

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdes



Faculté des Sciences
Département de Biologie
Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de
Master 2 en Biologie
Spécialité : Biochimie Appliquée

Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques des extraits aqueux, méthanolique et alcaloïdique de deux plantes médicinales *Daphne gnidium* (L.) et *Ephedra alata alenda*.

Présenté par :

- Benkezzim Ferial
- Derradji Lamia

Devant le jury composé de :

M ^{me} Belkheir Meriem	M.A.A. (UMBB)	Présidente
M ^{me} Azzoune Nadia	M.A.A. (UMBB)	Examinatrice
M ^{me} Chebili Siham	M.A.A. (U. Alger 1)	Promotrice
M ^{lle} Lecheb Fatma	M.C.B. (UMBB)	Co-promotrice

Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous tiens à exprimer toutes nos reconnaissances à M^{me} Fazouane Fethia professeur à l'université de Boumerdes pour l'accueil qu'elle nous accordée dans son laboratoire, pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de nous avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, qu'elle trouve ici toute notre gratitude et notre sympathie.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et toutes nos reconnaissances à l'égard de M^{me} Shebili Siham M.A.A. à l'université d'Alger 1 pour avoir accepté de diriger ce travail et pour son soutien, sa compétence, sa disponibilité et surtout sa patience ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordée en réalisant ce travail, elle trouve ici l'expression de nos profondes gratitude.

Nos gratitude s'adresse aussi à M^{lle} Lecheb fatma, M.C.B à l'Université m'hamed Bougara Boumerdes pour avoir accepté de co-diriger ce travail, pour sa disponibilité, ses conseils, ces encouragement, sa gentillesse nous sommes très honoré de travailler avec elle.

Nous adressent nos sincères remerciements à M^{me} Belkhir M., M.A.A. à l'Université de Boumerdes d'avoir acceptée de présider le jury.

Nous expriment également nos remerciements à M^{me} Azzoune N., M. A. A. à l'Université de Boumerdes pour accepter d'examiner ce mémoire.

Un grand merci à M^r Riba Amar professeur a l'université de Boumerdes et M^{lle} Bensmail Souhila pour leurs aides précieuses, et aussi pour leurs patiences malgré leurs nombreuses préoccupations.

Nos remerciements vont à M^{me} Masouri fatiha, M^r Sadoun Sofiane, Madame Mdjahed Tawes et M^{re} Aoudache fatiha pour l'aide précieuse et chaleureuse.

Comme nous ne pouvons pas oublier à remercier toutes les techniciennes des laboratoires de faculté des sciences, Safia, Louiza, Nadia, Fasmine, Faiza, et surtout Kamilla et Dalila pour leur aide et leur soutien.

Nous nous remerciant toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père *Bouteldja* je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie et qu'Allah me donne la force pour réaliser son rêve d'être un jour docteur pour lui voir fier de moi inchaallah;

À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère *Naima* je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie;

À mes sœurs; *Phafika*, son marie *Amida* et sa fille *Maria*, *Messaouda*, *Otisseem* et *Zohra*. À mes frères ; *Mohammed Amine*, *Akram Ayoub*, le petit *Fares* et mon ancle *Poucef*
A tout les familles *Derradji* et *Maouche*.

À mon binôme et mon intime *Ferial*, à mes amies : *Aicha*, *Amira*, *Assia*, *Amina*, *Lamis*, *Khalissa*, *Sihem*, *Fadila*, *Meriem*, *Sonia*, *Djedjiga*, *Fella*, *Wafa*.

A mes collègues de la promotion de master "Biochimie Appliqué »

Je dédie ce modeste travail



Lamia

Dédicace

*Je dédie ce mémoire
Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

*A mon père **Araski**,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne
jamais baisser les bras. Pour son
enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.*

*A ma mère **Ferroudja**,*

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa
disponibilité, son écoute permanente et son soutien dans les moments les plus difficiles de ma
vie. Que Dieu vous garde.*

*A mes chers frères **Nacer Edinne** et **Farid** et leur épouses, mes très chères sœurs
Hamida, **Ourdia** et **Samira** et leur époux*

A mes chers neveux et nièces

*A mon fiancé **Othmane***

*A mon binôme et meilleur amie, **Lamia***

*A ma grande famille, mes amis et collègues et tous ceux et toutes
celles que j'ai involontairement omis de citer et qui n'en
demeurent pas moins chers*



Ferial

Table des matières

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre I:Aperçu sur les espèces étudiées

I. <i>Daphne gnidium</i> L.	3
I.1.Généralité sur la famille des <i>Thymelaeaceae</i>	3
I.2.Noms vernaculaires de <i>Daphne gnidium</i> L.	3
I.3.Présentation et description botanique de la plante <i>D. gnidium</i>	3
I.4. Classification systématique de la plante	4
I.5. Composition chimique	4
I.6. Répartition géographique.....	5
I.7. Propriétés et utilisation de la plante <i>D.gnidium</i>	5
II. <i>Ephedra alata alenda</i>	6
II.1. Généralité sur la famille des <i>Ephedraceae</i>	6
II.2. Nom vernaculaire d' <i>Ephedra alata alenda</i>	6
II.3. Présentation et description botanique de la plante <i>E. alata</i>	6
II.4. Classification systématique de la plante	7
II.5. Composition chimique.....	7
II.6. Répartition géographique	8

II.7. Propriétés et utilisation de la plante <i>E. alata</i>	8
--	---

Chapitre II : Les métabolites secondaires

I. Les alcaloïdes	9
I.1. Définition des alcaloïdes	9
I.2. Distribution et localisation des alcaloïdes	9
I.3. Biosynthèse des alcaloïdes	10
I.4. Propriétés physicochimique	10
I.5. Activités biologique des alcaloïdes	11
II. Les polyphénols	11
II.1. Définition des polyphénols	11
II.2. Distribution des polyphénols	12
II.3. Biosynthèse des polyphénols	12
II.4. Activités biologique des polyphénols	12

Chapitre III : Activités biologiques

I. Activité antimicrobienne	14
I.1. Activité antimicrobienne des alcaloïdes	14
I.2. Activité antimicrobienne des polyphénols	15
I.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne	15
I.3.1. Aromatogramme	15
I.3.2. Méthode de diffusion en puits	16
I.3.3. Méthodes de dilutions en bouillon et en gélose	16
II. Activité antioxydant	17
II.1. Les radicaux libres	17

II.2. Le stress oxydatif	17
II.3. Espèces réactives oxygénées	18
II.4. Système antioxydant.....	18

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériel	19
I.1. Matériel biologique	19
I.1.1. Matériel végétale.....	19
I.1.2. Présentation des sites de récolte.....	20
• La région de Chabet el Aneur.....	20
• La wilaya de Sétif.....	20
I.1.3. Les souches microbiennes utilisées	21
I.2. Matériel non biologique	21
II. Méthodes	21
II.1. Screening phytochimique	21
II.1.1. Caractérisation des alcaloïdes.....	22
II.1.2. Caractérisation des polyphénols	22
II.1.3. Caractérisation des tanins	22
II.1.4. Caractérisation des flavonoïdes	22
II.1.5. Caractérisation des stéroïdes	22
II.1.6. Caractérisation des saponines	22
II.1.7. Caractérisation des glycosides.....	23
II.2. Extraction des HE.....	23

II.3. Préparation d'extrait aqueux.....	23
II.4. Préparation d'extrait méthanolique.....	23
II.5. Extraction des alcaloïdes totaux	23
II.6. Extraction des polyphénols totaux.....	24
II.6.1. Dosage des polyphénols	25
• Principe de dosage des polyphénols.....	25
• Mode opératoire de dosage des PP.....	25
II.6.2. Dosage des flavonoïdes	26
• Principe de dosage des flavonoïdes.....	26
• Mode opératoire	26
II.7. Chromatographie sur couche mince CCM	26
• Principe.....	26
• Mise en œuvre de l'analyse par CCM.....	27
II.8. Activités biologique.....	27
II.8.1. Activités antioxydant.....	27
• Test du piégeage du radical libre DPPH•.....	27
• Mode opératoire	28
II.8.2. Activités antimicrobiennes	29
II.8.2.1. Activité antibactérienne	29
• Test de l'activité antibactérienne.....	29
II.8.2.2. Activité antifongique	30
• Test d'inhibition de la croissance.....	30
II.9. Analyse des données	30

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Tests phytochimiques préliminaires	31
II. Résultats d'extraction des HE.....	32
III. Rendement des extraits aqueux, alcaloïdique, polyphénolique.....	33
IV. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes	34
V. Résultats de CCM.....	37
VI. Résultats d'activité antioxydant	40
VII. Résultats d'activité antimicrobienne.....	41
VII.1. Résultats d'activité antibactérienne	41
VII.2. Résultats d'activité antifongique	44
Conclusion et perspectives	48

Références bibliographique

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I: Systématique de <i>Daphne gnidium</i> L.	4
Tableau II : Systématique d' <i>Ephedra alata</i>	7
Tableau III : Plantes fraîche et sèche broyée.	19
Tableau IV: Mise en évidence de certaines familles de métabolites secondaires dans <i>l'E. alata</i> et <i>D. gnidium</i>	31
Tableau V: Aspect, couleur et rendement de différents extraits des deux plantes.	33
Tableau VI : Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des extraits de <i>Daphne gnidium</i> et <i>Ephedra alata</i>	35
Tableau VII : Caractéristiques des taches révélées sous UV pour les polyphénols et les alcaloïdes de <i>D. gnidium</i>	38
Tableau VIII : Caractéristiques des taches révélées sous UV pour les polyphénols et alcaloïdes d' <i>Ephedra alata</i>	39
Tableau IX: Pourcentage d'activité antiradicalaire des extraits des plantes étudiées et l'acide ascorbique.	40
Tableau X: Effet des extraits sur les souches bactériennes.	41
Tableau XI: Effet des extraits sur les souches fongiques.	44
Tableau XII: Résultat de l'activité antifongique des extraits aqueux, méthanolique des deux plantes et alcaloïdique d' <i>E.alata</i>	46

Liste des figures

Figure 1 : <i>Daphne gnidium</i> (feuilles, fleurs et fruits)	4
Figure 2 : <i>Ephedra alata</i>	6
Figure 3: Les mécanismes d'action des métabolites secondaire	14
Figure 4: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de pétrie	16
Figure 5: Carte géographique de Chabet el Aneur	20
Figure 6: Carte géographique de Sétif.....	21
Figure 7: Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux	24
Figure 8: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	28
Figure 9: Histogramme de rendement d'extraction	33
Figure 10: Histogramme des teneurs en polyphénols (a) et en flavonoïdes (b) dans les extraits	35
Figure 11: Profils chromatographiques des extraits polyphénolique de <i>D. gnidium</i> (<i>Dg</i>), <i>E. alata</i> (<i>Ea</i>) et le standard acide gallique (<i>Ag</i>) développé dans le système solvant 2.	37
Figure 12: Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique des deux plantes.....	37
Figure 13: Histogramme représente le taux de l'activité antioxydant des extraits..	40
Figure 14: Histogramme d'effet de la plante <i>E.alata</i> sur les souches bactérienne	42
Figure 15: Histogramme d'effet de la plante <i>D. gnidium</i> sur les souches bactérienne	42
Figure 16: Aspect des cultures bactériennes et des zones d'inhibition en présence des extraits.	43
Figure 17: Aspect de la culture <i>Candida albicans</i> en présence des extraits	47

Liste des abréviations

AG : Acide gallique

A. aliaceus : *Aspergillus aliaceus*

A. parasiticus : *Aspergillus parasiticus*

A.flavus : *Aspergillus flavus*

al: Alcaloïde

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

B. thuringiensis: *Bacillus thuringiensis*

C. albicans: *Candida albicans*

CCM : chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : chloroforme

DG: *Daphne gnidium*

DO : densité optique

DPPH• : Diphényl PicrylHydrazyl

E. coli : *Escherichia coli*

E1 : extrait aqueux de *Daphne gnidium*

E2 : extrait aqueux d'*Ephedra alata*

EA: *Ephedra alata*

EAG : Equivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent quercétine

ERO : Espèce Réactive Oxygénée

FeCl₃ : Chlorure d'aluminium

I (%): Inhibition (pourcentage)

M. smegmatis: *Mycobacterium smegmatis*

Na₂ CO₃: Bicarbonate de sodium

ND: not determined

NH₄OH : Hydroxyde d'ammoniaque

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

ONOO⁻ : Nitroperoxyde

OMS: Organisation mondiale de la santé

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

P1 : extrait méthanolique de *Daphne gnidium*

P2 : extrait méthanolique d'*Ephedra alata*

PDA : Potato dextrose agar

Q2 : extrait alcaloïdique

R_f : Rapport frontal

ROS : Espèces réactives oxygénées

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

ET: Ecart type

UFC : unité formatrice de colonie

V / V: volume par volume

Introduction

Depuis des milliers d'année, l'humanité a utilisée divers ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toute sorte de maladies. Actuellement l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 60 % des habitats de la planète ont recours à la médecine traditionnelle à base des plantes en tant que soins de santé primaire, ce chiffre peut atteindre 80% dans les cas des pays en développement (**Djouahra, 2012; Anonyme 1**).

L'Algérie vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique, à laquelle s'ajoute une tradition ancienne d'utilisation traditionnelle des plantes (**Messai, 2011**).

Plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire, la limite thérapeutique des médicaments chimiques, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques (**Iserin, 2001 ; Mohammedi, 2013**).

En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. A titre indicatif, les alcaloïdes qui sont, à faibles doses, dotés de propriétés pharmacologiques et toxicologiques remarquables. De même, les polyphénols, un groupe très diversifié de molécules, dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies (**Bruneton, 2009**).

Dans ce contexte, cette thématique a pour objectif d'étudier et valoriser les alcaloïdes et les composés phénoliques de deux plantes médicinales locales qui poussent spontanément en Algérie: *Daphne gnidium* utilisé pour ses propriétés anticancéreuses et *Ephedra alata alenda* qui est utilisé pour le traitement de diabète (**Ghourri et al., 2013; Mohammedi, 2013**).

Nous avons subdivisé notre travail de recherche en deux parties:

- La première, est consacrée à une synthèse bibliographique sur les aspects botaniques et phytochimiques de la plante. Des généralités, sur les activités antimicrobiennes et antioxydant, ainsi que sur les alcaloïdes et les composés phénoliques.
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail expérimental. En application, des dosages des composés phénoliques et des

flavonoïdes sont réalisés suivie par une chromatographie sur couche mince, les extraits de *Ephedra alata alenda* et *Daphne gnidium* sont testés pour leurs activités antimicrobiennes et leur pouvoir antioxydant. Enfin on a consacré à la présentation et l'interprétation des résultats obtenus.

Notre manuscrit est clôturé par une conclusion générale et de perspectives.

Partie I: Etude bibliographique.

Chapitre I: Aperçu sur les espèces étudiées.

I. Daphne gnidium L.

I.1. Généralité sur la famille des *Thymelaeaceae*

Daphne gnidium appartient à la famille des *Thymelaeaceae*, cette famille comprend environ 500 espèces d'arbres et arbustes généralement toxiques (Van der Bank et al., 2002). Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids (O.M.S., 2002).

Cette famille compte plusieurs genres et espèces différentes. Les genres les plus connues sont *Gnidia* (152 espèces), *Daphne* (90 espèces), *daphnopsis* (73 espèces), *Wikstroemia* (87 espèces) (Anonyme 2).

Les *Thymelaeaceae* ont plusieurs utilisations, elles possèdent une importance économique non négligeable surtout dans les régions où elles poussent. L'écorce de plusieurs genres particulièrement *Wikstroemia*, *Daphne*, *Edgeworthia* et *Thymelaea*, est utilisée pour la fabrication de papier (Potterat, 1997 ; Quezel et al., 1963). Les médecines traditionnelles d'un grand nombre de cultures utilisent les *Thymelaeaceae* pour la préparation de traitements d'une gamme très étendue de troubles ; les emplois comme émétique, purgatif, vésicant et pour le traitement de maladies de la peau. Dans ces applications, les doses sont cependant faibles, afin de favoriser l'effet bénéfique par rapport aux effets secondaires (O.M.S., 2002).

I.2. Noms vernaculaires de *D. gnidium L.*

Un grand nombre de ces dénominations sont des traductions d'une langue à l'autre. Le nom le plus utilisé en Algérie est Lazzaz, en français elle est appelée Daphne Garou, Saint Bois, en anglais Flax-leaved Daphne et en italien Daphne gnidio (Mohammedi, 2013).

I.3. Présentation et description botanique de la plante *D. gnidium*

C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, existe dans tout le Tell de l'Algérie, de 60 cm à 2 m de haut ou plus, à rameaux minces très feuillés. Des feuilles persistantes ou caduques, lancéolées-linéaires, larges de 5-7mm au plus, cupsidées, très denses. Inflorescences terminales en panicule rameuse longue de 5-10cm, entièrement blanche – tomenteuse, fleurs blanches caduques. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé, très toxique. La floraison va d'octobre à mars (Mohammedi, 2013).



Figure 1 : *Daphne gnidium* (feuilles, fleurs et fruits) (Anonyme 3).

I.4. Classification systématique de la plante

Tableau I : Systématique de *Daphne gnidium* L. (Mohammedi, 2013)

Règne:	Végétal
Embranchement:	Phanérogames
Sous Embranchement:	Angiospermes
Classe:	<i>Eudicots</i>
Ordre:	Malvales
Famille:	<i>Thymelaeaceae</i>
Genre:	<i>Daphne</i>
Espèce :	<i>Daphne gnidium</i>
Nom scientifique:	<i>Daphne gnidium</i> L.

I.5. Composition chimique

Le *Daphne gnidium* contient des coumarines (Daphnéline, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine) et des flavonoïdes (lutéolin-3',7-di-*O*-glucoside lutéoline, orientine, isorientine, quercétine, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine, 5-*O*- β -D-primeverosyl genkwanine, 2, 5, 7,4'-tétrahydroxyisoflavanol).

Les graines et les écorces des différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines). L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif et le contact des écorces avec la peau ou les muqueuses provoque une irritation importante (Mohammedi, 2013).

I.6. Répartition géographique

Le *Daphne gnidium* est une espèce méditerranéenne commune dans tout le Tell Algérien, on la retrouve en Europe méridionale et occidentale. Elle est présente dans les forêts, les garrigues et les broussailles (Guide illustré de la flore algérienne, 2011).

I.7. Propriétés et utilisation de la plante *D. gnidium*

Anciennement, l'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques (rougeurs, irritations, ampoules...).

En Phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides, la sclérose en plaque et le sida. Le principe actif susceptible de détruire les leucoblastes malins dans la leucémie myéloblastique aigue en évolution est le Primeverosyl B genkwanine, hétéroside extrait primitivement du *Gnidia kraussiana*, plante de la savane africaine et actuellement du *Daphne gnidium*; cette dernière contient en effet un plus fort pourcentage de principe actif; dont la purification est plus facile.

Dans la pharmacopée traditionnelle, il était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive (Mohammedi, 2013).

Cette espèce est utilisée pour diminuer les inflammations et les douleurs abdominales, cependant, Les femmes l'utilisaient autrefois pour teindre leurs cheveux en noir, l'huile de semences du *Daphne gnidium* est purgative (Guide illustré de la flore algérienne, 2011).

II. *Ephedra alata alenda*

II.1. Généralités sur la famille des *Ephedraceae*

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

II.2. Nom vernaculaire d'*Ephedra alata alenda*

Alenda est le nom populaire en Algérie, en français Ephèdre, *Ephedra* en anglais, et en allemand est appelée Walliser meerträubchen.

II.3. Présentation et description botanique de la plante *E. 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).



Figure 2 : *Ephedra alata* (Anonyme 4).

II.4. Classification systématique de la plante

Tableau II : systématique d'*Ephedra alata* (Ozenda, 1991).

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

II.5. Composition chimique

Selon **Kebili (2016)**, les espèces de l'*Ephedra* sont des sources naturelles de nombreux phyto-constituants incluant des alcaloïdes, des tanins (principalement les proanthocyanidines), des saponines des acides phénoliques, des flavonoïdes (la vicenine II, la lucenine III, le kaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3- rhamnoside et l'herbacetine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés de l'*Ephedra alata*) et des huiles essentielles. Leurs propriétés biologiques sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine, proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine. Notons que la (-) éphédrine et l'(+) pseudoéphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (**Phinney et al., 2005; Soni et al., 2004; Caveney et al., 2001 ; Hegazi et El-Lamey, 2011**).

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

II.6. Répartition géographique

L'espèce *Ephedra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephedra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite. Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte (**Ozenda, 1991 ; Al-Qarawi et al., 2011**).

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

II.7. Propriétés et utilisation de la plante *E. alata*

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

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

En Asie, elle est utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (**Caveney et al., 2001**).

Une étude réalisée par **Boozer et al., 2001** a montré qu'un mélange d'*Ephedra* et de *guarana* favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids.

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 et al., 1990**).

Les espèces *Ephedra* ont aussi des effets néfastes (**Ma et al., 2007**). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une bronchodilatation, une agitation et une mydriase.

Chapitre II : Métabolites secondaires.

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire. Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on compte plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classées selon leur structure chimique (Judd et al., 2002). Parmi ces substances on trouve les alcaloïdes, les composés phénoliques (les flavonoïdes, les tanins, les saponosides), et les huiles essentielles qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

II.1. Les alcaloïdes

II.1.1. Définition des alcaloïdes

Le terme « alcaloïde » a été introduit par W. Meissner au début de XIX^e siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, et fournissent avec les acides, des sels. Ce terme provient de la combinaison de « al kali » (la soude) et de « eidos » (l'aspect). Les alcaloïdes sont nommés d'après la plante qui les a fournis, avec une terminaison en « ine » (Bruneton, 1999 ; Bougandoura, 2011).

On trouve les alcaloïdes principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains microorganismes. Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquels l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine) (Judd et al., 2002), plusieurs classes sont définies selon leur biogénèse et la position de l'azote (voir annexe 1).

II.1.2. Distribution et localisation des alcaloïdes

Selon Chebili (2012) les alcaloïdes sont des molécules très largement répandues dans le règne végétal, surtout dans les familles suivantes : Amaryllidaceae, Papaveraceae, Rutaceae, Fabaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Solanaceae, Rubiaceae. Ils sont exceptionnels chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*), peu répandus chez les champignons (à l'exception de l'ergot de seigle) (Bruneton, 1999 ; Axel et al., 2001).

Tous les organes peuvent en contenir, mais on ne trouve pas toujours les mêmes alcaloïdes dans les différents organes d'une plante, leurs répartition diffère suivant les espèces ; racine (Ipéca), feuille (coca), fruit (pavot), écorce (quinquinas), graines (colchique) (Paris et Hurabielle, 1981 ; Axel et al., 2001)

II.1.3. Biosynthèse des alcaloïdes

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

Selon **Kebili (2016)**, le précurseur des alcaloïdes vrais est un acide aminé; histidine, ornithine, lysine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, acide anthranilique. La formation de l'alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé (hygrine), de deux molécules de même acide aminé (quinolizidines), plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé (spartéine).

Les réactions d'oxydation, d'estérification, d'alkylation, d'éthérifications, etc., justifient la diversité structurale des alcaloïdes. Dans le cas particulier des alcaloïdes terpéniques, les précurseurs ont une origine terpénique (**Bruneton, 2009**).

Fréquemment les alcaloïdes s'accumulent en des emplacements différents de leur lieu de synthèse. Par exemple chez les tabacs, la nicotine est synthétisée au niveau des racines, puis elle migre vers les feuilles (**Guignard et al., 1985, Judd et al., 2002**).

II.1.4. Propriétés physicochimiques

- PM inférieur à 1000.
- Les alcaloïdes non oxygénés et de faible masse moléculaire sont des liquides entraînés à la vapeur d'eau, les alcaloïdes oxygénés ou de masse moléculaire élevée sont généralement des solides cristallins.
- Rarement colorés (berbérine de couleur jaune).
- Leur saveur est amère.
- En générale, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (chloroforme, alcools, acétone).
- Capable de dévier la lumière polarisée.
- Peuvent être fixés sur certains agents adsorbants tels que les charbons actifs ou les argiles du type bentonite (**Fabre et truhaut, 1961 ; Bruneton, 1999 ; Axel et al., 2001**).

II.1.5. Activités biologiques des alcaloïdes

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

Chez l'homme, les alcaloïdes ont un rôle très important dans la stimulation du rythme cardiaque (le sel de sulfate de spartéine, isolée de *Cytisus scoparius*), il est également utilisé pour provoquer la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement.

Les alcaloïdes sont utilisés dans le traitement de l'asthme bronchique et comme médicament analgésique et antiallergique (L'éphédrine, isolée d'*Ephedra sinica*), ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (La berbérine, isolée de *Berberis vulgaris*), et sont utile dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (la galanthamine agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinestérase) (**Mauro, 2006**).

II.2. Les polyphénols

II.2.1. Définition des polyphénols

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils englobent plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques (**Bruneton, 1999 ; Zerargui, 2015**).

La structure chimique est commune pour tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés, ils sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et les éléments qui les relient. Ces molécules présentent toutes un point communs : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) lui-même porteurs fonctions hydroxyles (OH) (**Zerargui, 2015**).

On distingue les phénols simples, parmi eux les acides phénoliques, les flavonoïdes etc., les phénols complexes comme les tanins, lignanes (**Boros et al., 2010**) (annexe 1).

II.2.2. Distribution et localisation des polyphénols

La répartition des polyphénols dans la plante tant qualitative que quantitative varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développements (**Robards et al., 1999 ; Gresele et al., 2011**).

Dans la vacuole, les polyphénols se trouvent sous forme simples et solubles ainsi que les formes polymérisées plus ou moins solubles (tanins). Par contre, les formes insolubles (lignines, formes liées à la subérine, la cutine et à des macromolécules glucidiques) sont directement associées à la paroi des cellules (**Macheix, 1996**).

II.2.3. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes (**Pereira Nunes et al., 2012**).

- Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques : Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (**Knaggs, 2003**).
- Celles issues de l'acétate/malonate, qui conduit à des polys β -coesters (poly-acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy 1,8-anthraquinone ou les naphthoquinones (**Bruneton, 1999 ; Naczk et Shahidi, 2004**).

De plus la diversité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique, elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stiblène etc.) (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

II.2.4. Activités biologiques des polyphénols

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

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

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

Selon **Khelfallah, 2013**, la consommation d'aliments riches en polyphénols réduit l'incidence de nombreuses pathologies, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999 ; Hanhineva, 2010**).

***Chapitre III : Activités biologiques des substances
naturelles.***

I. Activité antimicrobienne

Les mécanismes d'action de molécules bioactives des plantes semblent être nombreux et complexe, ils se résument en l'attaque de la paroi bactérienne, l'acidification de l'intérieur de la cellule bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure et enfin la destruction du matériel génétique conduisant à la mort de la bactérie (Hadi, 2004).

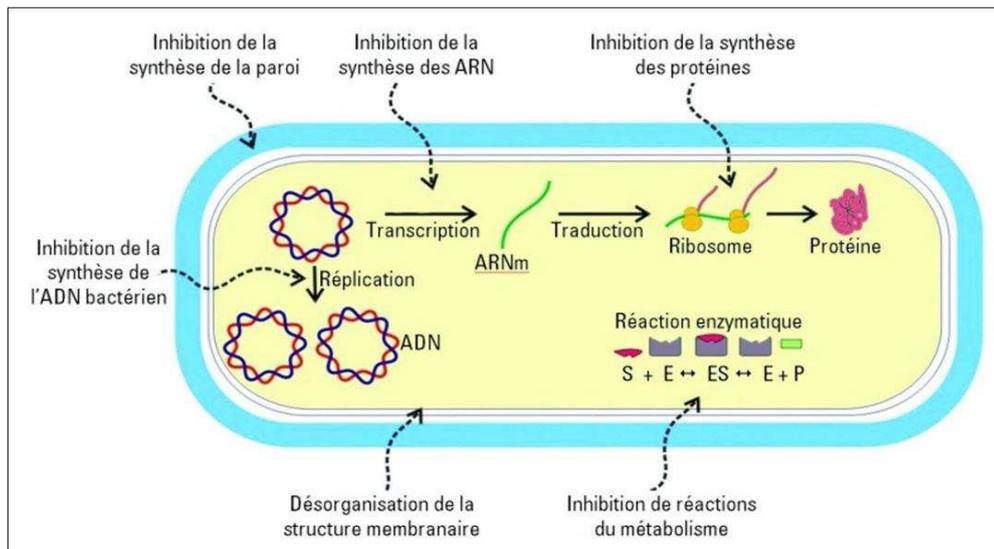


Figure 3: Les mécanismes d'action des métabolites secondaire (Anonyme 5).

Plusieurs études ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des alcaloïdes et des polyphénols.

I.1. Activités antimicrobienne des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont montré un effet remarquable vis-à-vis des souches microbiennes telles que *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *Candida albicans* dont les alcaloïdes sont extrait des plantes suivantes : *Pexhiera Van Heurkii* de Bolivie ; *Berberis vulgaris* ; *Holarrhena floribunda* ; *Ephedra alata alenda* de Ouargla (Algérie) (Moretti et al., 1991 ; Kabore et Millogo ., 1997 ; Mezouar et al., 2014; kebili 2016).

I.2. Activité antimicrobienne des polyphénols

- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie (*Origanum glandulosum* Desf.) sur des souches pathogènes isolées de malades hospitaliers, a montré une grande efficacité et pourrait offrir de grande possibilité d'application dans le domaine médical (Basli, 2011).
- Les polyphénols extraits de quatre plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso (*Combretum micranthum*, *Khaya senegalensis*, *Pterocarpus erinaceus* et *Sida acuta*) ont une activité antibactérienne sur des souches nosocomiale (Damintoti et al., 2005).
- Selon (Senani, 2011 ; Djabali, 2012) les polyphénols issus des margines de la variété *chamlal* (*Oléa europea*) et ceux extraits d'haricot exercent une importante activité antifongique vis-à-vis de *A. flavus*, *A. parasiticus* ; *Alternaria sp.* , *Moniliella sp.* et *Rhizopus sp.*

I.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

Différents protocoles peuvent être utilisée parmi eux on site :

I.3.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. L'aromatogramme se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum. La méthode est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante. Les disques devraient être distribués de sorte que les zones d'inhibition autour des disques ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. (Pibiri, 2006 ; Manuel terrestre de l'OIE, 2008)

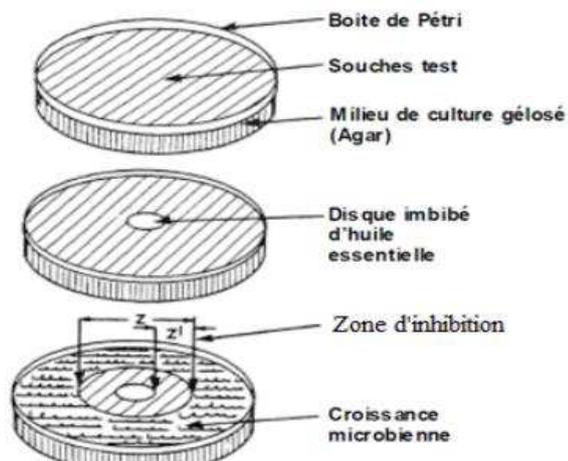


Figure 4: Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de pétrie (Zaika, 1988)

I.3.2. Méthode de diffusion en puits

Elle mesure une diffusion radiale de l'extrait à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition clair et facilement mesurable à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution d'extrait de concentration connue (Hellal, 2011).

I.3.3. Méthodes de dilutions en bouillon et en gélose

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/litre) (Manuel terrestre de l'OIE, 2008).

- Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne, à une concentration déterminée, est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution) (Manuel terrestre de l'OIE, 2008). La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Hellal, 2011).

- Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. La Dilution en gélose présente comme avantage la capacité de tester plusieurs bactéries sur le même ensemble de boîtes de gélose en même temps (**Manuel terrestre de l'OIE, 2008**).

II. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés phytochimique attire l'attention de plusieurs chercheurs de faite de leur rôle important notamment dans la prévention de certaines maladies et la conservation des aliments (**Tlili, 2015**).

II.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont produits dans le cadre de processus métaboliques normaux. Sous les conditions physiologiques, la production de ces radicaux au niveau cellulaire est étroitement contrôlée par un énorme système de défense dit système antioxydant (**Sies, 1997**).

Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés, cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Jacques et André., 2004**).

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

II.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Le stress oxydatif peut causer des dommages aux lipides, protéines ou l'ADN cellulaires, inhibant leurs fonctions normales (**Boyd et al., 2003**).

II.3. Espèces réactives oxygénées

Le dioxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une faible partie d'O₂ en métabolites potentiellement toxiques: les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Tessier et Marconnet, 1995). Il existe plusieurs types d'ERO :

- radicalaires : les principales ERO de ce type sont des formes réduites de O₂: l'anion superoxyde (O₂^{•-}, réduction à 1 électron), le radical hydroxyl (OH[•], réduction à 3 électrons), mais aussi les radicaux oxyl (RO[•]), peroxy (ROO[•]) et le monoxyde d'azote (NO[•]).
-non radicalaires : notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, réduction à 2 électrons), le dioxygène singulet (1O₂), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O₃) et le peroxydinitrite (ONOO⁻) (Favier, 2003 ; Baudin, 2006 ; Aron et Kennedy, 2008).

II.4. Système antioxydant

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance, qui présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnel s'applique à un grand nombre de substances, comprenant les enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petite molécules hydro- ou liposolubles (Cano et al., 2006).

Le système antioxydant est composés principalement d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et de molécules antioxydants de petite taille (glutathion, ubiquinol, vitamines (E, C), caroténoïdes, polyphénols alimentaires, flavonoïdes et les alcaloïdes) (Favier, 2003 ; Achat, 2013).

Selon Djouahra (2012) les composées phénoliques sont considérées comme étant le groupe majeur de métabolites secondaires qui contribuent à l'activité antioxydante des plantes. L'effet antioxydant des polyphénols était démontré par plusieurs études, contrairement aux alcaloïdes.

Partie II : Etude expérimentale.

Chapitre I : Matériels et méthodes.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des rameaux et des feuilles de l'espèce *Ephedra alata alenda*, tandis que pour *Daphne gnidium* la partie utilisée est les feuilles seulement.

Daphne gnidium a été récoltée au mois de février 2017 au niveau de la région Chabet el-Ameur commune Isser (Wilaya de Boumerdes). La récolte d'*Ephedra alata* est effectuée au mois de novembre 2016 au niveau de la Wilaya de Sétif.

Le séchage été fait à la température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant une semaine. Après séchage, les deux plantes ont été broyées par un broyeur électrique et stocké dans un endroit sec.

Tableau III: Plantes fraîche et sèche broyée.

Plante Etat	<i>Daphne gnidium</i>	<i>Ephedra alata</i>
Fraiche		
Sèche broyée		

I.1.2. Présentation des sites de récolte

- La région de Chabet el Ameur

Chabet El Ameur est une ville située dans la daïra d'Issers (Boumerdès). Entourée par Tizi Ghennif, Ammal et Lakhdaria, Située à 187 mètres d'altitude, caractérisée par un Climat méditerranéen avec été chaud (Anonyme 6).



Figure 5: Carte géographique de Chabet el Ameur (Anonyme 7).

- La wilaya de Sétif

La wilaya est située au Nord-est du pays sur les Haut-Plateaux. Le climat de la wilaya de Sétif est de type Méditerranéen continental semi- aride caractérisé par une saison hivernale pluvieuse et fraîche et une saison estivale, sèche et chaude, l'altitude est de 1033 mètres (Zerroug, 2012).



Figure 6 : Carte géographique de Sétif (Anonyme 7).

I.1.3. Souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées pour le présent travail proviennent du laboratoire de Microbiologie de Faculté des sciences (Boumerdes). Il s'agit de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus alliaceus*. Pour *Candida albicans*, elle a été isolée cliniquement sur des malades et identifiée au niveau du laboratoire d'analyse médicale (Lamansouri) à Reghaia. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau 1 (annexe 2).

I.2. Matériel non biologique (voir annexe 4)

II. Méthodes

II. 1. Screening phytochimique

Tous les essais phytochimiques effectués ont pour but de déterminer la composition qualitative, soit sur la poudre de broyat, soit sur un infusé, soit sur l'extrait méthanolique (préparation voir annexe 3).

II.1.1. Caractérisation des alcaloïdes

On met 1ml de l'extrait méthanolique dans 3 tubes à essai pour chacune des deux plantes, 1,5 ml de HCl à 2% a été ajouté, on ajoute 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes de réactif de Wagner dans le deuxième tube et 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le 3ème tube. La présence des alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité blanc, brun et orange, respectivement (**Mojab et al., 2003 ; Gacem, 2011**).

II.1.2. Caractérisation des polyphénols

A 2ml d'extrait méthanolique, 2 gouttes de solution aqueuse de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique la présence de polyphénols (**Koffi et al., 2009**).

II.1.3. Caractérisation des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml d'infusé, 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ à 1%. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou brun verdâtre indique la présence des tanins galliques et cathéchiques respectivement (**Karumi et al., 2004**).

II.1.4. Caractérisation des flavonoïdes

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

II.1.5. Caractérisation des stéroïdes

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

II.1.6. Caractérisation des saponines

Les saponines sont caractérisées par l'apparition d'une mousse (**Bruneton, 1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant 2,5ml d'eau distillé à 2,5 ml de l'extrait aqueux dans des tubes de 1,3 cm de diamètre, après l'agitation, la teneur en saponines est évaluée par la mesure de la hauteur de mousse:

- Pas de mousse = test négatif,
- Mousse moins de 1cm = test faiblement positif,

- Mousse de 1-2cm = test positif,
- Mousse plus de 2cm = test très positif.

II.1.7. Caractérisation des glycosides

1g de poudre est mélangé avec 5ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition de couleur rouge brique indique la présence des glycosides (**Bruneton, 1999**).

II. 2. Extraction des huiles essentielles

Dans notre étude, on a opté pour une extraction des HE par hydrodistillation à partir des deux plantes *Daphne gnidium* (feuilles et graines) et *Ephedra alata*. On a mélangé, dans un ballon bicol, 50g de la poudre végétale avec 300ml d'eau distillée (ED). Celui-là est placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité (**Luchesi, 2005**).

II. 3. Préparation de l'extrait aqueux à 20%

20g de la poudre de chacune des plantes ont été mélangé avec 100 ml d'ED bouillante (100°C) et agité magnétiquement pendant 30 minutes. Le mélange a été filtré par la suite. Après la lyophilisation, le résidu obtenu a été pesé pour déterminer le rendement et conservé dans le réfrigérateur pour une éventuelle utilisation (**Majhenic et al., 2007**).

II. 4. Préparation de l'extrait méthanolique

Une prise d'essai de 20 g de la poudre des deux plantes a été mise à macérer dans 100ml de la solution méthanolique à 20% sous agitation magnétique pendant 1h. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 heures (**Falleh et al., 2008**).

II. 5. Extraction des alcaloïdes totaux

Les alcaloïdes sont des composés organiques à caractère basique qui existent habituellement dans les plantes à l'état de combinaisons salines et dont l'extraction est basée sur la différence de leurs solubilités en milieu acide et en milieu alcalin:

- Les alcaloïdes, à pH basique, sont sous forme de bases insolubles ou peu solubles dans l'eau, et solubles dans les solvants organiques apolaires et les alcools à titre élevés.

- En milieu acide, les alcaloïdes sont à l'état de sels fortement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont par contre insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 2009**).

Le protocole de l'extraction des alcaloïdes totaux est présenté dans la figure 6.

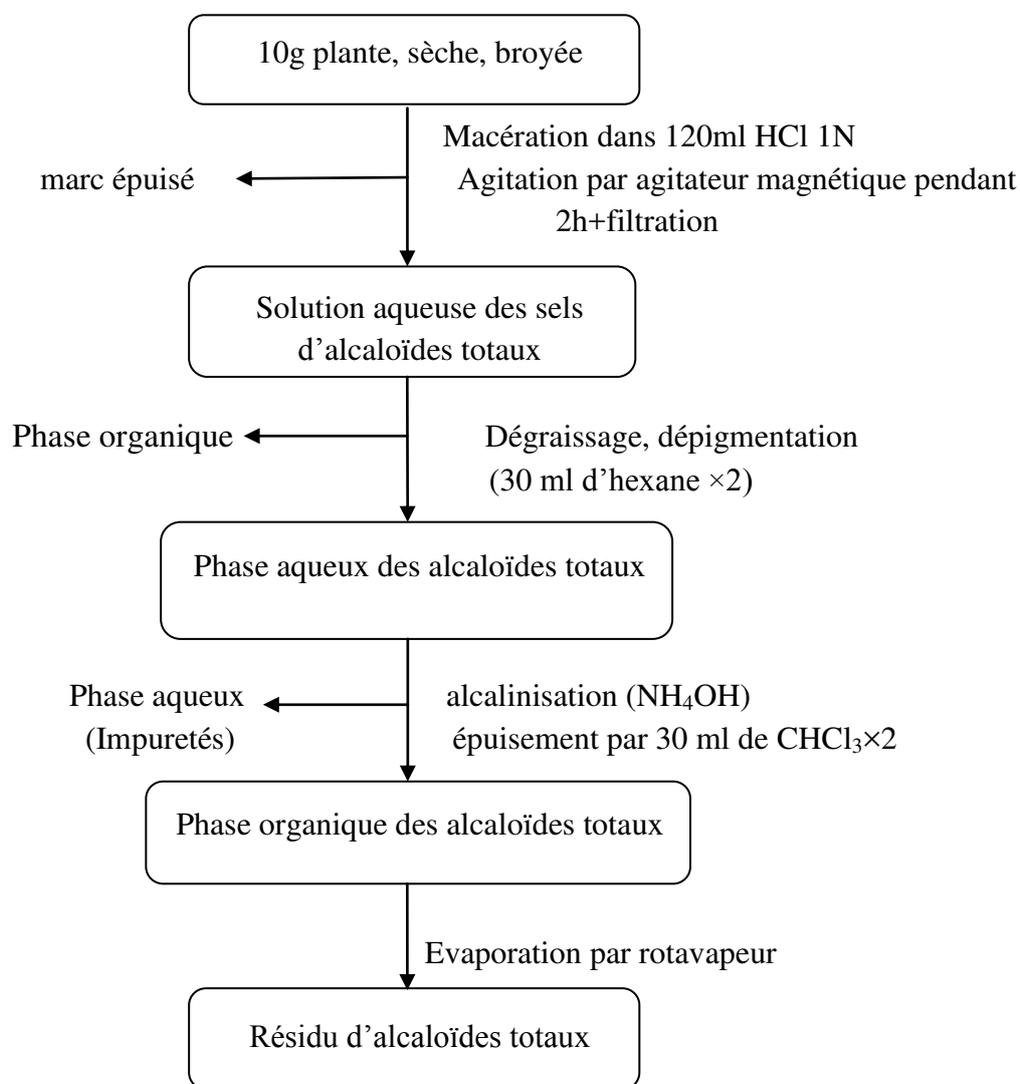


Figure 7 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (**Gresser et al., 1996**).

II.6. Extraction des polyphénols totaux

L'extrait méthanolique préparé est filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C, à l'évaporateur rotatif. Le résidu sec pesé et conservé à 4°C (**Falleh et al., 2008**).

Le taux d'extraction ou le rendement d'extraction des différents extraits est calculé par la formule donnée par **Ouahas et al., (1988)** :

$$\text{Le taux de matière extraite(\%)} = [(P_1 - P_0)/P] \times 100$$

Avec ; P = poids initial de l'échantillon(g)
 P₀ = poids du ballon vide(g)
 P₁ = poids du ballon après évaporation totale(g)

II.6.1. Dosage des polyphénols

- **Principe**

L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phospho-molybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

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

- **Mode opératoire**

Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir de solution d'acide gallique de différentes concentrations préparées d'une solution mère de 2mg d'acide gallique/ml de méthanol (annexe 5).

0,1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes à essai. Un volume de 0,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau) a été additionné dans chaque tube. Après 2 min, 2ml de carbonate de sodium Na₂CO₃ à 20% (m/v) ont été ajoutés. Par la suite ces solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc qui contient du méthanol à la place de l'acide gallique.

La concentration des polyphénols totaux a été déduire à partir de la courbe d'étalonnage. Le résultat a été exprimé en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g). Le dosage a été répété deux fois.

II.6.2. Dosage des flavonoïdes

- **principe**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée avec la méthode du trichlorure d'aluminium. L' AlCl_3 forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 420 nm. Le flavonoïde utilisé comme référence dans cette méthode est le quercétine.

Le contenu flavonique est exprimé en mg équivalent quercétine/g extrait.

- **Mode opératoire**

0,5 ml de chaque solution fille de quercétine ou de l'extrait, est ajouté à 0,5 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% (m/v) dans l'éthanol. Après incubation à l'obscurité pendant 10 min à température ambiante, le dosage s'effectue par spectrophotométrie UV/Visible à 420 nm (Ayoola *et al.*, 2008). Tous les dosages ont été répétés deux fois. Le contenu total en flavonoïdes a été obtenu à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de quercétine, réalisé avec la même méthode, et exprimée en mg d'équivalents de quercétine/ g d'extrait (mg EQ/ g d'extrait).

II.7. Analyse qualitative des extraits méthanolique et alcaloïdique par la chromatographie sur couche mince

- **Principe**

L'analyse qualitative a été faite par chromatographie sur couche mince (CCM) qui est une méthode efficace et rapide associant la sensibilité à la simplicité pour identifier les substances, elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de plastique ou d'aluminium .

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil (dans notre cas : le méthanol) ; lorsque la plaque, sur laquelle on a déposé l'échantillon, est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire par capillarité. Chaque constituant de l'échantillon migre à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et de sa solubilité dans la phase mobile.

Chaque substance qui migre est caractérisée par son rapport frontal ou facteur de retardement (R_f) dont la valeur est comprise entre 0 et 1 (Sine, 2003 ; Djouahra, 2012).

$$R_f = \frac{D1 \text{ parcourue par l'échantillon}}{D2 \text{ parcourue par le front du solvant}}$$

Où R_f : rapport frontal qui est compris entre 0-1

D1 : distance parcourue par l'échantillon (mm)

D2 : distance parcourue par le front de solvant (mm)

- **Mise en œuvre de l'analyse par CCM**

Les analyses sont effectuées avec des plaques de silice déposées sur des feuilles d'aluminium, ce qui constitue la phase stationnaire. 10 µl de chaque extrait (0,1 mg/µl dans le méthanol) ont été déposés à 1cm du bord inférieur de la plaque sous forme des traits. Après séchage, la plaque a été émergée dans une cuve en verre préalablement saturée par la phase mobile. Dans notre cas, deux systèmes de solvants ont été utilisés pour l'extrait méthanolique (système 1 : chloroforme/méthanol 9 :1 v/v, système 2 : acétate d'éthyle / méthanol/eau distillé 100 :13.5 :10 v/v/v) et un pour l'extrait alcaloïdique (toluène/ acétone/ éthanol/ ammoniac 40 :4 :8 :3 v/v/v/v).

Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées à l'œil nu, sous lampe UV à 254 nm et 365 nm. La révélation des polyphénols a été faite par le passage de la plaque sur les vapeurs d'ammoniac, tandis que pour les alcaloïdes le réactif Dragendorff est vaporisé afin d'avoir des taches orangées indiquant leur présence.

II.8. Activités biologiques

II.8.1. Activité antioxydant

- **Test du piégeage du radical libre DPPH•**

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce radical ne forme 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 (figure 7) (Molyneux, 2004). 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).

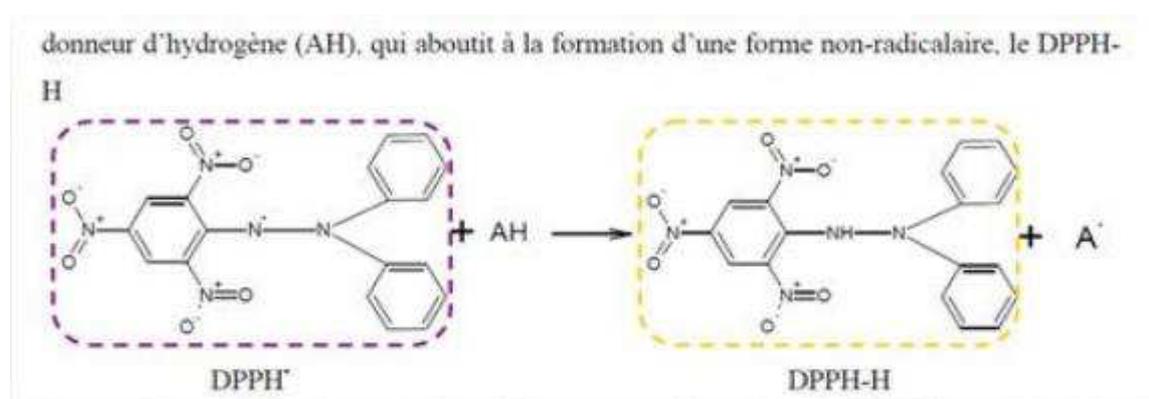


Figure 8 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH[•] entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH) (Molyneux, 2004).

- **Mode opératoire**

50 µl d'extrait préparé dans l'éthanol est additionné à 2 ml de solution DPPH préparée à 6.10^{-5} M dans de l'éthanol. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 1h à la longueur d'onde de 515 nm. Le pourcentage d'activité antioxydant est déterminé par la formule suivante :

$$\%d'inhibition = \frac{(\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance du test})}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

Où le contrôle est préparé, en parallèle, en mélangeant 50µL d'éthanol avec 2 ml de la solution éthanolique de DPPH. Pour pouvoir valoriser le pouvoir anti-radicalaire de nos extraits, l'activité antioxydante de l'acide ascorbique est mesurée de la même façon que l'échantillon (Gramza-Michałowska A. et Człapka-Matyasik M., 2011).

II.8.2. Activité antimicrobienne

II.8.2.1. Activité antibactérienne

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. L'inoculum a été préparé à partir de la préculture. A l'aide d'une anse de platine, quelques colonies ont été prélevées puis introduites dans des tubes à essai contenant l'eau physiologique stérile. Après une bonne homogénéisation de la suspension bactérienne, une lecture de sa densité optique a été effectuée à 625nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 qui correspond à 10^8 bactérie/ml. Une dilution au $1/100^{\text{em}}$ est effectuée afin d'avoir une concentration finale de 10^6 cellule/ml.

- **Test de l'activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne de nos extraits s'est testée en utilisant la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé. La gélose Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes Pétrie stériles à 4 mm d'épaisseur et laissée se gélifier. L'ensemencement de l'inoculum est réalisé en surface (ensemencement en nappe) par des écouvillons stérile. Des disques stériles en papier Whatman N°3 de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec l'extrait à tester, préparé dans le méthanol à 100 μ l d'extrait/disque (100 mg d'extrait par ml de méthanol). Le témoin négatif était un disque imprégné avec le méthanol. Ensuite, les disques sont appliqués avec une légère pression à l'aide d'une pince stérile afin d'assurer le contact avec la surface de la gélose. Les boîtes sont placées dans le réfrigérateur pendant 2 h afin de laisser l'extrait diffuser puis incubées à l'étuve à 37°C en position inversée durant 24 h (**Parsaeimehr et al., 2010**).

L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré (sans pris en considération le disque interne) et exprimé en centimètre. Les écart-types ont été calculés à partir de deux séries d'expériences. Selon **Rodriguez Vaquero et al. (2007)**, l'activité antimicrobienne des extraits ou des composés purs est classée selon le diamètre de la zone d'inhibition (\emptyset) comme suit :

- $\emptyset < 1\text{mm}$: absence de l'activité antibactérienne ;
- $\emptyset = 1\text{mm}$: activité antibactérienne très faible ;
- $2 < \emptyset < 3\text{mm}$: activité antimicrobienne faible ;
- $4 < \emptyset < 5\text{mm}$: activité antibactérienne modérée ;
- $6 < \emptyset < 9\text{mm}$: activité antibactérienne forte ;
- $\emptyset > 9\text{mm}$: activité antibactérienne très forte.

II.8.2.2. Activité antifongique

- **Test d'inhibition de la croissance**

La Méthode de contact direct sur milieu gélosé a été utilisée. Cette technique décrite par **Grover et al. (1962)** et **Khallili (2001)** consiste à mélanger 1 ml d'une solution alcoolique à base d'extrait alcaloïdiques et polyphénoliques, à une concentration de 500mg /ml, avec 9ml du milieu PDA en surfusion, dans un tube à essai stérile. Après agitation, le contenu a été versé dans une boîte de pétri.

Une boîte contenant le milieu PDA et 1ml d'éthanol concentré a été utilisé comme témoin négatif. Un disque de champignon a été implanté au centre de chaque boîte (traitée et témoin), ces dernières sont ensuite incubées à 28C° pendant 7 jours.

Le suivie de la croissance fongique a été effectué tous les deux jours jusqu'à la fin de la durée appropriée d'incubation où l'on procède à la mesure des diamètres de mycélium pour déterminer le pourcentage d'inhibition ou taux d'inhibition, calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition du mycélium} = ((\text{MIc} - \text{MIt}) / \text{MIc}) \times 100$$

Avec : **MIc**= diamètre de mycélium dans la boîte témoin (control)

MIt= diamètre de mycélium dans les boîtes contenant les principes actifs

(Champignons traités) (**Alcamo, 1984 ; Rotimi et al., 1988**).

Pour *Candida albicans*, l'activité antifongique a été révélée uniquement par le test de diffusion des disques sur milieu gélosé, exactement comme pour les bactéries mais en faisant un ensemencement sur gélose Sabouraud. Les boîtes sont incubées à 30 C° pendant 48h (**Senhaji, 2005**).

II.9. Analyse des données

Les analyses de la variance sont réalisées par Excel. Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD (n=2 à 3). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test t pour la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Tests phytochimiques préliminaire

Les résultats des tests phytochimiques préliminaires sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Mise en évidence de certaines familles de métabolites secondaires dans *l'E. alata* et *D. gnidium*.

Métabolites	<i>Daphne gnidium</i>	<i>Ephedra alata</i>	Résultats
Alcaloïdes	 <p>a : Dragendorff, b : Wagner c : Mayer</p>	 <p>d : Mayer, e : Wagner f : Dragendorff</p>	<p>a : précipité orange ++ b : précipité brun +++ c : précipité blanc ++ d : précipité blanc ++ e : précipité brun ++ f : précipité orange +</p>
Polyphénols Chlorure ferrique à 2%	 <p>vert foncé</p>	 <p>bleu noirâtre</p>	+++
Tanins Chlorure ferrique à 1%	 <p>Brun verdâtre (tanins catéchique)</p>	 <p>Bleu noirâtre (tanins gallique)</p>	+++
Flavonoïdes HCL concentré (2N)+ magnésium métallique	 <p>a orange</p>	 <p>b orange claire</p>	<p>a : +++ b : +</p>
Stéroïdes Anhydre acétique+ acide sulfurique	 <p>marron claire</p>	 <p>Marron foncé</p>	-
Saponines Eau distillé	 <p>a : Mousse : 0,5 cm</p>	 <p>b : Mousse : 1 cm</p>	<p>a : + b : ++</p>

Glycosides Acide sulfurique concentré	 rouge brique	 rouge brique	+
---	---	---	---

Le screening phytochimique a montré la présence de divers métabolites secondaires dans les deux plantes : alcaloïdes, polyphénols, tanins (catéchiques dans *D. gnidium* et galliques dans *E. alata*), saponosides, flavonoïdes et glycosides avec une absence des stéroïdes.

La sous espèce *E. alata* de la région de Sétif présente une richesse en métabolites secondaires, la plupart de ces résultats sont conformes à ceux de **Kebili (2012)** qui a étudié la même espèce récoltée de la région d'Ouargla.

Selon **Mohammedi (2013)**, le screening phytochimique réalisé sur les feuilles de *D. gnidium* de Tlemcen a révélée la présence des polyphénols, flavonoïdes et les tannins avec une absence des alcaloïdes, tandis que l'étude menée par **Bouhrara (2016)** sur *D. gnidium* récolté d'El Kala a mis en évidence la présence des alcaloïdes. L'abondance en principes actifs confère aux deux plantes des propriétés pharmacologiques remarquables (**Konkon et al., 2006**). Ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques.

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

II. Résultats d'extraction des HE

Dans la littérature, peu de données sont disponibles sur la présence des huiles essentielles dans nos plantes, pour cette raison, on a essayé de chercher ces composés volatiles.

La mise en œuvre de l'hydrodistillation nous a permis de détecter des traces des huiles essentielles dans les graines de *D. gnidium* mais on a assuré leur absence chez *E. alata*.

Les études les plus représentatives sur le genre *Daphne* sont celles menée par **Sissido et al., (1967)**, sur les fleurs de *Daphne .odora thunb.* prisé au Japon, ces travaux ont permet de mettre en évidence de nombreux monoterpènes volatils.

Jerbi et al., (2016) ont trouvés un rendement de 0,42% de l'huile essentielle dans la plante fraiche *Ephedra alata* de la Tunisie, alors que **Bagheri et al. (2009)** ont trouvés un rendement de 0,1% chez le même genre *Ephedra major* d'Iran.

Face à ces résultats, nous sommes orientés vers l'étude des polyphénols et des alcaloïdes en vue de leurs propriétés pharmacologiques et biologiques.

III. Rendement des extraits aqueux, alcaloïdique et méthanolique

Les extraits récupérés après évaporation à sec sous pression réduite (pour les extraits méthanolique et alcaloïdique) et après lyophilisation (pour les extraits aqueux) ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant.

Les rendements et les différents aspects des extraits sont rapportés dans le tableau V.

Tableau V: Aspect, couleur et rendement de différents extraits des deux plantes.

	<i>Daphne gnidium</i>			<i>Ephedra alata</i>		
Extrait sec	Aqueux	Méthanolique	Alcaloïdique	Aqueux	méthanolique	Alcaloïdique
Aspect	Pâteux	Pate collante	Pâteux	Poudre	Pate collante	Pâteux
Couleur	Verte	Vert foncé	Verte	Jaune	Brune	Vert
Rendement %	22,195	19,296	0,43	7,38	31,659	0,83

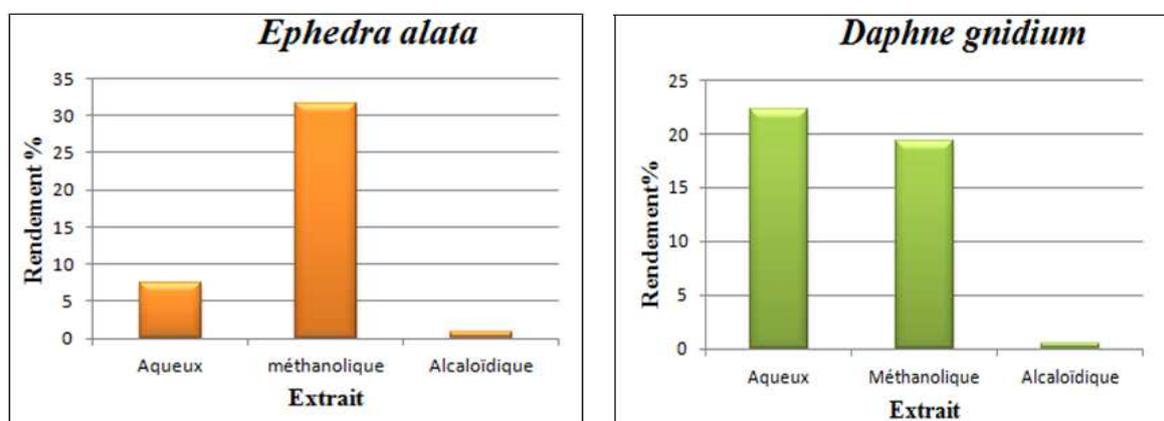


Figure 9: Histogramme des rendements d'extraction.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (**Mohammedi, 2013**). Les rendements des extraits méthanolique et aqueux de *D. gnidium* enregistrés sont très proche, par contre l'extrait alcaloïdique est faible par rapport à ces deux extraits. Chez *E. alata* on a obtenue des faibles rendements dans les extraits aqueux et alcaloïdique et moyen dans l'extrait méthanolique.

Le rendement des alcaloïdes d'*Ephedra alata* (0,83%) est proche à celui trouvé par **Kebili (2016)** (0,96%) pour la même plante de Ouargla, tandis que le rendement d'extrait méthanolique est de 16.21% qui est faible par rapport au rendement trouvé dans notre étude (31,659%). Le rendement d'extrait méthanolique obtenu par **Jerbi et al., (2016)** dans l'*E.alata alenda* de la Tunisie est de (9.18 %) qui s'est montré très faible par rapport à nos travaux.

Mohammedi (2013) a obtenue 96,50 mg/g de poudre dans l'extrait méthanolique de la plante *D. gnidium* de Tlemcen qui est faible en comparant avec la quantité obtenue par notre plante qui égale 192,96mg/g, en revanche, leur travaux représente un fort rendement en substance naturelle dans l'extrait aqueux (627,53 mg/g) face à une quantité de 221,95 mg/g donné par notre extrait.

Les différences marquées entre les rendements des extraits aqueux, méthanolique et alcaloïdique peuvent être attribués à la polarité de solvant d'extraction et la solubilité des composés dans ces solvants.

IV. Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes

La teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la droite d'étalonnage d'acide gallique et de quercétine respectivement exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique ou de quercétine par milligramme d'extrait (voir annexe 5). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau VI.

Tableau VI: Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des extraits de *Daphne gnidium* et *Ephedra alata*.

Extrait	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g d'extrait)*	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)*
E1	79,50 ± 2,65	2,95 ± 0,04
E2	175,75 ± 0,88	0,531 ± 0,02
P1	48,875 ± 21,21	4,138 ± 0,02
P2	105,125 ± 5,30	1,03 ± 0,12

* Les valeurs représentent la moyenne de deux analyses ± ET.

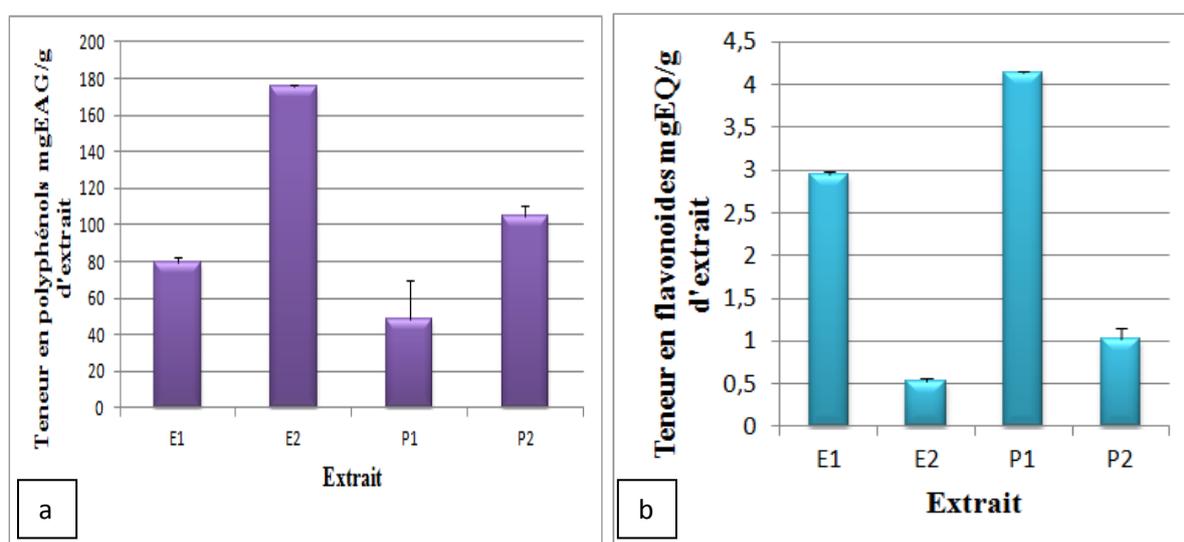


Figure 10: Histogramme des teneurs en polyphénols (a) et en flavonoïdes (b) dans les extraits.

E1 : extrait aqueux de *D. gnidium*, **E2** : extrait aqueux d'*E.alata*, **P1** : extrait méthanolique de *D. gnidium*, **P2** : extrait méthanolique d'*E.alata*.

L'analyse statistique réalisée par le test de student a montré que les teneurs en polyphénols de *D. gnidium* ne sont pas significatif ($P > 0,05$) alors que les teneurs chez *E.alata* sont significatif ($P < 0,05$), les teneurs en flavonoïdes dans les deux plantes sont considérés significatives ($P < 0,05$).

Les résultats obtenus à partir de l'histogramme (Figure 10) montrent que la teneur en polyphénols dans l'extrait aqueux de la plante *D. gnidium* (79,5 mg EAG/g d'extrait) est supérieure par rapport à l'extrait méthanolique (48,875 mg EAG/g d'extrait), contrairement

aux flavonoïdes qui sont en faible quantité dans l'extrait aqueux (2,95 mg EQ/g d'extrait) que dans l'extrait méthanolique (4,138 mg EQ/g d'extrait).

E. alata a présenté une teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique (105,125 mg EAG/g d'extrait) inférieur à celle d'extrait aqueux (175,75 mg EAG/g d'extrait) par contre la teneur en flavonoïdes est supérieur dans l'extrait méthanolique (1,03 mg EQ/g d'extrait) que dans l'extrait aqueux (0,531 mg EQ/g d'extrait).

La plante *E. alata* présente une teneur inférieur en polyphénols dans l'extrait méthanolique (105,125 mg EAG/g d'extrait) comparé au résultat de **Kebili (2016)** qui a obtenue 291,45 mg EAG/g dans la même plante de la région d'Ouargla. Par ailleurs, la teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique d'*Ephedra* de la région d'Ouargla (11,29mg ER/g) et dans l'extrait aqueux de la plante *Ephedra* de Palestine (4.2 mg C/g poids sec) est supérieure à la teneur trouvé dans notre plante (1,03 mg EQ/g d'extrait méthanolique d'*E.alata*; 0,531 mg EQ/g d'extrait aqueux d'*E. alata*) (**Al-Rimawi et al., 2017**).

Pour *D. gnidium* la quantité des composés phénoliques dans l'extrait aqueux (79,5mgEAG/g d'extrait) et l'extrait méthanolique (48,875 mg EAG/g d'extrait) est très élevé par rapport a celle trouvé par **Mohammedi (2013)** qui a obtenue 2,53mg EAG/g d'extrait méthanolique et 18,79 mg EAG/g d'extrait aqueux. Pour les flavonoïdes les teneurs de celui de **Mohammedi** sont très faible dans l'extrait méthanolique et aqueux qui sont de 10,59 ; 0,02 µg ER/g respectivement par rapport à notre (4,138 ; 2,95 mg EQ/g d'extrait respectivement).

V. Résultats de CCM

Deux systèmes solvant ont été testés afin de choisir la meilleure phase mobile permettant une bonne séparation des composés phénoliques, et un système pour les alcaloïdes.

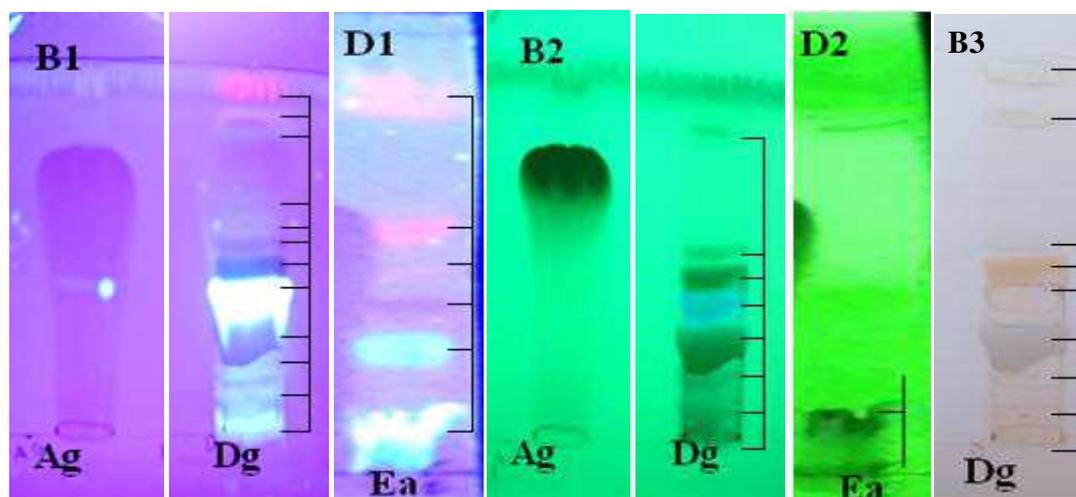


Figure 11: Profils chromatographiques des extraits méthanolique de *D. gnidium* (Dg), *E. alata* (Ea) et le standard acide gallique (Ag) développé dans le système solvant 2. (B1, D1 : Chromatogramme photographié sous lampe UV 365nm, B2, D2: Chromatogramme photographié sous lampe UV 254 nm B3 : Chromatogramme photographié à l'œil nu révélée par l'ammoniaque).

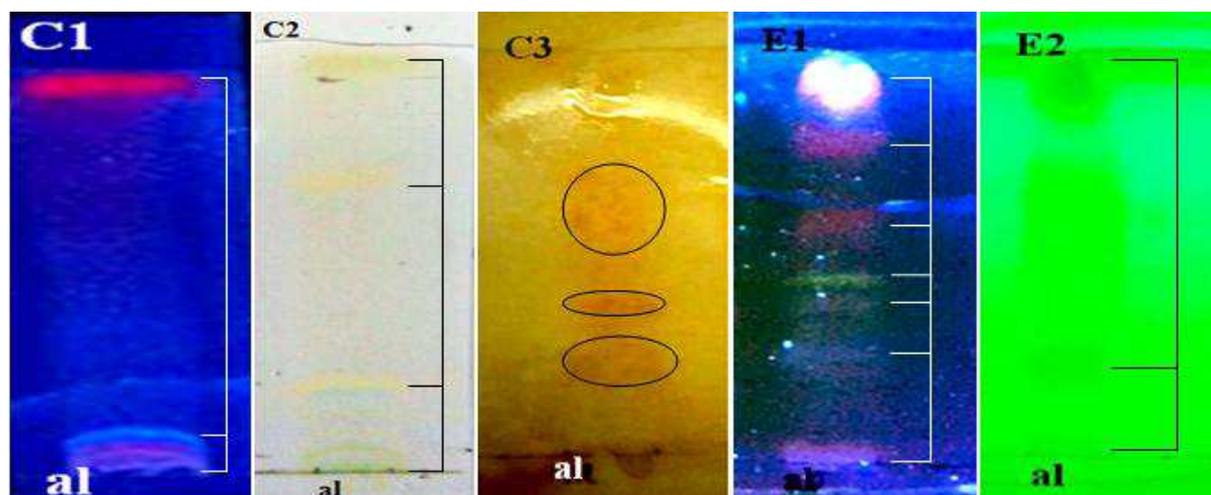


Figure 12 : Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique des deux plantes. (C1 : Chromatogramme de *D. gnidium* photographié sous lampe UV à 365nm, C2 : Chromatogramme de *D. gnidium* photographié à l'œil nu, C3 : Chromatogramme d'*E. alata* photographié après révélation avec Dragendorff, E1 : Chromatogramme de *E. alata* photographié sous lampe UV à 365nm, E2 : Chromatogramme d'*E. alata* photographié sous lampe UV à 254nm).

Tableau VII : Caractéristiques des taches révélées sous UV pour les polyphénols et les alcaloïdes de *D. gnidium*.

<i>Daphne gnidium</i>				
Extrait et standard	N° de la tache	Couleur de taches à 365nm	Couleur de taches à 245nm	Rapport frontal Rf
Acide gallique	1	Bleue fine	Absente	0,36
Polyphénols totaux	1	Bleue fluorescent large	Vert foncé, fine	0
	2	Bleue fluorescent fine	Vert foncé, fine	0,10
	3	Bleue fluorescent fine	Vert foncé, fine	0,16
	4	Bleue foncé, large	Vert foncé, large	0,26
	5	Bleue fluorescent, large	Bleue large	0,36
	6	Noire fine	Vert foncé, large	0,45
	7	Marron fine	Vert foncé fine	0,52
	8	Bleue vert, fine	Absente	0,58
	9	Bleue vert, fine	Absente	0,68
	10	Vert fine	Absente	0,82
	11	Jaune claire, fine	Vert foncé fine	0,89
	12	Rouge fine	Absente	0,95
Extrait	N de la tache	Couleur de la tache à 365nm	Couleur de la tache à l'œil nu	Rapport frontale Rf
Alcaloïdes Totaux	1	Rouge	Vert	0
	2	Vert	Absente	0,10
	3	Absente	Orange claire	0,20
	4	Absente	Orange claire	0,66
	5	Rouge	Marron	0,95

Tableau VIII : Caractéristiques des taches révélées sous UV pour les polyphénols et alcaloïdes d'*Ephedra alata*.

Extrait et standard	<i>Ephedra alata</i>			
	N° de la tache	Couleur de taches à 365nm	Couleur de taches à 245nm	Rapport frontal R _f
Acide gallique	1	Bleue fine	absente	0,36
Polyphénols totaux	1	Bleue fluorescent large	Vert large	0,14
	2	Bleue fluorescent large	absent	0,36
	3	Marron fine	absent	0,42
	4	marron claire, fine	absent	0,5
	5	Rouge large	absent	0,58
	6	Rouge large	absent	0,85
Alcaloïdes Totaux	1	Rose large	Vert large	0
	2	Bleue claire large	Vert large	0,26
	3	Vert fine	absente	0,44
	4	Bleue claire large	absente	0,56
	5	Rose claire large	absente	0,78
	6	Rose large	Vert large	0,93

Les résultats du chromatogramme (figure 11, 12) montrent que :

-Le système solvant 1 contenant le chloroforme/ méthanol (9 :1 v/v) n'a pas permis une bonne séparation pour les polyphénols tandis que le système 2 constitué de l'acétate d'éthyle / méthanol/eau distillé (100 :13.5 :10 v/v/v) donne une bonne séparation (voir annexe 4).

-Le système solvant utilisé pour la séparation des alcaloïdes qui est constitué de toluène/ acétone/ éthanol/ ammoniaque (40 :4 :8 :3 v/v/v/v) a donné une bonne séparation.

Le système solvant 2 utilisé pour la séparation des composés bioactifs a permis la séparation de 6 taches dans *E.alata* et 12 taches dans *D.gnidium*. Les extraits des deux plantes contiennent une tache de fluorescence bleue qui a migré à la même valeur que le R_f de l'acide gallique, donc ils contiendraient probablement ce composé phénolique.

Ce résultat est conforme avec celui de **Didi (2009)** qui a trouvé que l'analyse qualitative des composés phénoliques de la plante *D. gnidium* de Tlemcen par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de l'acide gallique.

Le système utilisé pour la séparation des alcaloïdes a permis la séparation de 6 molécules dans *E.alata* et 5 molécules dans *D.gnidium*.

VI. Résultats d'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été vérifiée en suivant le taux de la réduction du radical libre DPPH• par les extraits de *D. gnidium* (E1 : extrait aqueux, P1 : extrait méthanolique et Q1 : l'extrait alcaloïdique), d'*E. alata* (E2 : extrait aqueux, P2 : extrait méthanolique et Q2 : extrait alcaloïdique) et de l'acide ascorbique sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX: Pourcentage d'activité antiradicalaire des extraits des plantes étudiées et l'acide ascorbique.

Extrait et standard	Acide ascorbique (2mg/ml)	E1 (pour 50mg/ml)	E2 (pour 500mg/ml)	P1 (pour 500mg/ml)	P2 (pour 50mg/ml)	Q1 (pour 21,5mg/ml)	Q2 (pour 41,5mg/ml)
% d'activité	99,29 ± 0,005	92,44 ± 0,019	61,68 ± 0,024	49,73 ± 0,041	89,45 ± 0,019	73,11 ± 0,077	11,95 ± 0,159

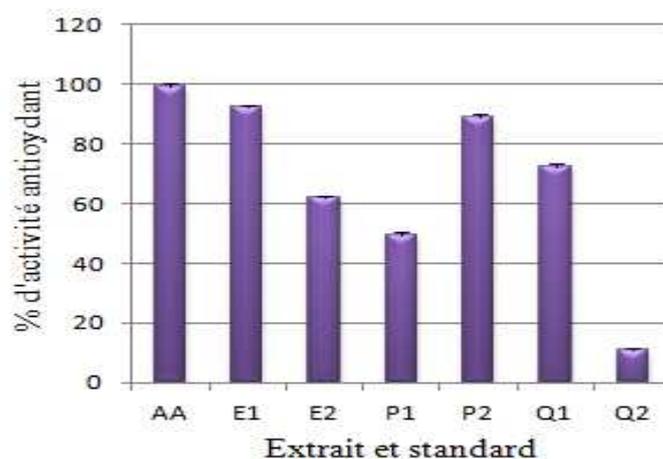


Figure 13 : Histogramme représente le taux de l'activité antioxydante des extraits.

Il ressort de la figure 13 que tous les extraits présentent la capacité à piéger le radical libre DPPH•.

Le pourcentage d'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique 89,45% (50 mg/ml) d'*E.alata* est élevé par rapport à l'extrait aqueux 61,68% (500mg/ml) malgré la concentration qui a été 10 fois inférieur à celle d'extrait aqueux, on note que le pourcentage d'activité des alcaloïdes 11,95% (41,5 mg/ml) semble très faible par rapport à l'extrait méthanolique.

Le pourcentage d'activité de l'extrait méthanolique 49,73% (500mg/ml) de *D. gnidium* est très faible par rapport à l'extrait aqueux 92,44% (50mg/ml) même avec une concentration 10 fois supérieur à celle d'extrait aqueux. Le pourcentage d'activité des alcaloïdes 73,11% (21,5mg/ml) est très fort par rapport à l'extrait méthanolique.

L'activité antioxydante de l'acide ascorbique mesuré in vitro et pris comme antioxydant de référence a montré une capacité très puissante sur le radical libre DPPH[•], Ce standard demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques (Mohammedi, 2013).

En effet, le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique et aqueux d'*E.alata* a été démontré d'après les travaux réalisés par Wilt et al., (2011) sur la même espèce d'*Ephedra*, donc cette plante médicinale peut servir de source puissante d'antioxydant (Palici, 2016). Ainsi la plante *D. gnidium* a montré de bonnes activités antioxydant et bonne capacité de piégeage des radicaux libres pour les différents systèmes antioxydants in vitro (Didi, 2009).

VII. Résultats de l'activité antimicrobienne

VII.1. Résultats d'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne testée par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a permis d'obtenir les résultats notés dans le tableau X.

Tableau X: Effet des extraits sur les souches bactériennes.

Souches testés	Diamètre de zone d'inhibition (cm)					Méthanol
	E1	E2	P1	P2	Q2	
<i>Staphelococcus aureus</i>	0	0,2 ± 0	0,8 ± 0,14	0,25 ± 0,21	0 ± 0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1,3 ± 0,77	0,65 ± 0,35	1,05 ± 0,77	1 ± 0,56	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0,25 ± 0,21	0,1 ± 0	0,25 ± 0,21	1,55 ± 0,21	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0	0,6 ± 0,28	1 ± 0,14	0,75 ± 0,07	1,15 ± 0,35	0

E1, P1 : extrait aqueux et méthanolique de *D. gnidium* respectivement. **E2, P2, Q2** : extrait aqueux, méthanolique et alcaloïdique d'*E. alata* respectivement.

Le degré de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les extraits aqueux, méthanolique des deux plantes et alcaloïdique d'*E.alata* est variable, on note des zones d'inhibition plus au moins différentes comme le montre l'histogramme (figure 14, 15).

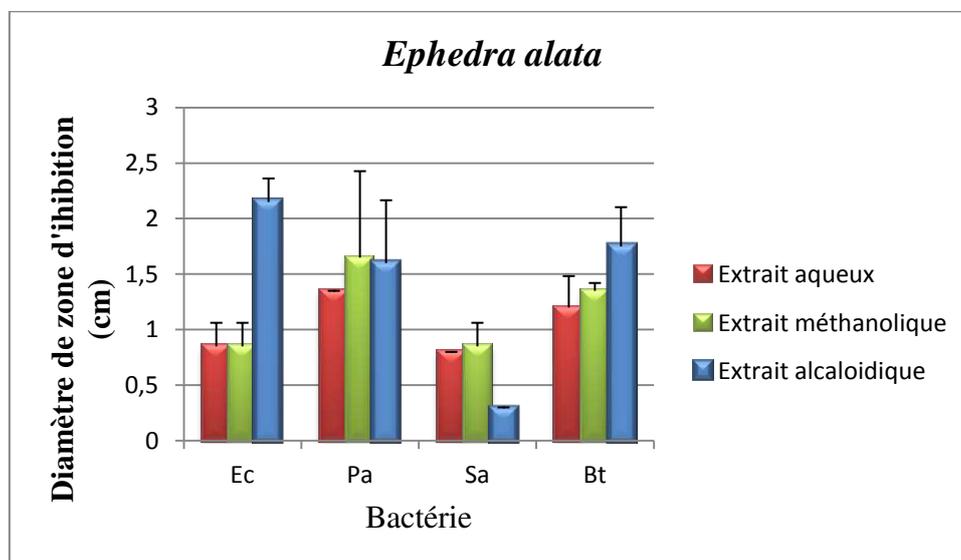


Figure 14 : Histogramme d'effet de la plante *E. alata* sur les souches bactérienne. *Ec* : *Escherichia coli*, *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *Sa* : *Staphelococcus*, *Bt* : *Bacillus thuringiensis*.

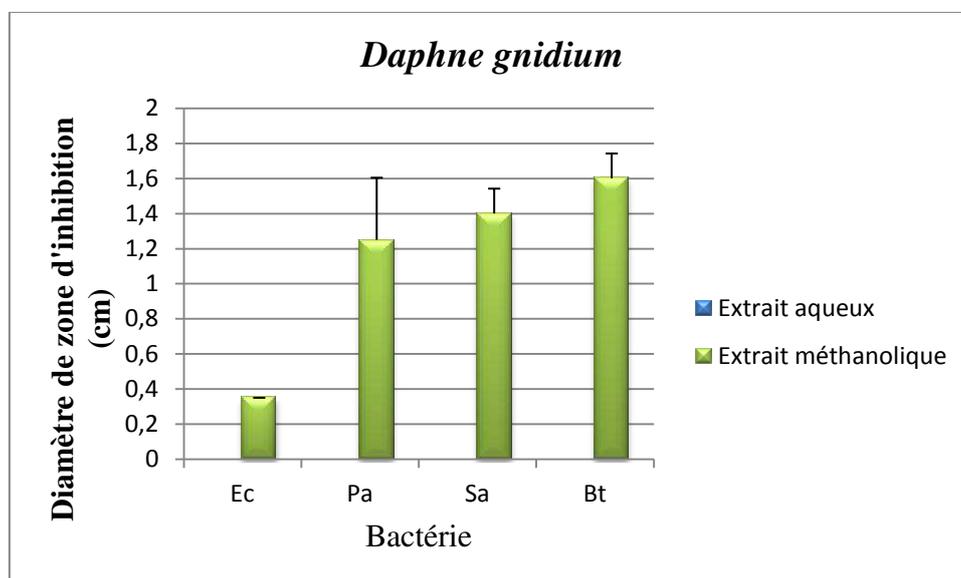


Figure 15 : Histogramme d'effet de la plante *D. gnidium* sur les souches bactérienne. *Ec* : *Escherichia coli*, *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *Sa* : *Staphelococcus*, *Bt* : *Bacillus thuringiensis*.

L'extrait aqueux de *D. gnidium* ne montre aucune activité inhibitrice contre toutes les souches testées, tandis que l'extrait aqueux d'*E.alata* exerce une activité faible sur *S. aureus* et *E. coli*, forte sur *B. thuringiensis* et très forte sur *P. aeruginosa*. L'extrait alcaloïdique d'*E.alata* a une très forte activité contre *E. coli*, *B. thuringiensis* et *P. aeruginosa* et n'a aucun effet sur *S. aureus*.

L'extrait méthanolique d'*E.alata* a une faible activité sur *S. aureus* et *E. coli*, une forte activité sur *B. thuringiensis* et très forte contre *P. aeruginosa*, tandis que l'extrait méthanolique de *D.gnidium* a une très faible activité sur *E. coli*, forte activité sur *S. aureus* *P. aeruginosa* et très forte sur *B. thuringiensis*.

Selon **Kessal et Bouafia (2003)**, l'extrait méthanolique de la plante entière de l'*E.alata* de la région de Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 9,63 mm; 7,31mm et de 15,32mm contre *E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement

Selon **Kebili (2013)**, l'extrait alcaloïdique de la plante *E. alata* de la région Ouargla, a montré des zones d'inhibition de 1,9cm; 0,87; 0,73 contre *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* respectivement. Ainsi l'extrait méthanolique a montré des zones d'inhibition sur ces mêmes souches respectivement 1,35; 0,97; 0,88.

L'extrait méthanolique des tiges du *D.gnidium* de Sardinia (Italie) a présenté une activité antibactérienne contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli* mais il été inactif sur les champignons (**Cottiglia et al., 2001**).



Escherichia coli

Staphelococcus aureus

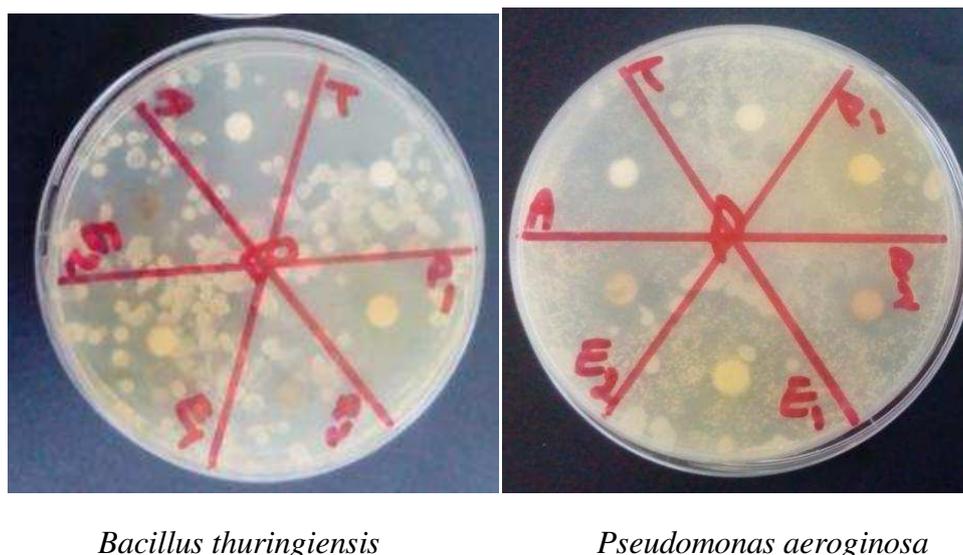


Figure 16: Aspect des cultures bactériennes et des zones d'inhibition en présence des extraits.

P1 : Extrait méthanolique de *D. gnidium*

P2 : Extrait méthanolique d'*E.alata*

A1 : Extrait alcaloïdique d'*E.alata*

E1 : Extrait aqueux de *D. gnidium*

E2 : Extrait aqueux d'*E.alata*

T : Méthanol

VII .2. Résultats d'activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique testée par la méthode de contact direct sur milieu gélosé sont représentés dans le tableau XI.

Tableau XI: Effet des extraits sur les souches fongiques.

Souche fongique / Extrait et témoin	<i>A.parasiticus</i>		<i>A.flavus</i>		<i>A. aliaceus</i>	
	Diamètre de colonie (cm)	Taux d'inhibition (%)	Diamètre de colonie (cm)	Taux d'inhibition (%)	Diamètre de colonie (cm)	Taux d'inhibition (%)
E1	ND	ND	ND	ND	3,8	49,3
E2	ND	ND	ND	ND	4,8	36
P1	2,5	70,58	ND	ND	3,3	56
P2	ND	ND	ND	ND	4,2	44
Q2	ND	ND	ND	ND	6,7	24
Ethanol	8,5	0	ND	ND	7,5	0

Tous les extraits des deux plantes testés exercent une activité inhibitrice sur *A. aliaceus*, les importants taux d'inhibition enregistrées sont celle de l'extrait méthanolique et aqueux de *Daphne gnidium* et méthanolique d'*Ephedra alata* (tableau XII).

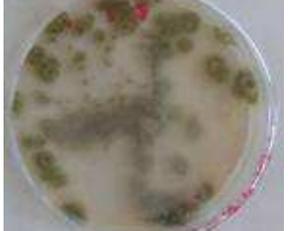
On observe chez *A. flavus* et *A. parasiticus*, que la croissance mycélienne est plus important dans les boîtes traitées que dans la boîte témoin, ce qui prouve que ces extraits ne présentent aucune activité antifongique, mais plutôt certaines favorisent la prolifération et l'envahissement de mycélium. La seule activité observée est celle de l'extrait méthanolique de *Daphne* sur *A. parasiticus*.

Selon **Bagheri et al. (2009)** l'extrait méthanolique (1-1000 µg/ml) de la partie aérienne d'*Ephedra major* inhibe la croissance d'*A. parasiticus* (3,5-18,5%).

Notre résultat n'été pas conforme avec celui de **Mohammedi Z.(2013)** qui a trouvé que l'extrait de la plante aromatique *D. gnidium* a inhibé complètement (100%) la croissance d'*A. flavus*.

C. albicans présente une résistance contre tous les extraits (figure 17). Ce résultat ressemble à celui de **Ghanem et El-Magly (2008)** qui ont montrés que les extraits aqueux et méthanolique d'*E.alata* Egyptiennes n'on pas d'activité sur cette levure, la même résistance a été signalé face aux extraits aqueux et méthanolique de *D. gnidium* Marocaine (**Hajji, 2015**).

Tableau XII: Résultat de l'activité antifongique des extraits aqueux, méthanolique des deux plantes et alcaloïdique d'*E.alata*.

extrait	<i>A. Aliaceus</i>	<i>A. Flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
E1			
E2			
P1			
P2			
Q2			
Ethanol			

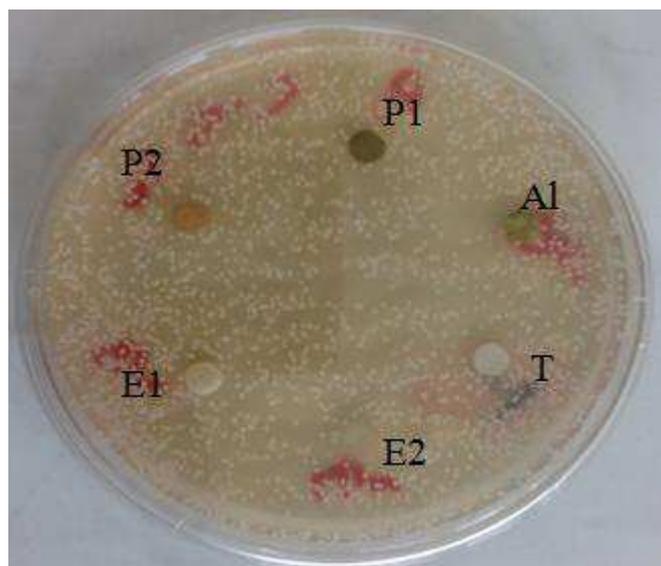


Figure 17 : Aspect de la culture *Candida albicans* en présence des extraits.

P1 : Extrait méthanolique de *D. gnidium*.

P2 : Extrait méthanolique d'*E. alata*.

A1 : Extrait alcaloïdique d'*E. alata*.

E1 : Extrait aqueux de *D. gnidium*.

E2 : Extrait aqueux d'*E. alata*.

T : Méthanol.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons opté pour l'extraction des polyphénols totaux, des alcaloïdes et des extraits aqueux de deux plantes locale *Ephedra alata alenda* et *Daphne gnidium*, puis on a testé leur effet antimicrobien et antioxydant *in vitro*.

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation à partir des graines de *D. gnidium* a révélée des traces des huiles alors que les feuilles et la plante *E.alata* ne contient pas.

La caractérisation des métabolites secondaires dans les deux plantes a révélé la présence des alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tannins, saponines et des glycosides avec absence des stéroïdes.

La détermination des rendements en polyphénols, en alcaloïdes et l'extrait aqueux de ces deux plantes à montré qu'elles possèdent 19,29; 0,43 et 22,19% respectivement pour *Daphne gnidium* et 31,65 ; 0,83 et 7,38% respectivement pour *Ephedra alata*, avec un rendement des polyphénols plus élevé par rapport aux alcaloïdes dans les deux plantes. Après le dosage des composés phénolique par la méthode de Folin-Ciocalteu, la teneur en ceux là a été estimée à 79,5 ; 48,875 mg EAG/g d'extrait sec dans *D. gnidium* et 175,75 ; 105,125 mg EAG/g d'extrait de la plante *E. alata* dans l'extrait aqueux et méthanolique respectivement. Les teneurs en flavonoïdes sont ainsi déterminées grâce à la méthode de trichlorure d'aluminium et sont : 2,95 ; 4,138 mg EQ/g d'extrait sec; et 0,531 ; 1,03 mg EQ/g d'extrait dans l'extrait aqueux et méthanolique de *D. gnidium* et d'*E.alata* respectivement.

La caractérisation des deux extraits des deux plantes par analyse chromatographique sur couches mince (CCM) a permis la séparation de 6 taches d'alcaloïdes chez *E. alata* et 5 chez *D. gnidium*, ainsi que la mise en évidence de la présence d'acide gallique dans l'extrait méthanolique dans les deux plantes.

L'activité antioxydante des extraits aqueux, méthanolique et alcaloïdique des deux plantes est évaluée par l'étude de leurs pouvoir a piégé le radical libre DPPH•, les résultats montre que l'extrait alcaloïdique de *Daphne* a concentration 21,5mg/ml possède un pouvoir antioxydant le plus élevé (71%).

Les résultats de nos travaux ont montré une bonne activité antibactérienne, les souches les plus sensible sont *B. thuringiensis*, *P. aerogenosa* vis-à-vis tous les extraits et l'effet le plus puissant enregistré est celui de l'extrait alcaloïdique de *E. alata* sur *E. coli*. L'extrait aqueux de *D. gnidium* ne présente aucun effet sur toutes les souches testées.

Les résultats de l'activité antifongique ont montré que tous les extraits ont un effet inhibiteur contre *A. aliaceus* dont l'extrait méthanolique le plus puissant inhibe la croissance de mycélium à 56%, alors que l'action de ces extraits sur les deux souches fongiques *A. flavus* et *A. parasiticus* n'a pas été déterminé sauf pour l'extrait méthanolique de *D. gnidium* (qui inhibe à 70,58% la croissance de mycélium). Une résistance complète de levure *C. albicans* a été observé vis-à-vis tous les extraits.

Parmi les perspectives immédiates de cette étude est de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif de médicament synthétique ;
- Utiliser des techniques plus performantes afin d'identifier les métabolites secondaires bioactives de nos plantes ainsi approfondir l'étude de l'activité biologique;
- L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de ces deux plantes.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

- **Achat Sabiha, 2013.** Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse de doctorat : sciences alimentaires. Université A. Mira- Bejaia. 198p.
- **Alcamo E. I., 1984.** Fundamentals of Microbiology. London: Addison-Wesly publishing company: 310-341; 617-699.
- **AL-Qarawi A.A.; Abd_Allah E.F. et Abeer H., 2011.** *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxicogenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, N°16, pp. 2297-2303
- **Al-Rimawi F.; Abu-Lafi S.; Abbadi J.; Alamarneh A. A.A.; Raneen A. Sawahreh R.A.; Odeh I., 2017.** Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 14(2):130-141.
- **Aron P. M. et Kennedy J. A., 2008.** Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research.* 52: 79-104.
- **Axel G.; Seguin E.; Paris M. et Orecchiome A.M., 2001.** Le préparateur en pharmacie. Ed. Doin, Paris.273p.
- **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
- **Bagheri Shahrokh; Shams-Ghahfarokhi Masoomeh; Razzaghi Abyaneh Mehdi et Bigdeli Mohsen, 2009.** Inhibitory Effects of *Ephedra major* Host on *Aspergillus parasiticus* Growth and Aflatoxin Production. *Mycopathologia*, 168:249–255.
- **Basli A. ; Chibane M. ; Madani K. ; Oukil N., 2011.** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10 :2-9.
- **Baudin Bruno, 2006.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* 2 (1): 43-52.
- **Bellakhdar Jamal, 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ed. Ibis Press.764 p.
- **Boozer C.N.; Nasser JA.; Heymsfield S.B.; Wang V., Chen G. et 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

- **Boros B.; Jakabova S.; Dornyei A.; Horvath G.; Pluhar Z.; Kilar F.; Felinger A.; 2010.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
- **Bougandoura Nabila, 2011.** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha ssp nepta* (nabta) et *Ajugaiva* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de magister. Université Abou BakrBelkaid Tlemcen. 85p.
- **Boughrara Boudjema, 2016.** Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêt thérapeutiques et nutritif de parc nationale El-kala. Thèse de doctorat : phytochimie. Université Badji Mokhtar- Annaba.136p.
- **Boyd B., Ford C.; Koepke M.C.; GaryK. ; Horn E.; McAnalley S.; and McAnalley B., 2003.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6):7.
- **Bruneton Jean, 1999.** Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales.3ème Ed. Tec et Doc, Paris.1120p.
- **Bruneton Jean, 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4eme Ed. Tec & Doc, 1268 p.
- **Cano N.; Barnoud D.; Schneider S. M.; Vasson M. P.; Hasselmann M. et leverve X., 2006.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, 255 p.
- **Caveny S.; Charlet D.A.; Freitag H.; Maier-Stoete M. et 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.
- **Chakou M. et Bassou K., 2005.** Efficacités antibactériennes et antifongique des huiles essentielles obtenues par l'extraction de la menthe verte : *Mentha spicata* Lissue de la région de Ouargla sur quelque germe pathogènes : *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES microbiologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla. 27p.
- **Chang P. K., 2008.** *Aspergillus parasiticus crzA*, Which Encodes Calcineurin Response Zinc-Finger Protein, Is Required for Aflatoxin Production under Calcium Stress *Int. J. Mol. Sci*.Vol. 9: 2027-2043.

- **Charpentier J-P. et Boizot N., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestières. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. pp. 79-82.
- **Chebili Sihem, 2012.** Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cystissus triflorus* l'Hérit et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydant. Mémoire de magister. Université de Boumerdes.104p.
- **Chebrouk F., 2009.** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Mémoire de magister : Chimie organique appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla. 60p.
- **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.
- **Cottiglia F.; Ioy G.; Garau D.; Floris C.; Casu M.; Pompei R. et Bonsignore L., 2011.** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium L.* *Phytomedicine*, Vol.8 (4), pp.302-305.
- **Crozier A.; Del Rio D.; Clifford M.N., 2010.** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 446–467.
- **Damintoti Karou; Mamoudou H. Dicko; Jacques Simporté; Saydou Yameogo; Souleymane Sanon; Alfred S. Traoré, 2005.** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso.
- **Derbel S.; Touzard B.; Triki MA. et 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
- **Didi Amel, 2009.** Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de *Arbutus unedo L.* et du *Daphne gnidium L.* de la région de Tlemcen. Mémoire de magister : Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.119 p.
- **Djabali Saliha, 2012.** Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec. Mémoire de magister : sciences alimentaires. Université Mentouri-Constantine. 81p.

- **Djouahra Djamilia, 2012.** Alcaloïdes et polyphénols d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) : effet antimicrobien. Mémoire de magister : Biochimie appliqué et microbiologie. Université M'Hamed bouguera Boumerdes.98p.
- **Dovičičová Maria; Tančinová Dana; Labuda Roman et SuLyok Michael, 2012.** *Aspergillus parasiticus* from Wheat Grain of Slovak Origin and its Toxigenic Potency. *Czech J. Food Sci* , Vol. 30, No. 5: 483–487.
- **Evans William Charles, 2009.** Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).616p.
- **Fabre René; Truhaut René, 1961.** Précis de toxicologie. Tom 2. Société d'édition d'enseignement supérieur, paris, pp.379-454
- **Falleh H.; Ksouri R., Chaieb K.; Karray-Bouraoui N.; Trabelsi N.; Boulaaba M. and Abdely C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compt. Rend. Biol.* Vol. 331. pp372-379.
- **Favier Alain, 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 17: 501-512.
- **Ferrari Julien, 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud.ex A. Rich. Thèse de doctorat : Pharmacie. Université de Lausanne.188p.
- **Gacem Mohamed Amine, 2011.** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire de magister : Microbiologie Appliqué. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 70p.
- **Ghanem Sameh et El-Magly Ussama I.A., 2008.** Antimicrobial Activity and Tentative Identification of Active Compounds from the Medicinal *Ephedra alata* Male Plant. *J T U Med Sc.*, Vol. 3, N°1, pp. 7-15.
- **Ghourri M.; Zidane L.; Douira A., 2013.** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.17, pp. 2388-2411.
- **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.

- **Gresser G., Witte L., Dedkov V. P. et Czygan F. C., 1996.** A survey of quinolizidine alkaloids and phenylethylamine tyramine in *Cytisus scoparius* (*leguminosae*) from different oricins. *Z. Naturforsch*, 51c, 791-801.
- **Grezel P.; Cerletti C.; Guglielmini G.; Pignatelli P.; De Gaetano G. et Violi F., 2011.** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J.of Nutr. Biochem.*, 22:201-211.
- **Grover R.K.; Moore J.D., 1962.** Toximetric studies of fungicides against the brown rot organisms, *scleronia fruticola* and *S.laxa*. *Journal of Phytopathology*, 52, 876-880.
- **Guide illustré de la flore algérienne, 2011.**
- **Guignard J. L.; Cosson L. et Henry H., 1985.** Abrégé de phytochimie. Ed. Masson, Paris. 224p.
- **Hadi Milane, 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro- oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse doctorat : Pharmacochimie. Université Louis Pasteur.155 p.
- **Hajji H.; El Makhfi F.; Tallal I.; Abdennebi E.; Alaoui Faris F.E.; Ouffak L. et El Aissami A., 2017.** *In Vitro* Evaluation of Antifungal Activity of *Daphne Gnidium* Extracts against Six Human Pathogenic Fungi. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, Vol.10 : 900-905.
- **Hanhineva K; Törrönen R; Bondia-Pons I; Pekkinen J; Kolehmainen M.; Mykkänen H. et Poutanen H.; 2010.** Impact of Dietary Polyphenols On Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol.Sci*, 11:1365-1402.
- **Hegazi G.A.E. et El-Lamey T.M., 2011.** *In vitro* Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, Vol,1, N°8, pp.158-163
- **Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*: Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister." Biochimie appliquée et Biotechnologies". Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p. 16-17.
- **Ionut-Florin Palici, 2016.** Valorisation des Activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Médecine & de Pharmacie de Timisoara, Roumanie. 110p.
- **Jacques B et André R., 2004.** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.

- **Jerbi A.; Zehri S.; Abdnnabi R.; Gharsallah N.; Kammoun M.; 2016.** Essential Oil Composition, Free-Radical-Scavenging and Antibacterial Effect from Stems of *Ephedra alata alenda* in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*.
- **Judd W.S.; Campbell C.S.; Kellogg E.A.; Stevens P.F., 2002.** Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris, 383p.
- **Kabore Z.I.; Millogo K. H., 1997.** Etude antibactérienne in vitro d'extraits alcaloidiques de *Holarrhena floribunda*, vis-à-vis de *Escherichia coli* enteropathogène, sérotype 0127. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, Vol. 9, pp. 17-23.
- **Karumi, Y.; Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O.; 2004.** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4, 179-182.
- **Kebbab Rima, 2014.** Etude de pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété chamlal : Evaluation de l'activité avant et après deglycosylation. Mémoire de magister : Biochimie appliqué aux bio-industries.. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 116p.
- **Kebili Zohra, 2016.** Contribution a l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région de Ouargla. Mémoire de magister : Biochimie et Analyse des Bioproduits. Université Kasdi Merbah-Ouargla.102p.
- **Kessal A. et Bouafia O., 2003.** Phytoscreening and antibactériel of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla.Mem. p. 66.
- **Khallili Adel Raouk. M., 2001.** Phytofungitoxic properties with aqueous extract of some plants. *Pakistan journal of biological sciensis*, 4(4), 392-394.
- **Khelfallah Amina, 2013.** Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. mémoire de magister : Biologie Appliquée. Université de Constantine 1.134p.
- **Khirdidine Hamida, 2013.** Comprimés de poudre de dates comme support universel des principes les actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. Mémoire de magister : Génie Alimentaire. Université de Boumerdes.96p.
- **Knaggs Andrew R., 2003.**The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 20:119–36.

- **Koffi N.; Beugré K.; Guédé N.; Dossahoua T.; et Laurent A., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, Vol. 6, N°2, pp 1 – 15.
- **Konkon N.G.; Simaga D. et Adjoungova A.L., 2006.** Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, Vol. 14, pp. 73-80.
- **Limberger R.P.; Jacques A.L.B.; Schmitt G.C. et Arbo M.D., 2013.** Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*, pp. 1218- 1237.
- **Lock O.; Cabello I.; Doroteo V. H., 2006.** Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 6-11.
- **Lowy F. D., 1998.** Staphylococcus aureus infections. *The new England Journal of Medicine*, Vol. 339, N°8, pp. 520-532.
- **Luchesi Marie-Elisabeth, 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes-conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat : chimie. Université de la Réunion, France, 132p.
- **Ma G.; Bavadekar S.A.; Davis Y.M.; Lalchandani S.G.; Nagmani R.; Schaneberg B.T.; Khan I.A.; et Feller D.R., 2007.** Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human α_1 - and α_2 Adrenergic Receptor Subtypes. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 322, N°1, pp. 214- 221.
- **Macheix J.J., 1996.** Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle, *Acta bot. Gallica*, Vol.143, N°6, pp. 473-479.
- **Majhenic L.; Kerget M.S. et Knez Z., 2007.** Antioxydant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, 104: 1258-1268.
- **Malec L.S. et Pamilio A.B., 2003.** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry*, 1, 30-38.
- **Manuel terrestre de l'OIE, 2008.** Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance, p. 61-71.
- **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*, 51 : 304–315
- **Martínez-Cayuela M., 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, Vol. 77, pp: 147-161.

- **Mauro Neves Muniz, 2006.** Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse de doctorat : chimie. Université Joseph Fourier Grenoble I, 181p.
- **Merghem R., 2009.** Element de Biochimie végétale, 1^{ier} edition. Edition Bahaeddine, pp.149-158.
- **Messai Laid, 2011.** Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'Est Algérien (Artemisia Herba Alba). Thèse de doctorat : Chimie organique. Université de Mentouri Constantine.96p.
- **Mezouar D.; Lahfa F.B.; Abdelouahid D.E.; Adida H.; Rahmoun N.M.; Boucherit-Otman Z., 2014.** Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racines de Berberis vulgaris. *Phytothérapie Springer-Verlag France*. pp.1-6
- **Mohammedi Zohra, 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat : Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Telemcen.160p.
- **Mojab F.; Kamalinejab M.; Ghaderi N. et Vahidipour H.R.; 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, pp.77-82.
- **Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, Vol, 26, N°2, pp.211-2199.
- **Moretti Christian; Munoz V.; Sauvain M.; Caron C.; Porzel A.; Massiot G.; Le Men Olivier L., 1991.** Activité antileishmanienne et antimicrobienne des alcaloïdes de *Peschiera Van Heurkii* (Muell. Arg.) L. Allorge. *Substances naturelles d'origine végétale*, pp.183-185
- **Nacz M.; Shahidi F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.*, 1054: 95-111
- **Nawwar M.A.M; El-Sissi H.I. et Barakat H.H., 1984.** Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, Vol. 23, N°. 12, pp. 2937-2939
- **Organisation Mondiale de la Santé, 2002.** Traditional medicine strategy 2002-2005.
- **Ouahas R., Devalez B., 1988.** Chimie generale 4 éme édition. Edition : OPU, Alger. Pblisud, Paris . 504p.

- **Ould El Hadj M.D.; Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H., 2003.** place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d’Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, pp. 47-51
- **Ozenda P., 1991.** Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3éme Ed.). 662 p
- **Palici Ionot-Florin, 2016.** Valorisation des activités biologique de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines. Thèse de Doctorat : Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agroalimentaires. Université de Bordeaux, 135p.
- **Palidain M.B.; Frisvad J.C.; Vaamonde G.; Cabral D.; Varga J.; Samson R.A., 2008.** Two novel aflatoxin producing *aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 725–735.
- **Paris M. et Hurabielle M., 1981.** Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. *Ed: Masson*. 210-215.
- **Parsaeimehr Ali; Sargsyan Elmira et Javidnia Katayoun, 2010.** A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of *Ephedra*. *Molecules*, Vol.15, pp.1668-1678.
- **Paterson D. L., 2006.** Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*. Vol. 34, N°5, pp. 20-28.
- **Pereira Nunes X; Souza Silva F.; Alneida J.R.G. et al., 2012.** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1 ère édition Venketeshwer Rao. pp. 1 -20
- **Perry J.J.; Staley J.T. et Lory S., 2004.** Microbiology. Cours et questions de revision. Dunod. 912p.
- **Phinney K.W.; Ihara T. et Sander L.C., 2005.** Determiration of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077, pp. 90–97
- **Pibiri M., 2006.** Assainissement microbiologique de l’air et des systèmes de ventilation au moyen d’huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne. 161p.

- **Popovici C.; Saykova I. et 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.
- **Potterat O., 1997.** Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current organic chemistry*, 1, 415-440.
- **Prior R.L.; Wu X. et Schaich K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, N°. 10, pp. 4290- 4302
- **Quézel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. *Centre national de la recherche scientifique*, Paris, France.
- **Ribéreau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod. Paris.* pp. 173-201.
- **Robards K.A.; Paul D.; Prenzler A.; Greg Tucker B.; Prasan Swatsitang B. et William G., 1999.** Phenolic compounds and their role in oxidation processes in fruits. *Food chem.*, 66:401-436.
- **Rodríguez Vaquero M.J.; Alberto M. R.; et Manca de Nedra M.C., 2007.** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, 93-101.
- **Rotimi V.O.; Laughon B.E.; Bartlett J. G. et Mosadomi H. A., 1988.** Activities of Nigerian chewing stick extracts against *Bacteriodes gingivalis* and *Bacteriodes melaninogeneticus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32: 598,600.
- **Sakagami H.; Hashimoto K.; Suzuki F.; Ogiwara T.; Satoh K.; Ito H.; Hatano T.; Takashi Y. et Fujisawa S., 2005.** Molecular requirements of lignin carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66 (17): 2108-2120.
- **Schnepf E.; Crickmore N.; Vanrie J.; Lereclus D.; Baum J.; Feitelso J. et Dean D. H., 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology views*, 62(3), 755-806.
- **Senani Nassima et Moulti-Mati Farida, 2011.** « Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété *chamlal (oléa europea)* sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* ». VI ème congrès international QPE-TV. Qualité des produits et de l'Environnement traitement et valorisation des rejets et effets sur la santé Humaine du 08 au 10 Avril 2011 à Mahdia-Tunisie.

- **Senhadji O., Faid M. Elyachioui M., Dehhaoui M., 2005.** Etude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle Antifungal activity of different cinnamon extracts. *Journal de mycology médicale*, 15 : 220-229.
- **Shabana M.M.; Mirhom Y.W.; Genenah A.A.; Aboutabl E.A. et Amer H.A., 1990.** Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Arch Exp Veterinarmed*. Vol. 44, N°3, pp.389-394.
- **Sies H., 1997.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, Vol. 82, pp. 291- 295.
- **Sine J. P. 2003.** Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A. p 99-101.
- **Sisido K.; Kurozumi S. et Utimoto K., 1967.** Fragrant flower constituents of *Daphne odora* Thunberg. *Perfum. Essent. Oil Rec.* 58, 528-529.
- **Soni M.G; Carabin I.G.; Griffiths J.C. et Burdock G.A., 2004.** Safety of *ephedra*: lessons learned. *Toxicology Lettersn*, Vol. 150, pp. 97–110
- **Tessier F. et Marconnet P., 1995.** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*. 10: 01-13.
- **Tlili Mohammed Laid, 2015.** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister : biochimie et analyse de bioproduits. Université Kasdi Merbah – Ouargla.84p.
- **Van der Bank M., Fay M.F., Chase M.W., 2002.** Molecular Phylogenetics of Thymelaeaceae with Particular Reference to African and Australian Genera. *Taxon*, 51, 329–339.
- **Zaika L. L., 1988.** "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination". *Journal of Food Safety* Vol. 9, N°2, pp: 97-118.
- **Zerargui F., 2015.** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives .Thèse de doctorat : Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.126 p.
- **Zerroug K., 2012.** Elaboration d'un système d'information géographique (flore) dans la wilaya de setif. Memoire de magister : Biodiversite et gestion des ecosystème. Université Ferhat Abbas Sétif 1.114p.

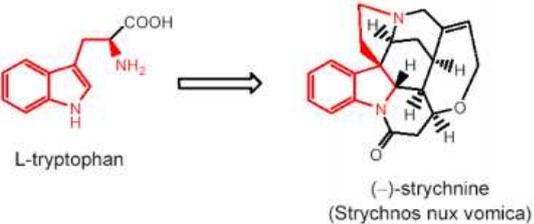
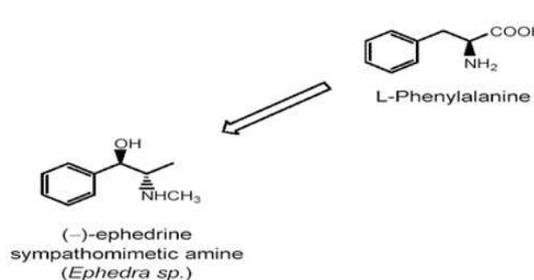
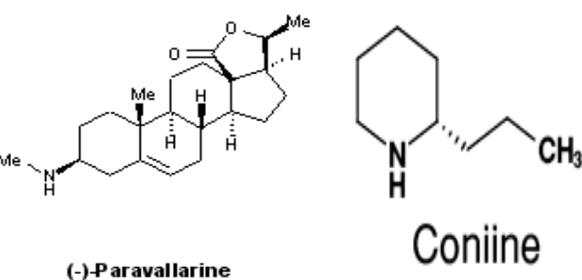
Références électronique :

- **Anonyme 1 : Dos Santos Almeida C., 2015.**
<https://mfgnu.files.wordpress.com/2015/12/ag4-santc3a9-medecinestradiationnelles-claire.pdf>. (cons. le 10 juin 2017)
- **Anonyme 2 : The Plant List, 2010.** Thymelaeaceae [WWW Document]. URL <http://www.theplantlist.org/browse/A/Thymelaeaceae/> (cons. le 6.04.17).
- **Anonyme 3: Miguel del Corro, del manzanares algua darrama Wordpress.com.**(cons. Le 05 juin 2017)
- **Anonyme 4 : Plantes de l'algérie.**
<http://plantessalg.esy.es/plantes/familles/ephedracees/ephedra-alata-decne/> (cons. Le 05 juin 2017)
- **Anonyme 5 : www.crdp-aquitaine.fr.** (cons. Le 05 juin 2017)
- **Anonyme 6 : www. Annuaire-mairie.fr.** (cons. Le 05 juin 2017)
- **Anonyme 7 : www.google.dz/map.** (cons. le 07juin 2017)
- **Anonyme 8: World Search, Aspergillus and Aspergillosis Website.**(cons. Le 05 juin 2017)

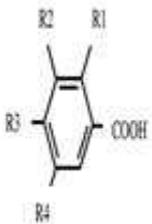
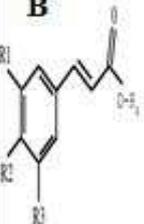
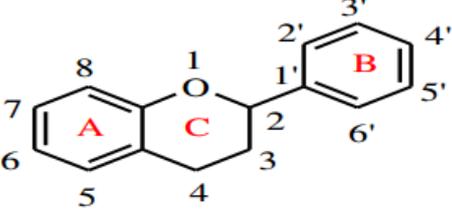
Annexes

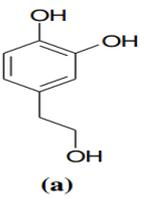
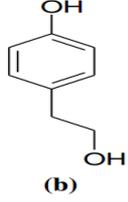
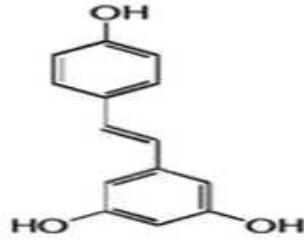
Annexe 1

A. Structure et classification des alcaloïdes (Bruneton, 1999)

Type d'alcaloïde	structure
<p>Les alcaloïdes vrais</p> <p>Ils dérivent d'acides aminés, et présentent au moins un hétérocycle. (Exemple : la strychnine dérivée du tryptophane).</p>	 <p>L-tryptophan</p> <p>(-)-strychnine (Strychnos nux vomica)</p>
<p>Protoalcaloïdes</p> <p>Sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, sont élaborée in vivo a partir d'acides aminés (exemple : l'éphédrine).</p>	 <p>(-)-ephedrine sympathomimetic amine (Ephedra sp.)</p> <p>L-Phenylalanine</p>
<p>Pseudo-alcaloïdes</p> <p>Ne sont pas des dérivés d'acides aminés ; il s'agit dans la plupart des cas connus d'isoprénoides et l'on parle d'alcaloïdes terpénique (paravallarine) on connaît également des substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate (coniine).</p>	 <p>(-)-Paravallarine</p> <p>Coniine</p>

B. Structure et classification des polyphénols (Achat, 2013)

Classe	Définition
<p>I. Polyphénols simples</p> <p>I.1. Acides phénoliques</p>	<p>Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C₆-C₁) et de l'acide hydroxycinnamique (C₆-C₃).</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="456 674 948 958" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">A</p>  <p>R1 = R2 = R3 = R4 = H : acide benzoïque (non phénolique) R1 = R2 = R4 = H, R3 = OH : acide p-hydroxybenzoïque R1 = R4 = H, R2 = R3 = OH : acide protocatechique R1 = R4 = H, R2 = OCH3, R3 = OH : acide vanillique R1 = H, R2 = R3 = R4 = OH : acide galique</p> </div> <div data-bbox="986 674 1458 958" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;">B</p>  <p>R1 = R2 = R3 = R4 = H : acide cinnamique (non phénolique) R1 = R3 = R4 = H, R2 = OH : acide p-coumarique R1 = R2 = OH, R3 = R4 = H : acide caféique R1 = OCH3, R2 = OH, R3 = R4 = H : acide férulique R1 = R3 = OCH3, R2 = OH, R4 = H : acide sinapique R1 = R2 = OH, R3 = H, R4 = OH : acide quinoique ; acide chlorogénique</p> </div> </div> <p>Figure 1 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (A) et des acides hydroxycinnamiques (B)</p>
<p>I.2. Flavonoïdes</p>	<p>Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central type pyrane (C₆-C₃-C₆) (Figure 2). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques.</p> <div data-bbox="459 1308 932 1541" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">  </div> <p>Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes.</p> <p>Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines.</p>

<p>I.3. Alcools phénoliques</p>	<p>Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>(a)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(b)</p> </div> </div> <p>Figure 3 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b).</p>
<p>I.4. Les stilbènes</p>	<p>Ce sont des composés ayant comme structure de base le 1,2-diphenylethylène(C₆-C₂-C₆) dont quelques représentants sont: le pinosylvine et l'hydrangénol.</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Figure 4 : structure chimique de résvératrol exemple d'un stylbène (Kebbab, 2014)</p>
<p>II.Polyphénols complexes I- Tanins</p>	<p>Sont localisés dans les vacuoles, caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés.</p>
<p>I.1. tanins hydrolysables</p>	<p>ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase).</p>

- Tannins condensés

les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C₄ et C₈ ou C₄ et C₆.

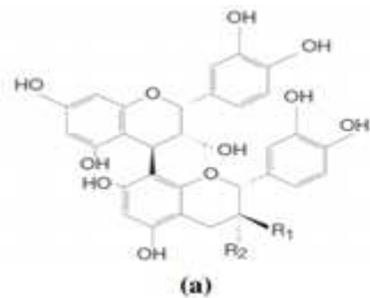


Figure 5: Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine).

II.2. Les lignanes et les lignines

Les monolignols (dérivés de l'acide cinnamique) servent de précurseurs pour les composés de type phénylpropanoïde tels que les lignanes et les lignines.

Les lignanes ont une structure de type (C₆C₃)₂, ils sont constitués de deux unités propylbenzène (C₆C₃).

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et se forment par polymérisation oxydative de trois monolignols qui sont les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique (Sakagami et *al.*, 2005).

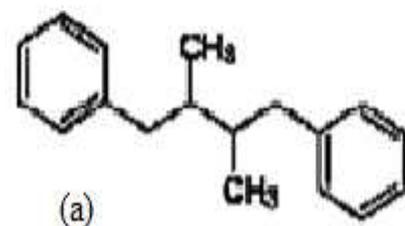
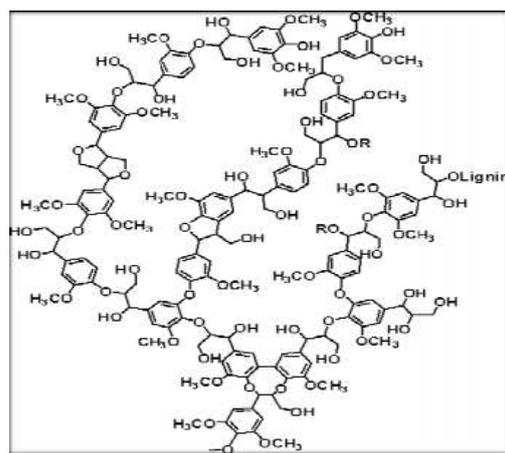
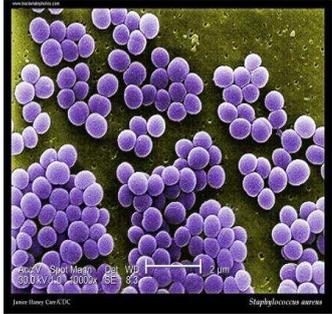
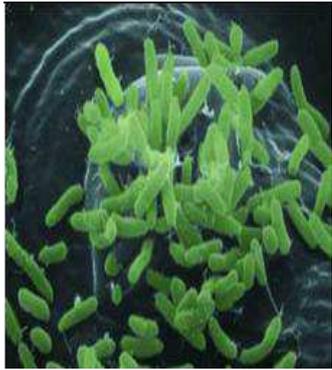
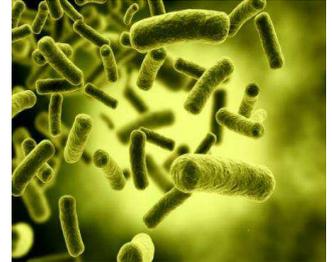
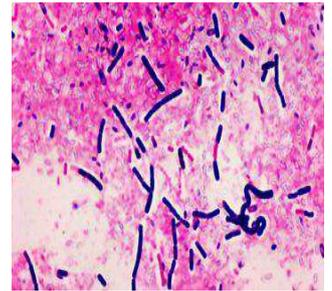


Figure 6 : structure chimique de lignine et lignane (a) (Kebbab, 2014).

Annexe 2

Les souches microbiennes utilisées

Tableau 1: Caractéristiques des différents micro-organismes utilisées.

Souche testé	Gram	Image
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>Cocci immobile, pigmenté à jaune, non sporulé, grouper en amas (grappes de raisin). Cette bactérie est responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang. Elle peut entraîner aussi des abcès, des ostéites, des endocardites, des gastro-entérites et des infections pulmonaires (Perry <i>et al.</i>, 2004; Lowy, 1998).</p>	<p>GRAM positif</p>	
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Bacille mobile à ciliature polaire monotriche, caractérisé par la pigmentation bleu, vert, sporule, opportuniste, fréquemment incriminée dans les infections nosocomiales grâce à sa capacité de persister dans les milieux hospitaliers, <i>P. aeruginosa</i> est impliquée dans les infections des plaies et de l'appareil respiratoire, infections des voies urinaires et les septicémies (Perry <i>et al.</i>, 2004).</p>	<p>GRAM négatif</p>	
<p><i>Escherichia coli</i></p> <p>Bacille, mobile (à ciliature péritriche) appartient à la famille des Enterobacteriaceae, aéro-anaérobie facultatif, largement impliqué dans les infections des voies urinaires, dans la péritonite, septicémies, cholangite et d'autres gastro-entérites (Paterson, 2006).</p>	<p>GRAM négatif</p>	
<p><i>Bacillus thuringiensis</i> (Schnepf <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>Bactérie en forme bâtonnet, aérobie, sporulée, qui forme un cristal protéique parasporal au cours de la phase stationnaire de son cycle de croissance. Cette bactérie est un agent entomopathogène dont l'activité insecticide a été attribuée aux cristaux parasporaux.</p>	<p>Gram positive</p>	

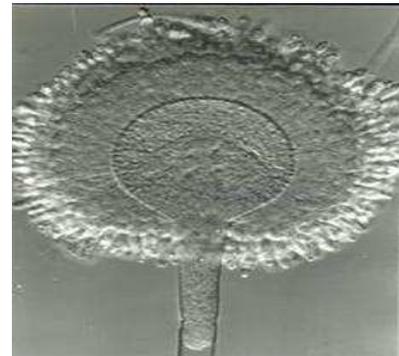
Aspergillus flavus

moisissure de couleur vert jaune à vert olive. C'est l'un des principaux responsable des aspergilloses bronchiques allergiques. Il élabore divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, notamment l'aflatoxine B1 qui est l'un des plus puissants hépatocarcinogènes connus à l'heure actuelle (**Mohammedi, 2013**).



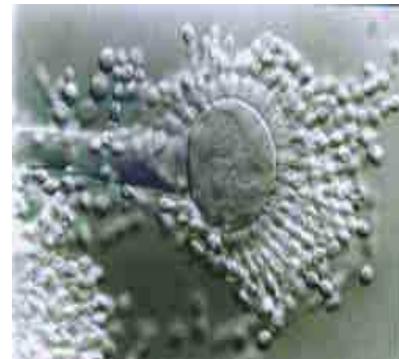
Aspergillus parasiticus

C'est un moisisseur de couleur vert foncé, sphérique de longueur 34,1 µm, A. parasiticus caractérisé par a production d'aflatoxines notamment AFB₁ et AFG₁ qui sont très toxiques et carcinogènes (**Palidain et al., 2008 ; Chang, 2008 ; Dovičičová et al., 2012**).



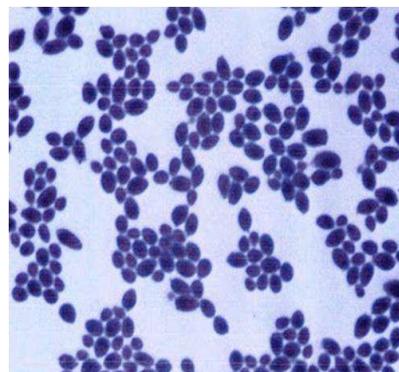
Aspergillus alliaceus

Les souches A. alliaceus produisent des mycéliums plats et pâles qui s'obscurcissent au fur et à mesure que la culture vieillit. Les souches clériales produisent généralement un grand nombre de sclérotés exposés et uniformément sur la surface mycéliale (**Anonyme 8**).



Candida albicans

levure la plus importante et la plus connue. Au laboratoire médical, la culture en boîte de pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème (**Chakou et Bassou, 2005**). Cette levure peut provoquer des infections du vagin, de la bouche ou des poumons.



Annexe 3

Milieu de culture	Composition
PDA	250 g pomme de terre, 20 g glucose, 20 g agar, 1000 ml Eau distillée. Le pH final est ajusté à 5,6
Gélose nutritif	Extrait de viande de bœuf 1 g, extrait de levure 2 g, chlorure de sodium 5 g, agar 15 g, eau distillée 1000 ml, pH=7,2.
Mueller Hinton	Infusion de viande de bœuf 300 ml, hydrolysate de Caséine 17,5 g, amidon 1,5 g, agar 10g, eau distillée 1000 ml, pH= 7,4.
Sabouraud	Peptone pepsique de viande 10 g, glucose 35 g, agar 10 g, eau distillée 1000 ml, pH= 5,7

N.B. : les milieux sont stérilisés par autoclavage durant 20 min à 121°C

Préparation de l'infusé

5g de poudre du matériel végétal sont infusés dans 100 ml d'eau bouillante pendant 10min. L'extrait obtenu après filtration sert à réaliser l'analyse qualitative (**khirdine, 2013**).

Préparation de l'extrait méthanolique

5 g de la poudre de chacune des deux plantes a été mise à macérer dans 50 ml de solution méthanolique à 20% sous agitation magnétique pendant 1h, l'opération a été répétée avec le marc. L'extrait ainsi récupéré pour la caractérisation phytochimique (**Falleh et al., 2008**).

Annexe 4

Matériels utilisés

Tableau: Matériels utilisés.

Appareils	
Rotavapeur	Agitateur magnétique
Lyophilisateur	Balance de précision
Autoclave	PH mètre
Spectrophotomètre	lampe UV 365nm, 254nm
Hydrodistillateur	Plaque chauffante
Broyeur électrique	Incubateur 30 et 37c°
Bain marie	vortex

Résultat de CCM par 1^{ier} système solvant

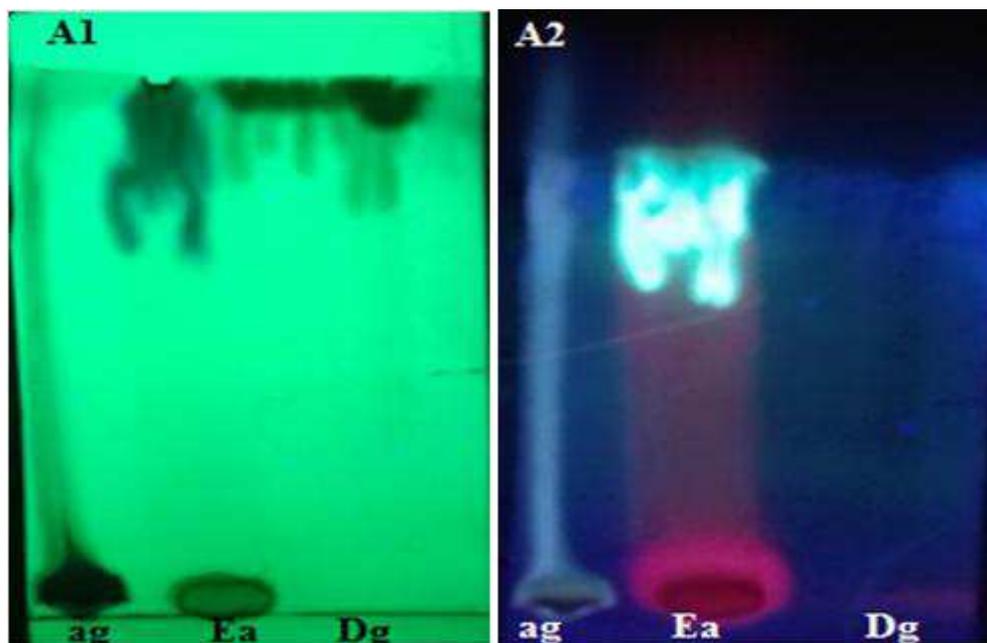


Figure 1: Révélation sous UV des CCM des extraits polyphénolique de *Daphne gnidium*, *Ephedra alata* et le standard acide gallique.

Les Chromatogramme sont développés avec le système solvant 1. **A1** : Chromatogramme photographié sous lampe UV 254nm, **A2** : Chromatogramme photographié sous lampe UV 365nm.

Annexe 5

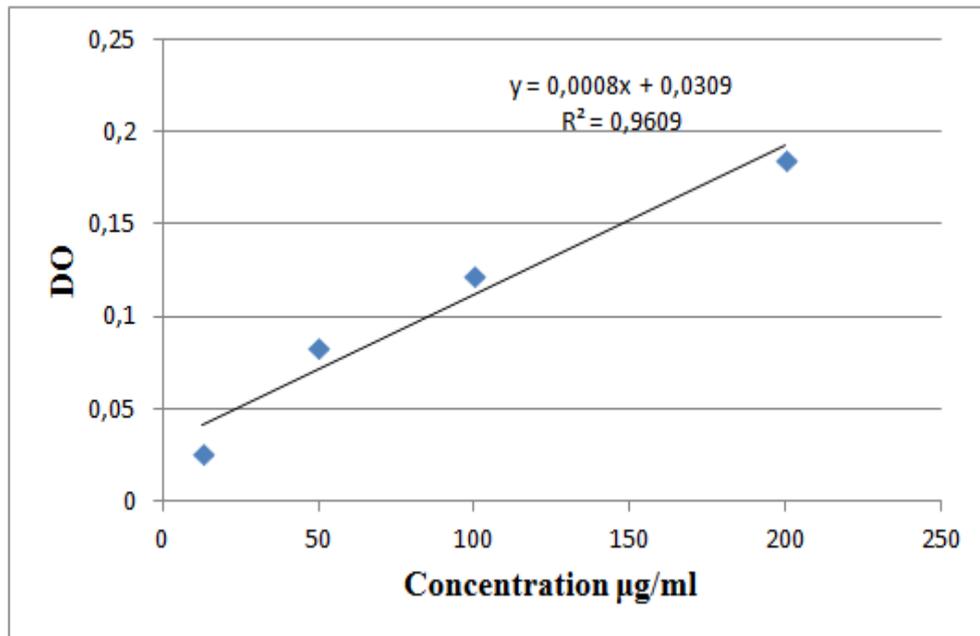


Figure 2: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

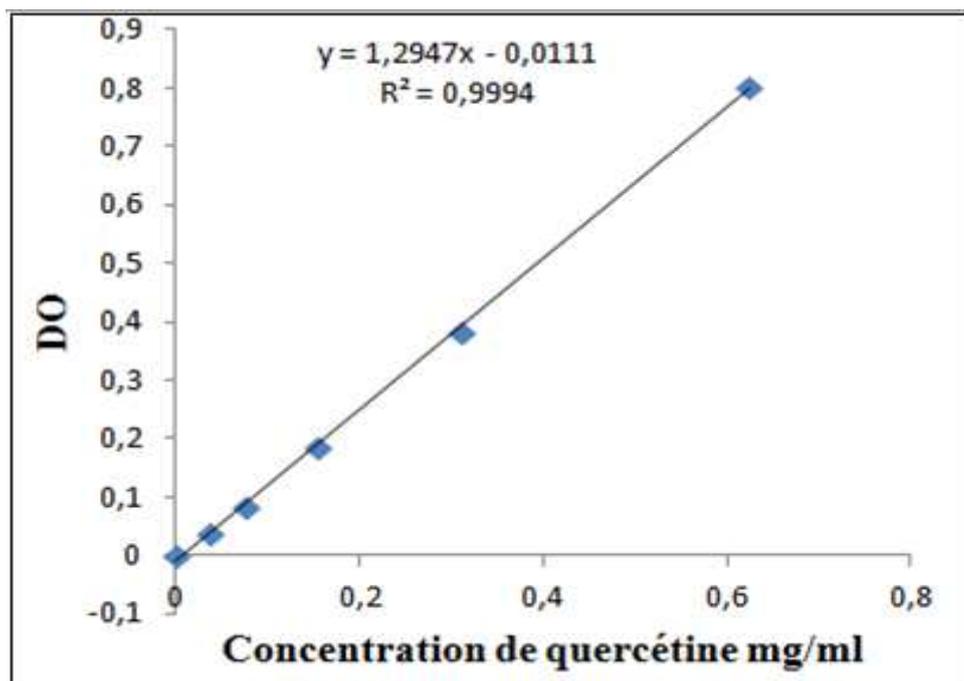


Figure 3: Courbe d'étalonnage de quercétine.

Résumé

Notre travail a eu pour objectifs d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des polyphénols et des alcaloïdes de deux plantes : *Ephedra alata alenda* et *Daphne gnidium L.*, nous avons procédé à une caractérisation des deux substances bioactives par la CCM. Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique des deux plantes est réalisé en utilisant les réactif de Folin-Ciocalteu et $AlCl_3$. Les teneurs les plus importants en polyphénols et en flavonoïdes enregistrés sont celle de l'extrait aqueux d'*E.alata* (175,75 mg EAG/g) et l'extrait méthanolique de *D. gnidium* (4,138 mg EQ/g) respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH \cdot et cette activité a été observée dans tous les extraits étudiés. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, les extraits testés ont un effet sur ces souches sauf l'extrait aqueux de *D. gnidium*, avec une forte activité enregistré des alcaloïdes d'*E.alata* contre *E. coli*. La souche fongique *A. aliaceus* est sensible par contre au *C. albicans* s'est avérée résistante.

Mots clé : *Ephedra alata alenda*, *Daphne gnidium L.*, activité antioxydant, activité antimicrobienne, métabolites secondaire.

Abstract

The aim of our work was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of polyphenols and alkaloids of two plants: *Ephedra alata alenda* and *Daphne gnidium L.*, we carried out a characterization of the two bioactive substances by the TLC. The determination of the total phenols and flavonoids of the aqueous and methanolic extracts of the two plants is carried out using the Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ reagents. The highest levels of polyphenols and flavonoids recorded were the aqueous extract of *E.alata* (175.75 mg EAG / g) and the methanolic extract of *D. gnidium* (4.138 mg EQ / g), respectively. The antioxidant activity was evaluated using the free radical reduction method DPPH \cdot . And this activity was observed in all the extracts studied. The antimicrobial activity was determined on four bacterial strains; the tested extracts have an effect on these strains except the aqueous extract of *D. gnidium*, with a high recorded activity of the alkaloids of *E.alata* against *E. coli*. The fungal strain *A. aliaceus* strain is sensitive as *C. albicans* which was resistant.

Key words: *Ephedra alata alenda*, *Daphne gnidium L.*, antioxidant activity, antimicrobial activity, secondary metabolites.

ملخص

تهدف دراستنا إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات والمضاد للأكسدة للبوليفينول والقلويدات لنبتتين *Ephedra alata* و *Daphne gnidium*. أجرينا تحديدا للمادتين الفعالتين عن طريق كروماتوغرافيا على ورق رقيق. تم تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية الكلية و الفلافونويدات باستخدام المتفاعلين Folin-Ciocalteu و $AlCl_3$. الكميات الأكثر أهمية المسجلة للبوليفينول و الفلافونويدات كانت في المستخلص المائي ل *E.alata* (175مغ معادل حمض الغاليك/غ) والمستخلص الميثانولي ل *Daphne gnidium L* (4,138 مغ معادل الكاتشين/غ) بالترتيب. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة إرجاع الجذر الحر DPPH• ولوحظ هذا النشاط في جميع المستخلصات المدروسة. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على أربع سلالات, كل المستخلصات المجربة لها تأثير على هاته السلالات ماعدا المستخلص المائي ل *Daphne gnidium* مع تسجيل نشاط أكثر فعالية لدى قلويدات *E.alata* ضد *E.coli*. السلالة الفطرية *Aspergillus aliaceus* كانت حساسة على عكس *Candida albicans* التي كانت مقاومة.

الكلمات المفتاحية: *Daphne gnidium L.*, *Ephedra alata alenda*

النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للميكروبات, المركبات التانوية.