed ,M., &Zabeirou ,H.(2003).**place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). Courrier du savoir. Vol.N° 3, pp. 47-51**.**

142- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

143- **Ozenda, P.(1991).** Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3éme Ed.). 662p.

144- **Paris ,M., Hurabielle, M.(1980).** Abrégé de matière médicale Pharmacognosie. Tome 1ere Ed : Masson. Paris. pp. 82-89.

145- **Paris, R.R., & Moyse, H. (1976).** Matière Médicale. Tome I. 2eme Ed : Masson, Paris. 406 p.

146- **Perez-Guerrero C., Herrera MD., & Ortiz R.(2001).**Alvarez de Sotomayor M, Fernandez MA: A pharmacological study of Cecropia obtusifolia Bertol aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology.vol.76, 279–84.

147- **Perry JJP., Shin DS., Getzoff ED., & Tainer JA. (2010).**The structural biochemistry of superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. vol.1804 (2): 245–262.

148- **Peters, C.M., O'neill J.O., & Young J.B.(2005).** Is there an association between ephedra and heart failure? a case series. Journal of Cardiac Failure, Vol. 11, N°1, pp.9-11.

149- **Pincemail, J., Karine, B., Karine, C., & Defraigne, J.O.(2002).** Mécanismes

physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233–239. doi:10.1016/S0985-0562(02)00166-8.

150- **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., &Defraigne, J.(1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* , 4 (5). En ligne http://www.probiox.com/uk/pdf/realite_generaliste46.pdf.

151- **Poisson, C. (2013).** Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité du l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat en pharmacologie et toxicologie, Université paris-sud 11.

152- **Poortmans, J. R., & Boisseau, N. (Eds.). (2003).** *Biochimie des activités physiques*. Paris : Bruxelles.

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

154- **Pulido, R.,Bravo L., &Saura-Calixto F. (2000).**Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry vol, 48, 3396–3402.

155- **Ramassamy,C.(2006).** Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. European Journal of Pharmacology.vol.545: 51–64.

156- **Ravikumar S., & Gnanadesigan M.(2011).**Hepatoprotective and antioxidant activity of a mangrove plant *Lumnitzera racemosa*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.vol.1, 348–352.

157- **Ré, D., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian Le Goff , L., & Had-Aissouni, L. (2005).** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* , 24, 502–509. doi:10.1016/j.annfar.2005.03.004.

158- **Revuz, J. (Ed.). (2009).** Traité EMC : cosmétologie et dermatologie esthétique. Paris : Elsevier Masson.

159- **Ribereau–Gayon, P.(1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. pp:1-40.

160- **Richter ,G.(1993).**Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire, Romandes. Suisse. 526 p.

161- **Safer, A.M., &Al-Nughamish,A.J.(1999).**Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxyl toluen (BHT) in rats: An electron microscopical study. Histology and Histopathology, Vol. 14; pp. 391-406.

162- **Sandrine, L.(2004).**Diversité structurale et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses .Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, FRA. 216 p.

163- **Saraswat B., Visen PK., Patnaik GK., & Dhawan BN.(1993).**Anticholestic effect of picroliv, active hepatoprotective principle of Picrorhiza kurrooa, against carbon tetrachloride induced cholestatis. Indian Journal of Experimental Biology.vol.31, 316–318.

164- **Serteyn,D.,Mouithys-Mickalad,A., Franck,T., Grulke, S., Lamy, M., Deby, C., & Deby-Dubont,G.(2002).** La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Ann. Méd. Vét,* 146,137-153.En ligne: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2002_146_3_01.pdf.

165- **Sharma B.,Viswanath G.,Salunke R., &Roy P. (2008).** Effects of flavonoid-rich extract from seeds of Eugenia jambolana (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic. *Journal of Food Chemistry*. Vol.110(3): 697-705.

166- **Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007) .**The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) seed extracts. Food Chemistry. 101(1), 10-19.

167- **Stoclet ,JC., Chataigneau ,T .,Ndiaye, M., Min-Ho O., El jasser B.,Marta C., Valerie B., & Schini, K. (2004).** Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*,vol. 500: 299-313.

168- **Su YC., Ho CL., Wang EI., &Chang ST.(2006).**Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalyptus. Taiwan J For Sci.vol.21: 49-61.

169- **Subramani, C., Rajakkannu, A., Rathinam, A., Gaidhani, S., Raju, I., & Kartar Singh, D. V. (2017).** Anti-atherosclerotic activity of root bark of Premna integrifolia Linn. in high fat diet induced atherosclerosis model rats. Journal of Pharmaceutical Analysis.vol.7(2), 123-128.

170- **Sun, J., Wu, Y., Long, C., He, P., Gu, J., Yang, L., &Wang, Y. (2018).** Anthocyanins isolated from blueberry ameliorates CCl 4 induced liver fibrosis by modulation of oxidative stress, inflammation and stellate cell activation in mice. *Food and Chemical Toxicology*.vol.120, 491–499.

171- **Suzy, A., &Comhair, S.(2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology Published* **,** 283 **(** 2), 246 -255 . do**i:**10.1152/ajplung.00491.2001.

172- **Tabuti J.R.S., Lye K.A., &Dhillion S.S.(2003).** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. Journal of Ethnopharmacology, vol. 88, N°1, pp. 19-44.

173- **Tessier, F., & Marconnet, P .(1995).**Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*, 10(1) , 1-13. doi: 10.1016/0765-1597(96)89350-6.

174- **Thiebauld , C.M., & Sprumont, P. (Eds.).(1998).** *L'enfant et le sport: Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant.* Paris : Bruxelles.

175- **Timmermann, B.N.,Steelin C., & Loewus F.A.(1984).**Recent Advances in Phytochemistry Phytochemical Adaptations to Stress .Plenum Press: New York.vol.18. pp. 273–220.

176- **Tlili, N., Feriani, A., Saadoui, E., Nasri, N., & Khaldi, A. (2017).** Capparis spinosa leaves extract: Source of bioantioxidants with nephroprotective and hepatoprotective effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.vol.87,171-179.

177- **Torres, R., Faini, F., Modak, B., Urbina, F., Labbe, C., & Guerrero J.(2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of Haplopappus multifolius. Phytochemistry. 67: 984-987.

178- **Tsai C-F., Hsu Y-W., Ting H-C., Huang C-F., & Yen C-C.(2013).** The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). Food Chemistry.vol.136, 1337–1344.

179- **Uchendu C., Ambali SF., Ayo JO., & Esievo KA.(2015).** The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicology & Industrial Health* .vol.15: 142-153.

180- **Valéry, A., Romuald, C., Dragoslav, M., Pascal, C., & Abderrahim, L.(2007)**.Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rhumatisme* ,74(7) 636–643. doi:10.1016/j.rhum.2006.12.009.

181- **Vergely, C., &Rochette, L. (2003).** Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie*,1,3 :131-139.

182- **Verhoeyen M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R., &Colliver S.(2002).** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*.vol.53 (377) : 209 -210.

183- **Voyer, M., & Magny, J-F. (Ed.). (1998)**. *Prématurité: le préterme.* Paris : Elsevier.

184- **W-Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly.,Hollman J. P., L –Keen C.,. Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG.,&Burrowes J. (2007).** Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*.vol.137(3 supp 1):718 s-737 s.

185- **Woodward,A.,&Coppock,D.L. (1995).** Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems*.vol. 32 (2pp. 147-161.

186- **Yahaioui, A.,& Silat ,L.(2017).**Contribution à l'étude des extraits de l'espèce Ephédra alata Alanda de la région de Sigus. Mém de Master, Université Larbi Ben Mhidi Oum El bouaghi , 6p.

187- **Yap C.F., Ho C.W,. Wan Aida W. M, Chan S.W., Lee C.Y., &Leong Y. S. (2009).** Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (Averrhoa carambola L.) Residues (Pengoptimuman Parameter Pengektrakan Jumlah Sebatian Fenolik daripada Residu Belimbing (Averrhoa carambola L.); *ains Malaysiana*.vol.38(4): 511–520**.**

188- **Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A.A.(2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 40834089.

189- **Yusuf ,Y.(2006).**Novel uses of catechins in foods. Pamukkale University,Turkey.Trends Food Sci. Tech. Vol.17, 64-71.

190- **Zhang, S.Y.,Zheng, C.G.,Yan, X.Y., &Tian, W.X. (2008).** Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*.vol.371: 654-658.

191- Site internet1 (http ://www .google.com/maps/).

Annexes

ANNEXE 1:

Etude *in vitro*

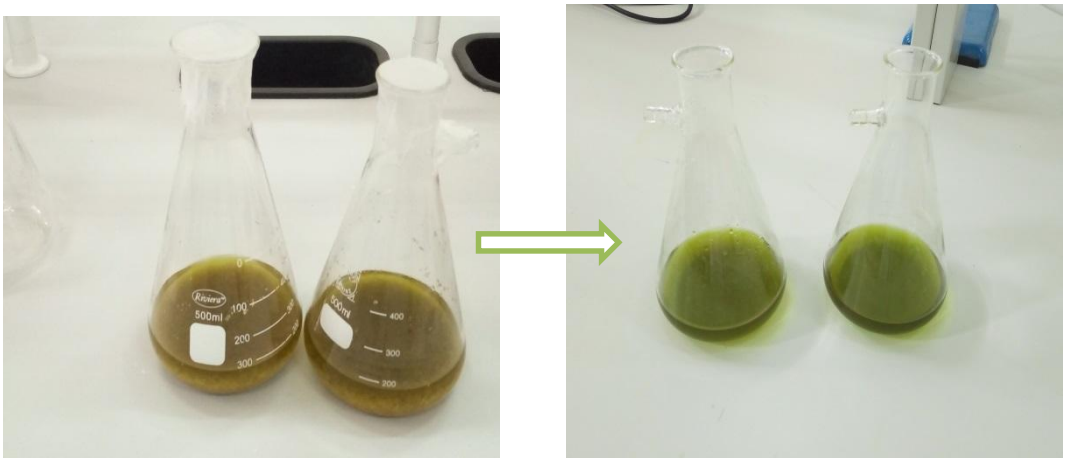


Photo 01 : Macération d'extrait brute

Tableau : Composés phénoliques présente dans l'extrait méthanolique .

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.986	7113	697	0.070	0.130
2	2.714	87184	7410	0.856	1.379
3	2.789	51673	6739	0.507	1.255
4	3.051	137491	11210	1.350	2.087
5	3.316	950903	152637	9.338	28.414
6	3.876	1875	513	0.018	0.096
7	4.169	238103	42113	2.338	7.840
8	4.831	167429	8148	1.644	1.517
9	5.151	78983	4012	0.776	0.747
10	5.523	45371	2649	0.446	0.493
11	5.871	63575	1943	0.624	0.362
12	6.491	38267	1490	0.376	0.277
13	7.649	184542	4172	1.812	0.777
14	8.829	119380	2501	1.172	0.466
15	10.299	142792	3054	1.402	0.568
16	11.039	212506	8319	2.087	1.549
17	11.562	585679	27772	5.751	5.170
18	12.532	141993	3801	1.394	0.708
19	13.099	68617	3286	0.674	0.612
20	13.371	100270	3377	0.985	0.629
21	14.506	293351	7946	2.881	1.479
22	15.306	127589	4026	1.253	0.749
23	15.823	113802	3880	1.118	0.722
24	16.877	1973127	64918	19.376	12.085
25	17.890	2775	150	0.027	0.028

Annexes

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
26	18.557	28631	935	0.281	0.174
27	19.344	90778	4258	0.891	0.793
28	20.069	36016	1511	0.354	0.281
29	20.720	25516	1231	0.251	0.229
30	21.286	81440	3191	0.800	0.594
31	22.381	2234	133	0.022	0.025
32	22.950	27061	1081	0.266	0.201
33	23.585	34728	2113	0.341	0.393
34	23.869	68803	2521	0.676	0.469
35	25.250	635578	20497	6.241	3.816
36	26.570	57797	1244	0.568	0.232
37	27.332	30299	1018	0.298	0.190
38	27.700	20520	931	0.202	0.173
39	28.590	89626	1880	0.880	0.350
40	29.619	52976	1895	0.520	0.353
41	30.058	47174	2509	0.463	0.467
42	30.404	100155	3692	0.984	0.687
43	30.875	79470	3138	0.780	0.584
44	31.430	239917	6805	2.356	1.267
45	32.936	48980	1817	0.481	0.338
46	33.482	165325	6303	1.624	1.173
47	34.118	170889	6788	1.678	1.264
48	34.961	339772	12707	3.337	2.365
49	35.735	258609	10171	2.540	1.893
50	36.817	58545	1820	0.575	0.339
51	37.897	54517	1259	0.535	0.234
52	39.216	2242	106	0.022	0.020
53	41.720	547468	19515	5.376	3.633
54	42.556	129675	8084	1.273	1.505
55	42.857	223809	8492	2.198	1.581
56	43.568	72614	3984	0.713	0.742
57	43.792	12739	3191	0.125	0.594
58	43.902	94473	3458	0.928	0.644
59	44.520	41635	2277	0.409	0.424
60	44.795	18469	1976	0.181	0.368
61	45.096	37712	2648	0.370	0.493
62	45.334	154777	4352	1.520	0.810
63	46.525	67777	887	0.666	0.165
Total		10183132	537182	100.000	100.000

ANNEXE 2:

Etude *in vivo*

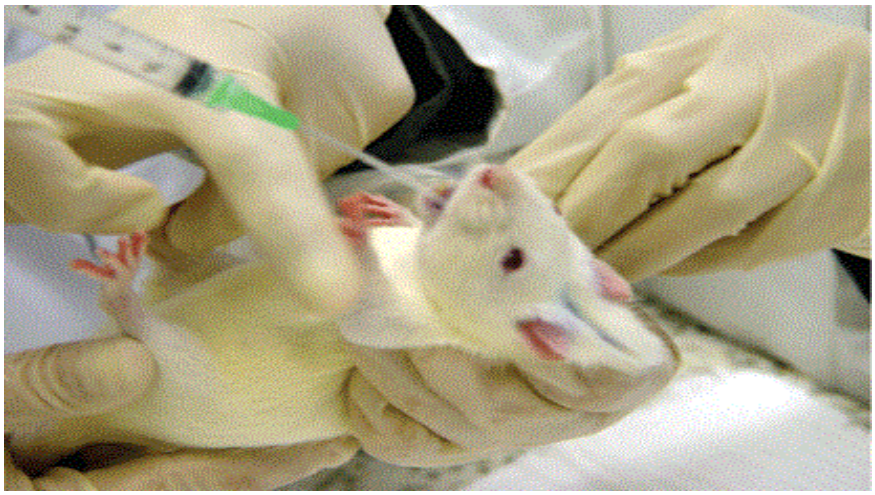


Photo 02: Gavage d'une solution de l'extrait méthanolique sur rat

Photo 03 : Injection du Triton X-100 (100 mg / kg pc)

ANNEXE 3:

Photo 04: balance électrique

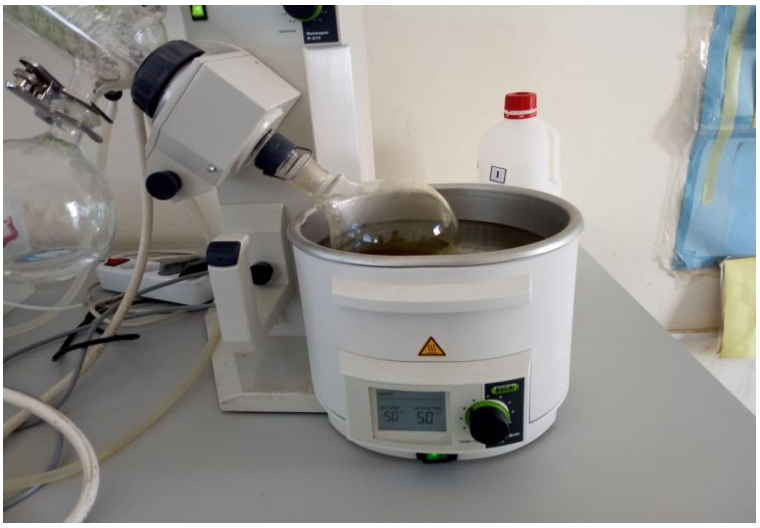


Photo 05: Evaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R- 200)

Photo 06: Centrifugeuse

Annexes

Contribution à l'étude biochimique et phytochimique des cônes femelles d'une plante saharienne *Ephédra alata (Alenda)* dans la région d'Oued Souf.

HOUBA Zoubeida, HIMEUR Hadjer, CHOUIKH Atef, ADJAL El Hadda, ALIA Fatma.

Département Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université El Oued. Algérie

RÉSUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la contribution à la valorisation d'une plante médicinale dont une grande partie reste encore vierge et nécessite des études approfondis, alors notre objectif sera alentour l'étude phytochimique des cônes femelles de la plante *Ephédra alata* (Alenda) dans la région d'oued Souf.

Les résultats de rendements des extraits le plus élève a enregistré en l'extrait brut plus que l'extraits de flavonoïdes et de tanins, tandis que les valeurs de dosage quantitatives des polyphénols et les flavonoïdes sont respectivement (178.744 ±83.297mg ЄAG/g Extrait et 26.101±1.558 mg ЄQu/g Extrait).

Quand l'activité antioxydant a été évaluée en utilisant le test de DPPH, qui a montré que supériorité de l'extrait de tanins par capacité d'inhibition mieux à les autres extraits (IC50= 14.52µg/ml) , et l'autre méthode est le test d'hémolyse, les résultats ont révélée l'extrait de polyphénol totaux est donné la meilleure protection de érythrocytes (22.27% d'érythrocytes dissous dans la concentration 1 mg/ml), donc les résultats peuvent être dits que l'activité antioxydant des extraits des cônes femelles de la plante *Ephédra alata* faible comparaison aux acide ascorbique.

Les Mots Clé: *Ephédra alata* ,les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes, activité antioxydant, test DPPH•, test Hémolyse.

Introduction

Les plantes supérieures produisent des centaines de milliers de composés chimiques divers avec différentes activités biologiques et rôles écologiques importants. Dans de nombreux cas, ces substances ou composés servent de mécanisme de défenses chimiques. Les membres de la famille des Ephedraceae, représentés par un seul genre «Ephedra», sont connus pour leurs nombreux usages en médecine traditionnelle dans le monde. La présente étude vise à contribuer à la valorisation de l'une de ces sous espèces, *Ephedra alata* alenda qui pousse dans la région d'Oued souf , et qui est réputée par sa tolérance élevée à la carence en eau. Néanmoins; elle reste peu étudiée dans la littérature sur le plan local. Et tout en sachant que le milieu désertique peut être un facteur favorable pour la production de métabolites secondaires dotés de nombreuses activités biologiques (Kebili ,2016).

A la lumière de ces données, l'idée de notre travail, dans le cadre de cette étude est de répondre à ces questions:

-Asque riche en substances naturelles à usages thérapeutiques ?

-Les extraits de *l'Ephédra alata* alenda ont-ils un effet antioxydant ?

Matériels et Méthodes

La plante utilisée dans ce travail expérimental est une espèce médicinale appartenant à la famille des Ephedraceae, qui est *l'Ephédra alata* alenda et comme sa partie aérienne (cônes femelles) est la plus utilisée par les herboristes, C'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 est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes.

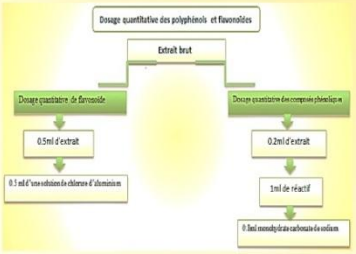
Donc on a choisisse pour cette étude expérimentale. La plante étudiée a été récolté en 24 mars 2018.

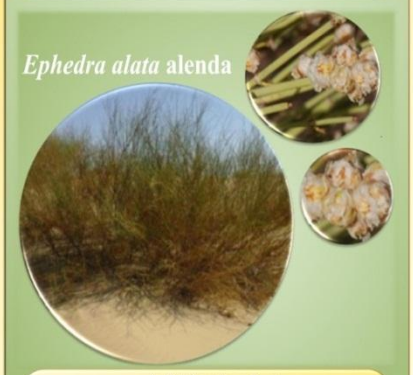
Dosage des composés phénoliques totaux des extraits

Les composés phénoliques totaux ont été estimé par méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu , la lecture de l'absorbance de la solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765nm (Singleton et *al.*, 1999).

Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée avec la méthode du trichlorure d'aluminium. L'AlCl3 forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 430 nm (Ayoola *et al*., 2008).





Activité antioxydante

Test du piégeage du radical libre DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm , l'acide ascorbique utilisé comme control (Gramza-michalowska & Czlapka-matyasik, 2011).

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

Pourcentage d'inhibition= [(Absorbance du contrôle – Absorbance du test)/Absorbance du contrôle] x100

Test Hémolyse

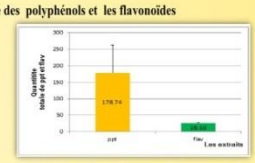
On Prendre 40 µl de globules rouges, on ajouter 2 ml d'extrait de plante *Ephédra alata* alenda et conserver 5 min à 37 ° C, ensuite on ajouté à 40 µl de solution de peroxyde (30 ml mol) de H2O2, FeCl3 (80 ml mol)et la solution d'acide ascorbique (50 ml mol), puis laissez le mélange pendant une heure dans l'incubateur à 37 ° C,il est ensuite transféré dans la centrifugeuse et placé à une vitesse de 700 tours / minute pendant 10 minutes,ils sont ensuite lus dans le dispositif d'absorption optique à la longueur d'onde nm λ = 540 (Abirami et *al*.,2014).

Le pourcentage de globules rouges est calculé selon la loi suivante:

% Hémolyse = [Abs contrôle /Abs échantillon]×100

Résultats et discussions

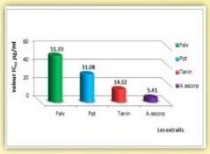
Dosage des polyphénols et les flavonoïdes



Les résultats obtenus à partir de l'histogramme en haut montrent que les cônes femelles de la plante d'*E. alata* est très riche en polyphénols suivi par les flavonoïdes.

Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes de l'extraction (Ayoola *et al*., 2008).

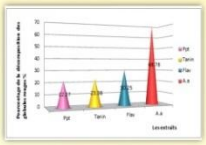
Test DPPH



Histogramme représentent les valeurs de l'IC50 des différents extraits. On observe la supériorité de l'extrait de tanins par capacité d'inhibition mieux à les autres extraits (IC50= 14.52µg/ml)et l'acide ascorbique présente un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à nos extraits.

L'efficacité antioxydant est différente en fonction de la quantité et de la qualité des composantes (Gramza-Michałowska & Człapka-Matyasik, 2011).

Test hémolyse



Parmi les résultats suivants, il est clair que l'effet protecteur des globules rouges à la concentration de 1 mg/ml est proche de tous les extraits, à l'exception de l'extrait de polyphénol qui présente la valeur de dégradation la plus faible (la meilleure protection de érythrocytes), alors C'est dernier augmentent la possibilité de protéger les membranes cellulaires, car ils agissent en tant qu'inhibiteurs d'agents oxydants (Larab et Makhlouf ,2017).

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Dans le présent travail, différents aspects d' *Ephédra alata* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique et activités antioxydante des différent extraits.

L'analyse phytochimique a mis en évidence diverses classes de métabolites secondaires (polyphénol , flavonoïdes et les tannins).

Références

• AYOOLA G.S., & Ipav S.S.,M.O. Sofidiya., Adepoju-Bello A. A., Coker H.AB., Odugbemi T.O., 2008- Phytochemical Screening and Free Radical Scavenging Activities of the Fruits and Leaves of *Allanblackia floribunda Oliv* (Guttiferae). International Journal of Health Research,Vol. 1; N°2, pp. 87-93.

• GRAMZA-MICHAŁOWSKA A., & Człapka-Matyasik M., 2011- Evaluation of the antiradical potential of fruit and vegetable snacks. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment, Vol. 10, N°1, pp. 61-72

• SINGLETON V.L., & + Rossi J.A., 1965- Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdi phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 16, pp. 144-158

• KEBILI Z., 2016. Contribution a l'étude de quelque activités biologique des extraits de Ephedraalata, launaearesdifolia and oudneyaafricana. Diplôme d'ingénieur d'Etat.Université des bioproduits.UniversitéKasdiMerbah-Ouargla.102p

ABIRAMI A., GUNASEKARAN N., & PERUMAL S., 2014- In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosine inhibitiry potential of fresh juice from Citrus hystrix and C. maxima fruits. Food Science and Human Wellness, (03): 18-22.

جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El-Oued

Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Le 06-07 Mras 2019

Attestation de Participation

Le directeur du 1er Séminaire National sur la Biodiversité et Valorisation des Produits Biologiques dans les Régions Arides et Semi- Arides atteste que:

HOUBA Zoubeida

A présenté une communication affichée intitulée:

Contribution à l'étude biochimique et phytochimique des cônes femelles d'une plante saharienne Ephédra alata (Alenda) dans la région d'Oued Souf

Co auteurs: HIMEUR Hadjer, CHOUIKH Atef, ADJAL El Hadda, ALIA Fatma.

Directeur du Séminaire
Dr. GHEMAM AMARA Djilani

Président du Comité d'Organisation
Dr. HAMAD Brahim