

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Centre Universitaire Salhi Ahmed de Naâma



Institut des Sciences et Technologies
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

MÉMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de
Master Académique en Sciences Biologique
Spécialité « Microbiologie appliquée »

Thème

Étude phytochimique et Évaluation de l'activité biologique des extraits de deux plantes (*Ephedra major* et *Ephedra alata*) dans la région de Naâma.

Par : Mme **CHERCHAB Malika**

Soutenu le : 27 Juin 2019.

Soutenu publiquement, devant le jury:

Président :	Mme BEN HAMZA Messaouda	M.C.B
Encadrant:	Mr. GHERIB Mohamed	M.C.A
Examineurs:	Mr. SEDDIKI Sidi Med Lahbib	M.C.A
	Mme BOUALI Waffa	M.C.B

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

En tout premier lieu, j'exprime mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné la santé, le courage et la patience pour finir ce travail.

je tiens à remercier sincèrement mon encadreur Monsieur le Dr GHERIB Mohammed à l'université Naâma, tant d'avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir accordé sa confiance, ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré dans mon travail, et aussi pour m'avoir guidé et conseillé dans ce travail. Et je veux remercier Mr BOUAFIA Miloud de m'avoir aidé dans le laboratoire et à m'avoir encouragé à terminer ce travail malgré les difficultés et les obstacles

Mes remerciements vont également à Mme BENHAMZA Maître conférences Classe B à l'université Naâma. De m'avoir honorée de présider le jury de ma soutenance.

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Dr SIDDIKI Sidi Mohamed Lahbib et à Mme BOUALI Waffa à l'université Naama, d'avoir acceptés d'examiner ce modeste travail.

Nous exprimons aussi nos remerciements et notre gratitude à tout le personnel des laboratoires : Sabah, Otmane, Fatima, Yakoot et Abdelghani pour leurs encouragements et leurs aides précieuses durant toute la période de notre travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à celui qui avait foi en moi et m'a aidé, qui m'a donné l'amour de la science et du travail, et dans lequel il est devenu le titre de mon succès, qui m'a fait preuve de patience et qui s'est efforcé de relever la tête avec fierté.

Mon mari.

Je dédie cet exploit à ma mère bien-aimée et à mon cher père, un accomplissement minime pour eux, mon soutien moral à moi-même, mes enfants et ma patience pour la fin de ce difficile voyage, que je voudrais dédier à mes frères, sœurs et amis qui les ont encouragés.

J'ai terminé cette étape de ma vie et m'a donné les personnes dont je suis fier et que je suis fier de connaître. C'est la chose la plus merveilleuse que j'ai vue dans mes études Mr AMROUCH et Mr Boughers, ainsi que toute la promotion "microbiologie appliquée". Je t'aime du fond de mon cœur.

Merci à tous

Résumé

Les plantes à usage médicinal sont considérées comme principale source de soins, de santé pour la majorité de la population mondiale. Dans le but de valoriser les plantes médicinales de l'Algérie, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'activité biologique d'*E. alata* et d'*E major* de la région de Naâma (Sud-ouest algérien). Les deux espèces dotées d'une grande importance pharmacologique dans le monde et réputées par sa résistance à la sécheresse.

L'étude phytochimique a montré la présence des métabolites secondaires dans toutes les parties de nos plantes tels que les polyphénols et les flavonoïdes. Le dosage de ces métabolites dans les extraits bruts est réalisé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et AlCl₃. Les teneurs les plus importantes en polyphénols et en flavonoïdes enregistrés sont celle les extraits des racines d'*E. major* (220.43 mg EAG/g) et l'extrait (des tiges et des feuilles) d'*E.alata* (27.3 et 27 mg EC/g) respectivement. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction du radical libre DPPH. Cette activité a été moins faible dans tous les extraits étudiés. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes, les extraits testés ont un effet sur ces souches, sauf l'*Acinetobacter* qui manifeste une résistance pour les différentes concentrations des différents extraits les deux plantes. Les souches fongiques de *C. albicans* et *Fusarium oxysporum* sont sensibles aux extraits mais *Penicillium. sp* a une résistance complète.

Mots clé : *Ephedra alata*, *Ephedra major*, activité antioxydante, activité antimicrobienne, métabolites secondaire.

ملخص:

تعتبر النباتات الطبية المصدر الرئيسي للرعاية الصحية لغالبية سكان العالم ومن أجل النهوض بالنباتات الطبية في الجزائر ، اهتمنا بالبحث عن المركبات الكيميائية النباتية و تقييم الأنشطة البيولوجية لمستخلصات مختلفة لنبتتين طبييتين هما *E. alata* و *E. major* المتواجدين بمنطقة النعامة -جنوب غرب الجزائر- ، واللذان تكتسيان أهمية دوائية كبيرة في معالجة مرض السرطان وتشتهران بمقاومتهما للجفاف.

أظهرت الدراسة الكيميائية النباتية وجود الفينولات الكلية، الفلافونويدات في الجزئين الهوائي و الترابي، وقد تم تقييم كميتهما في المستخلصات النباتية باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu و $AlCl_3$. أعلى مستويات البوليفينولات المسجلة هي تلك المستخرجة من جذور *E. major* (220.43 ملغم EAG / جم)، أما الفلافونويدات فأعلى نسبة سجلت في (من السيقان والأوراق) (27.3 و 27 ملغ / EC من *E. alata* .. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام طريقة محاصرة الجذر DPPH وكان هذا النشاط أقل في جميع المقتطفات التي تمت دراستها. تم تحديد نشاط مضادات الميكروبات على خمس سلالات بكتيرية ، المستخلصات التي تم اختبارها لها تأثير على هذه السلالات ما عدا سلالة *Acinetobacter* والتي تظهر مقاومة للتركيزات المختلفة للمستخلصين لكلا النبتتين . السلالات الفطرية *Fusarium oxysporum* *C. albicans* حساسة لجميع مستخلصات النبتتين ، ماعدا *Penicillium.sp* التي لديها مقاومة فعالة .

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، المركبات الثانوية *Ephedra alata*, *Ephedra* .

major .

Abstract

Medicinal plants are considered the main source of health care for the majority of the world's population. In order to promote the medicinal plants of Algeria, we are interested in the phytochemical study and the biological activities of different extracts of two wild medicinal plants used in the Naâma region (South-West Algeria), having a great pharmacological importance in the world and reputed by its resistance to drought..

The phytochemical study showed the presence of secondary metabolites in both parts of plants. the quantification of total phenolics and flavonoids of the extracts is carried out using the Folin-Ciocalteu reagent and AlCl₃. The highest levels of polyphenols and flavonoids recorded are those extracted from the root of *E. major* (220.43 mg EAG / g) and the extract (from the stems and leaves) of *E.alata* (27.3 and 27 mg EC / g) respectively. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH free radical reduction method. and this activity was less weak in all the extracts studied. The antimicrobial activity was determined on five bacterial strains; the extracts tested have an effect on these strains except the *Acinetobacter* strain which shows resistance for the different concentrations of our extracts. The fungal strains of *C. albicans* and *Fu Oxysporu* are sensitive to all extracts except *Penicillium.sp* has resistance to the extract.

Key words: *Ephedra alata alenda*, *Ephedra major*, antioxidant activity, antimicrobial activity, secondary metabolits.

Table des matières

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction.

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre I : Les métabolites secondaires

I. Les plantes médicinales et phytothérapie.....	5
I.1. Les plantes médicinales.....	5
I.2. La phytothérapie.....	5
I.3. Métabolites secondaires.....	6
I.4. Classification des métabolites secondaires.....	6
I.4.1. Les composés phénoliques (polyphénols).....	6
I.4.1.1. Classification des composés phénoliques.....	7
I.4.2. Les acides phénoliques.....	8
I.4.3. Les flavonoïdes.....	8
I.4.3.1. Définition et structure chimique des flavonoïdes.....	8
I.4.3.2. Classification des flavonoïdes.....	8
I.4.3.3. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes.....	9
I.4.4. Les tanins.....	10
I.4.5. Les coumarines.....	10
I.4.6. Lignanes.....	10
I.4.7. Les alcaloïdes.....	10
I.4.8. Les terpenoïdes et stéroïdes.....	10

Chapitre II : présentations des plantes étudiées.

II.1. Généralités sur la famille des <i>Ephedraceae</i>	11
II.2. Répartition géographique.....	11

II.3. Classification systématique de deux plantes.....	12
II.3.1. <i>Ephedra alata</i>	12
II.3.1.1. Présentation et description botanique.....	13
II.3.2. <i>Ephedra major</i>	13
II.3.2.1. Présentation et description botanique.....	14
II.4. Utilisation en médecine traditionnelle d' <i>Ephedra</i>	15
II.5. Toxicologie d' <i>Ephedra</i>	15
II.6. Composition chimique d' <i>Ephedra</i>	15

Chapitre III : L activité biologique

III.1. Activité antioxydante.....	16
III.1.1. Les Radicaux libres.....	16
III.1.2. Le stress oxydant.....	16
III.2. Activité antimicrobienne.....	17
III.2.1. Activité antibactérienne.....	17
III.2.1.1. Antibiotiques.....	18
III.2.1.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	18
III.2.1.2.1. Aromatogramme.....	18
III.2.1.2.2. Méthode de diffusion en puits.....	19
III.2.2. Activité antifongique.....	19

Deuxième partie : Étude expérimentale

Matériels et méthodes

1. Choix des plantes.....	23
2. Situation géographique des stations d'études.....	23
3. La récolte du matériel végétal.....	25
4. Identification botanique.....	25
5. Extraction des composés phénoliques.....	25
5.1. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques).....	25
5.2. Calcul des rendements en extraits secs.....	25
5.3. Préparation des extraits d'acétate d'éthyle (AE) et de n-butanol (n-B).....	27
6. Dosage des polyphénols.....	29
7. Dosage des flavonoïdes.....	30
8. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
9. Activité biologique.....	33
9.1. Activité antioxydante.....	33
9.1.1. Évaluation de l'activité anti-radicalaire (Piégeage du radical libre DPPH).....	33
9.2. Activité antimicrobienne.....	35
9.2.1. Activité antibactérienne.....	35
9.2.1.1. Les souches bactériennes utilisées.....	35
9.2.1.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode des puits.....	38
9.2.2. Activité antifongique.....	39
9.2.2.1. Champignons utilisées.....	39

Troisième partie : Résultats et discussions

1. Rendements des extraits <i>E. major</i> et <i>E. alata</i>	40
---	----

2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	41
3. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes.....	45
3.1. Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des extraits l' <i>Ephedra major</i>	45
3.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits bruts d' <i>E. alata</i>	46
4. Activité biologique	47
4.1. Activité antioxydante.....	47
4.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	52
4.2.1. Etude de la sensibilité des souches bactériennes et fongiques aux antibiotiques.....	52
4.2.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d' <i>E. major</i>	55
4.2.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d' <i>E. alata</i>	59
Conclusion générale	63
Références bibliographiques	67
Annexe	

Liste des figures

Figure 1:	Structure chimique des flavonoïdes.	8
Figure 2 :	Répartition géographique de l' <i>Ephedra</i> dans le monde	11
Figure 3 :	<i>Ephedra alata alenda</i> (Stapf) Trap.	12

Figure 4 :	<i>Ephedra major</i> Host.	13
Figure 5 :	Déséquilibre de la balance des espèces prooxydants et des systèmes de défense antioxydants	17
Figure 6 :	La méthode des aromatoigrammes sur boîte de pétrie	20
Figure 7 :	Carte géographique d <i>E. alata</i>	24
Figure 8 :	Carte géographique d <i>E. major</i>	24
Figure 9	Préparation des extraits méthanoliques	26
Figure 10 :	Préparation des extraits d'acétate d'éthyle (AE) et de n-butanol (n-B)	27
Figure 11 :	Extraction des flavonoïdes	28
Figure 12	Méthode de dosage des polyphénols	29
Figure 13 :	Méthode de dosage des flavonoïdes	30
Figure 14	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydante	33
Figure 15	Evaluation de l'activité antimicrobienne Méthode des puits	37
Figure 16 :	Rendements des extraits méthanoliques d' <i>E. major</i> et <i>E. alata</i>	40
Figure 17 :	Chromatogramme des extraits bruts (MeOH) d' <i>E. major</i> et d' <i>E. alata</i>	43
Figure 18 :	Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits bruts d' <i>E. major</i> ...	45
Figure 19 :	Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits bruts d' <i>E. alata</i>	46
Figure 20 :	Pouvoir antioxydante de la fraction méthanolique des deux plantes	48
Figure 21 :	Pouvoir antioxydante de la fraction acétate des deux plantes	49
Figure 22 :	Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des deux plantes	50
Figure 23 :	Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.	51
Figure 24 :	L'Activité antibiotique vis-à-vis des cultures microbiennes et exprimé en mm	53
Figure 25 :	Antibiogramme des antibiotiques vis-à-vis des cultures microbiennes	54
Figure 26 :	Activité de Nystatine sur les souches fongiques	55
Figure 27 :	Effets des extraits d' <i>E. major</i> sur les souches bactériennes et les souches fongiques	57
Figure 28 :	Effets des extraits d' <i>E. alata</i> sur les souches bactériennes et les souches fongiques	60

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les principales classes des composés phénoliques	7
Tableau 2 :	Principales classes des flavonoïdes.	9
Tableau 3 :	la position systématique d' <i>Ephedra aalata-alenda</i>	12

Tableau 4 :	la position systématique d <i>Ephedra major</i>	14
Tableau 5 :	Les coordonnées du système mondial de positionnement (GPS) des deux plantes.	23
Tableau 6 :	Les différentes souches bactériennes et fongiques et leurs références	35
Tableau 7 :	La séparation des composés phénoliques par CCM d' <i>E. major</i>	41
Tableau 8 :	La séparation des composés phénoliques par CCM d' <i>E. alata</i>	42
Tableau 9:	Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes	44
Tableau 10:	les teneurs des composés phénoliques totaux (TPC) et les teneurs en flavonoïdes (TFC) chez les espèces d' <i>Ephedra</i>	47
Tableau 11	Puissance anti radicalaire des extraits et de l'acide ascorbique	51
Tableau 12	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits d <i>E. major</i> vis-à-vis des souches bactériennes.	56
Tableau 13:	L'activité antifongique des extraits d' <i>E. major</i> vis-à-vis des souches fongiques	56
Tableau 14 :	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits d <i>E. alata</i> vis-à-vis des souches bactériennes.	59
Tableau15 :	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits d <i>E. alata</i> vis-à-vis des souches fongiques.	59

Liste des abréviations

Abs: absorbance.

AcOEt: acétate d'éthyle.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CPT: Composés phénoliques totaux (Total Phenolic Contents)

DMSO: diméthylsulfoxyde

E. coli: *Escherichia coli*

MeOH: méthanol.

n-ButOH: n-butanol.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

UFC: Unités formant colonies (Colonyformingunits).

E. major : *Ephedra major*

E. alata : *Ephedra alata*

UV : ultra –Violet

B. cereus : *Bacillus cereus*

Acinetobacter. b : *Acinetobacter baumannii*

F. oxysporum : *Fusarium oxysporum*

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

GAE : équivalent d'acide gallique

BAW : Butanol, Acide acétique et Eau

Rf : Les rapports frontaux

DPPH : 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl

EC : équivalent de Catéchine

PDA : milieu de culture des champignons

BMH : Bouillon Mueller Hinton.

Introduction Générale

Les plantes soignent, parfois très rapidement, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux, les rhumatismes, mais aussi de très nombreuses maladies chroniques parmi lesquelles on cite le diabète, la leishmaniose (**Ameenah, 2006**). Aujourd'hui, selon l'Organisation mondiale de la Santé (**OMS**), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle (**Muthu et al, 2006**).

Au début des années 1970, les médecins ont finalement été contraints d'abandonner leur croyance que les infections bactériennes étaient pratiquement toutes traitables. Leur optimisme a été ébranlé par l'émergence de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium tuberculosis* (**Lowy, 2003**). En plus de ce problème, les antibiotiques sont parfois associés à des effets indésirables sur l'hôte telle que l'hypersensibilité allergique. Par conséquent, il existe un besoin de développer des médicaments antimicrobiens alternatifs pour le traitement des maladies infectieuses à partir des plantes médicinales qui semblent moins agressifs (**Arshad et al, 2010**).

D'autre part, Les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention des maladies, et parce que certains antioxydants synthétiques ont montré un risque potentiel pour la santé, notamment un effet cancérigène possible, il y'a lieu de trouver de nouvelles sources d'antioxydants peu dangereuses et peu coûteuses naturelles pour les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques et remplacer ainsi les antioxydants synthétiques (**Safer et Al-Nughamish, 1999**). Les membres de la famille des Ephedraceae, représentés par un seul genre «*Ephedra*», sont connus pour leurs nombreux usages en médecine traditionnelle dans le monde. La présente étude vise à contribuer à la valorisation de deux sous-espèces, *Ephedra major* et *Ephedra alata* qui poussent dans la région de NAAMA, et qui sont réputées par sa tolérance élevée à la carence en eau. Néanmoins. Et tout en sachant que le milieu désertique peut être un facteur favorable pour la production des métabolites secondaires dotés de nombreuses activités biologiques (**Timmermann et al, 1994**),

ainsi l'objectif de notre travail vise à étudier analyse phytochimique et l'activité biologique des extraits de deux plantes de la région de NAAMA, reconnues pour leurs vertus médicinales : *Ephedra major* Host et *Ephedra alata subsp. alenda* (Stapf) Trab.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique .Nous avons entamé cette partie par une enquête ethnobotanique, en vue d'évaluer l'intérêt et l'usage de ces plantes chez la population sur les aspects botaniques et phytochimiques de deux plantes. Des généralités, sur l'activité biologique (antioxydante, antibactériennes et antifongiques), ainsi que sur les composés phénoliques, les flavonoïdes et notamment chromatographie sur couche mince.

Elle contient trois chapitres :

- ✓ Chapitre 1 : Métabolites secondaires.
 - ✓ Chapitre 2 : Étude botanique.
 - ✓ Chapitre 3 : Activité biologique.
-
- La deuxième partie : étude expérimentale illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail : Des tests phytochimiques préliminaires sont ensuite effectués sur les parties (racines, tiges et les feuilles) des deux plantes, justifiant notre choix porté sur les composés phénoliques de ces plantes, en vue de leurs extractions et de leurs analyses. Et enfin l'application des extraits de *Ephedra alata* et les extraits de *Ephedra major* sont testés pour leurs activité antioxydante, antibactériennes et antifongiques.
 - La troisième partie : est consacrée à la présentation, la discussion et l'interprétation des résultats obtenus.

Enfin, notre manuscrit est ponctué d'une conclusion générale et de perspectives envisageables.

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les Métabolites secondaires

I. Les plantes médicinales et phytothérapie

I.1. Les plantes médicinales :

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Abayomi, 2010**). Elles sont utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs. Certaines plantes médicinales qui sont souvent également des aromatiques sont très faciles à cultiver, puis elles sont récoltées, séchées pour être finalement consommées sous forme de préparation diverses.

Les scientifiques affirmeront enfin qu'elle a des principes actifs et que ce sont ces principes actifs, composants importants de la plante, qui lui confèrent son caractère médicinal. (**Fuinel, 2002**).

I.2. La phytothérapie :

La phytothérapie utilise les plantes médicinales pour guérir ou prévenir les maladies ; c'est une thérapeutique utilisée par les peuples du monde entier depuis l'origine de l'humanité. (**Chemouny, 2012**).

I.3. Métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (**Boudjouref, 2011**). Sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (**Newman et Cragg, 2012**). Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard, 1996**).

Ces métabolites jouent un rôle très important dans plusieurs fonctions biologiques. Ils sont connus non seulement en raison de leur rôle protecteur contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (UV) ou d'autres facteurs abiotiques, mais également en tant que défenseurs contre les herbivores et les microorganismes pathogènes. De plus, ils sont reconnus pour aider au processus de pollinisation et comme de signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement (**Graglia et al, 2001**).

I.4. Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires peuvent être divisés principalement en 03 grandes familles : Les terpènes, les composés phénoliques (polyphénols) et les substances azotées (alcaloïdes) (**Marouf et Reynaud, 2007**).

I.4.1. Les composés phénoliques (polyphénols) :

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 2009**).

I.4.1.1. Classification des composés phénoliques:

Tableau.1 : Les principales classes des composés phénoliques (Cheynier, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénol simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique, acide férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre Pomme Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C3	Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanones Isoflavonol	Kamphérol, quercétine cynidrine, prélargonidine, Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes fleurs, fruits rouge citrus Soja
(C6-C3) ₂	Lignanes		Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15) _n	Tanins		Raising rouge, KaKi

I.4.2. Les acides phénoliques :

Le terme d'acide- phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique (**Bruneton, 1999**).

I.4.3. Les flavonoïdes :

I.4.3.1. Définition et structure chimique des flavonoïdes:

Le terme «flavonoïdes» désigne une large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phenylchromane (**Figure. 1**) (**Bruneton, 1999**).

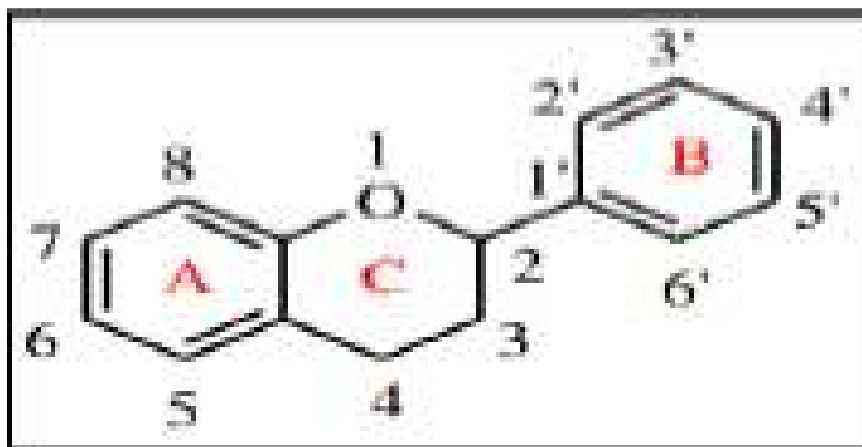
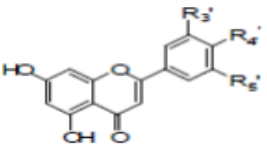
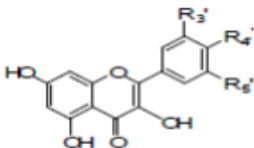
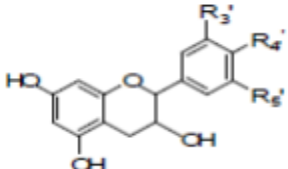
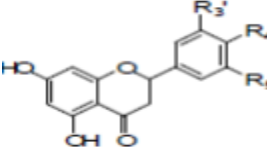
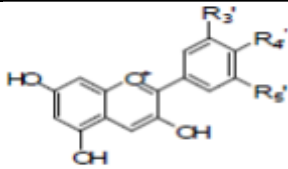
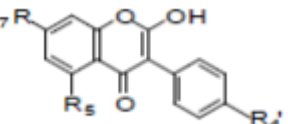


Figure 1 : Structure chimique des flavonoïdes.

I.4.3.2. Classification des flavonoïdes:

La classification des flavonoïdes peut être divisée en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié. (**Krishna et al, 2001**).

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

Calasses	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemple
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavonols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cynidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

1.4.3.3. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes :

- Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales ; (Subramanian et al, 2007).
- La réduction du risque des maladies cardiovasculaires en entravant l'athérosclérose.
- On attribue aux flavonoïdes d'autres propriétés: anti tumorale, anticancéreux, antidiabétique, analgésique, antispasmodique, hépato-protectrice, etc. (Tringali, 2001).

I.4.4. Les tanins :

Les tanins sont des composé polyphénoliques,de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 .(Gazengel et al,2013). Les tanins se rencontrent dans les feuilles, les tissus vasculaires, l'enveloppe des graines, les fruits non mûrs,etc. (**Marouf et Joel,2007**).

I.4.5. Les coumarines :

Le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom, dans une langue amazonienne, de l'arbre de tonka dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. (**Bruneton ,2009**).

Les coumarines est également le point de départ d'une famille de composés, qui se forment par une substitution sur un cycle aromatique, analogue à celle des dérivés de l'acide cinnamique. (**Gerhard, 1993**).

I.4.6. lignanes :

Classe importante de métabolites largement représentés dans le règne végétal, les lignanes sont des dimères d'unités phényl-propane (C6-C3) associées par le carbone central de leur chaîne aliphatique latérale (carbone β). (**Marouf et Reynaud, 2007**).

I.4.7. Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe. (**Badiaga, 2011**). Sont les principaux métabolites secondaires azotés, on en connaît environ 12000, synthétisés à partir des acides aminés, ils sont constitués d'un hétérocycle et présentent des propriétés hydrophiles et alcalines. (**Sylvie et al, 2008**).

I.4.8. Les terpénoïdes et stéroïdes :

Les terpènes sont des composé naturels résultant de la polycondensation d'unités isopréniques en C5 (2-méthylbutyle).Les isoprénoïdes sont des métabolites universels trouvés dans tous les organismes vivants. (**Santelli, 2012**).

Chapitre II : présentations des plantes étudiées.

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'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Limberger et al, 2013; Evans, 2009 ; Hegazi et El-Lamey, 2011).

II.2. Répartition géographique :

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

En Algérie, *Ephedra* 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). La figure 2 montre la répartition du genre *Ephedra* dans le monde.

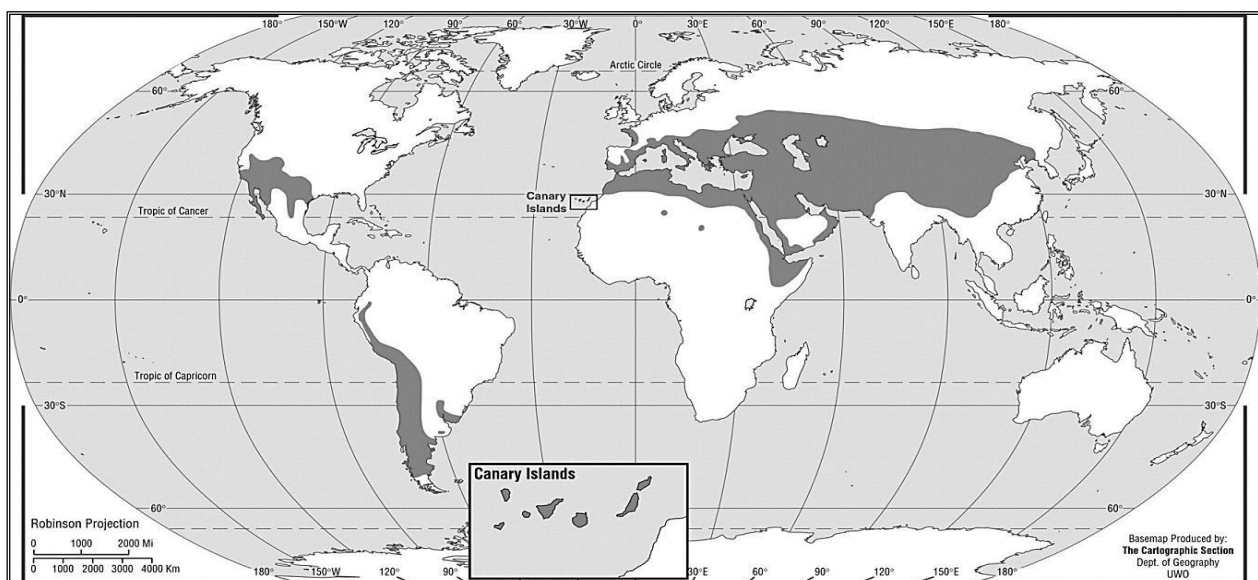


Figure 2: Répartition géographique de l'*Ephedra* dans le monde (Caveney et al, 2001).

II.3. Classification systématique de deux plantes

II.3.1. *Ephedra alata* :

Nomenclature d'*Ephedra alata* : Alenda est le nom populaire en Algérie, en Français *Ephédre* et *Ephedra* en anglais.



Figure 3 : *Ephedra alata alenda* (Stapf) Trap ((Moghrare "Février 2019").

Tableau 3 : la position systématique d'*Ephedra aalata-alenda* (Ozenda, 1991).

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

II.3.1.1.Présentation et description botanique :

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**).

II.3.2. *Ephedra major* :

Cette espèce a été décrite pour la première fois en 1831 par le botaniste autrichien Nicolaus Thomas Host. Ainsi *Ephedra major* admet le synonyme *Ephedra nebrodensis* selon (**Tela Botanica, 2011**).



Figure 4: *Ephedra major* Host (Djebel Antar "Février 2019").

Tableau 4 : la position systématique d'*Ephedra major* (**Ozenda, 1991**).

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

II.3.2.1. Présentation et description botanique :

Selon Tela botanica, 2011 :

- ✓ Sous-arbrisseau de 20-60 cm, dressé, à rameaux grêles, filiformes, densément fascicules ou verticillés dans le haut, d'un vert sombre.
- ✓ articles longs de 1 à 2 cm, à gaines très courtes (1 à 12 mm), évasées au sommet style court, droit, peu saillant.
- ✓ fruit mûr rouge, ovoïde ou subglobuleux, à 1 graine.
- ✓ Écologie : Roches calcaires et vieux murs, dans les basses montagnes du Midi : Alpes méridionales, Causses des Cévennes, Corbières, Pyrénées.
- ✓ Répartition: Région méditerranéenne.
- ✓ Floraison Mai fructification août.

II.4.Utilisation en médecine traditionnelle d'*Ephedra* :

En Algérie, *Ephedra* est utilisée contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de goutte nasales contre les rhumes.

Au Maroc ; elle est utilisée pour lutte contre le diabète. Ainsi, les tiges broyées d'*Ephedra* 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 Egypte, *Ephedra* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, 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 *guarana* favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids.

II.5. Toxicologie d'*Ephedra* :

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. L'utilisation de l'*Ephedra* est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques (**Peters et al, 2005**). Ces effets peuvent être les raisons pour lesquelles l'utilisation de l'*Ephedra* est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiquée pour une utilisation à long terme (**Chen et al, 2010**).

II.6. Composition chimique d'*Ephedra* :

Le genre *Ephedra* est une source naturelle de nombreux phyto-constituants incluant des alcaloïdes, des tanins, des anthocyanes, des flavonoïdes, des cardinolides, des terpènes et stérols, aussi les huiles essentielles (**Hegazi et El-Lamey, 2011**).

Chapitre III : Activité biologique

III.1. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante des composées phytochimiques attire l'attention de plusieurs chercheurs de fait de leur rôle importance notamment dans la prévention de certaines maladies et la conservation des aliments (Tlili, 2015).

III.1.1. les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes, ou des molécules, dont une orbitale, contient un ou plusieurs électrons non appariés, extrêmement instables, et s'accouplent de force avec le premier électron compatible rencontré, soit en arrachant un électron (se comportant comme un oxydant), soit céder l'électron (agissant alors comme un réducteur) (Goto et al, 2008).

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme des radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé le stress oxydant (Favier, 2003).

III.1.2. Le stress oxydant :

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. (Andreyev, 2005). Le stress oxydant est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs pathologies. En effet, il est par exemple lié au développement des maladies coronariennes, des accidents vasculaires cérébraux, du cancer, de la maladie d'Alzheimer, d'athérosclérose et le diabète. Il est caractérisé par une augmentation du nombre des radicaux libres et une réduction des défenses antioxydants (Figure 5) (King, 2003).

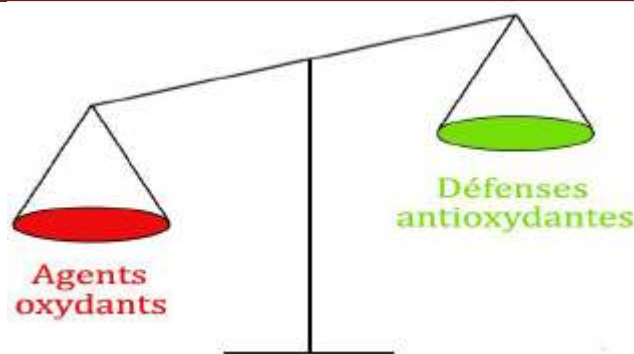


Figure 5 : Déséquilibre de la balance des espèces prooxydants et des systèmes de défense antioxydants (**Andreyev, 2005**).

Le stress oxydant peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments (**Favier, 2003**).

De même, il peut être à l'origine d'une exposition environnementale à des facteurs prooxydants tels que le tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets (UV), pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques, une mauvaise alimentation, la pollution, etc. (**Magder, 2006**).

III.2. Activité antimicrobienne

III.2.1. Activité antibactérienne :

Les antimicrobiens d'origine végétale ont un énorme potentiel thérapeutique. Ils sont efficaces dans le traitement des maladies infectieuses, tout en atténuant ou en évitant un grand nombre d'effets secondaires qui sont souvent associés aux agents synthétiques (**Arshad et al, 2010**).

Pour cela, nous avons voulu étudier le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits des plantes vis-à-vis de certaines bactéries et moisissures.

III.2.1.1. Antibiotiques :

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle, semi-synthétique ou synthétique, capable à faible dose de tuer ou d'inhiber spécifiquement la croissance du germe par un mécanisme particulier jouant sur ses mécanismes vitaux (**Okusa Ndjolo, 2012**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Benabbou, 2012**).

III.2.1.2.. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :

Différents protocoles peuvent être utilisés parmi eux on site :

III.2.1.2.1. 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. (Pibiri, 2006 ; Manuel terrestre de l'OIE, 2008).

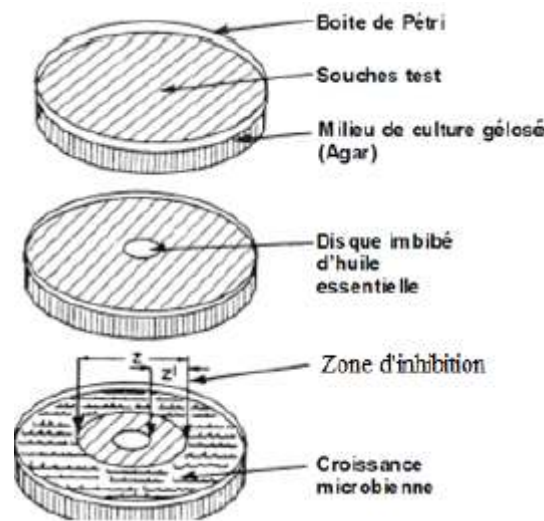


Figure 6: Méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

III.2.1.2.2. Méthode de diffusion en puits :

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

III.2.2. Activité antifongique :

Les antifongiques (ou antifungiques) tirent leur nom du latin fungus qui signifie champignons. Ce sont donc des médicaments capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

Deuxième partie
Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Choix des plantes :

Le choix des plantes est basé sur une enquête ethno-pharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle.

2. Situation géographique des stations d'étude:

La récolte des deux espèces a été effectuée dans le Nord et le Sud de la Willaya de NAAMA, dans deux stations, à savoir : Djebel Antar (Mécheria) et Moghrar.

Les coordonnées du système mondial de positionnement (GPS) des deux plantes sont représentés dans le tableau 05 suivant :

Tableau 5 : Les coordonnées du système mondial de positionnement (GPS) des deux plantes.

Plantes	Stations	Période de la récolte	Partie étudiée	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Etage bioclimatique
<i>Ephedra alata</i>	Moghrar	8 Février 2019	Plante entier	0° 29'	32° 30'	Climat désertique
<i>Ephedra major</i>	Djebel Antar	8 Février 2019	Plante entier	0° 16'	33° 32'	Semi-aride



Figure 07 : Carte géographique d' *E. alata*.



Figure 08 : Carte géographique d' *E. major*

3. La récolte du matériel végétal :

Le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Le séchage est de 7 jours en moyenne, les différentes parties des plantes ont été broyées séparément et stockées soigneusement dans un endroit sec jusqu'au jour de l'extraction.

4. Identification botanique :

Dans ce contexte, nous nous proposons de valoriser deux espèces végétales *Ephedra alata* subsp. *alenda* (Stapf) Trab et *Ephedra major* Host. Les deux espèces ont été identifiées par Monsieur le Professeur **Abderrazak Marouf** (Laboratoire: Gestion Durable Des Ressources Naturelles Des Zones Arides Et Semi-Arides) au département de Biologie, Institut de SNV (Centre universitaire de Naama) ainsi que Monsieur **Ben Aissa**, inspecteurs subdivisionnaires des forêts de Naama.

5. Extraction des composés phénoliques :

5.1. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques) :

02 g de la matière végétale sèche est mise en décoction dans un mélange hydro alcoolique (méthanol/eau ; v/v; 70/30), sous reflux pendant 2 heures à températures (100°C). Après filtration, les solutions hydrométhanolique sont concentrées à sec sous pression réduite à une température modérée (60°C) dans un évaporateur rotatif, les résidus secs sont pesés et repris, soit dans le méthanol pour des dosages des phénols totaux, les flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antioxydante (**Benhamou et al, 2008**), soit dans le DMSO pour déterminer l'activité antibactérienne et antifongique.

5.2. Calcul des rendements en extraits secs:

Nous pouvons déterminer le rendement des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100$$

Rdt : rendement de l'extrait sec en pourcentages.

m_1 : masse du ballon après évaporation.

m_2 : masse du ballon avant évaporation.

m_3 : masse de la matière végétale de départ.

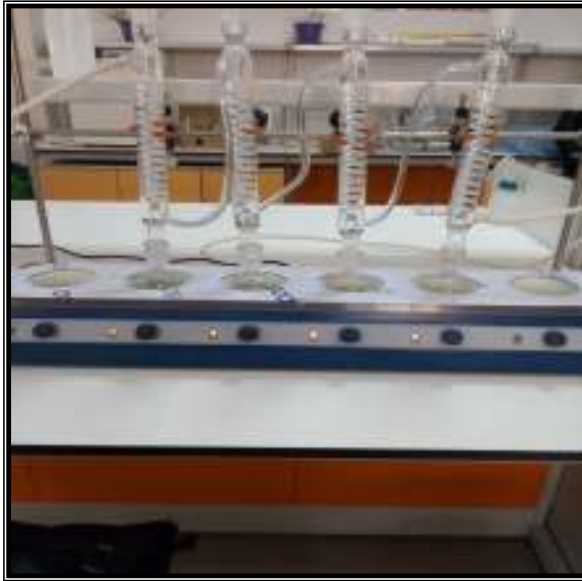


Figure 9: préparation des extraits méthanolique MeOH).

5.3. Préparation des extraits d'acétate d'éthyle (AcOEt) et de n-butanol (n-B):

Le même protocole évoqué au paravent est appliqué pour la préparation des extraits fractionnés sauf que les résidus secs sont repris dans l'eau tiède. La phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par l'acétate d'éthyle (AE) et le n-butanol (n-B) suivant la méthode d'extraction d'après **Bekkara *et al*, (1998)** (Figure. 10 et 11).

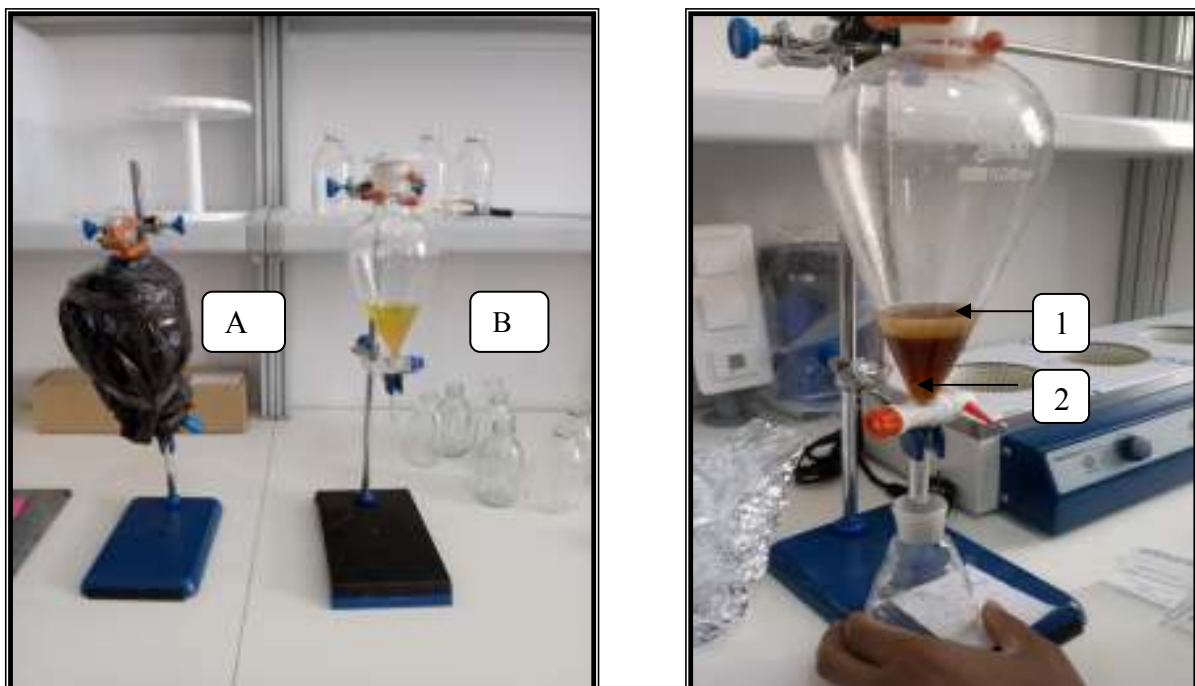


Figure 10 : préparation des extraits d'acétate d'éthyle (AE) et de n-butanol (n-B).

A : Décantation à l'obscurité (24h).

B : Décantation après (24h)

1 : Phase aqueuse.

2 : Phase organique.

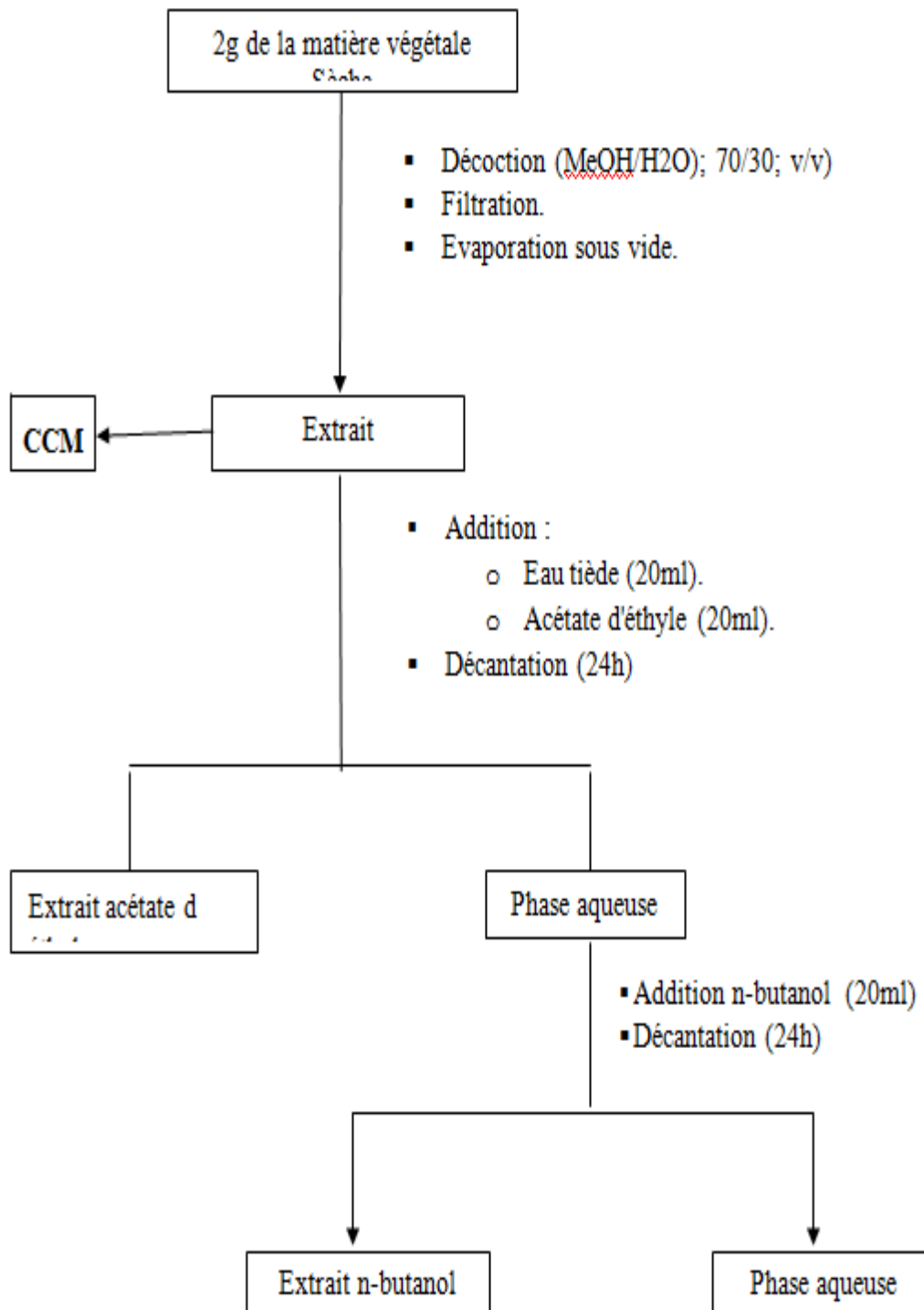


Figure 11: Extraction des flavonoïdes (Bekkara et al, 1998).

6. Dosage des polyphénols:

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**, dans des tubes à essai, on mélange **2 ml** d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à **(2%)** fraîchement préparée est ajoutée à **100 µl** de l'extrait brut (Méthanolique dilué si nécessaire), le mélange est agité par un vortex. Après **5 minutes**, **100 µl** du réactif de Folin-Ciocalteu (fourni par Prolabo) à **(1N)** sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant **30 minutes** à la température ambiante à l'obscurité, et la lecture est effectuée contre un blanc au spectrophotomètre (**Perkin Elmer, Lambda 800**).

L'absorbance (Abs) maximale lue à 750 nm est proportionnelle à la quantité de composé phénolique présent dans les extraits bruts. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g).

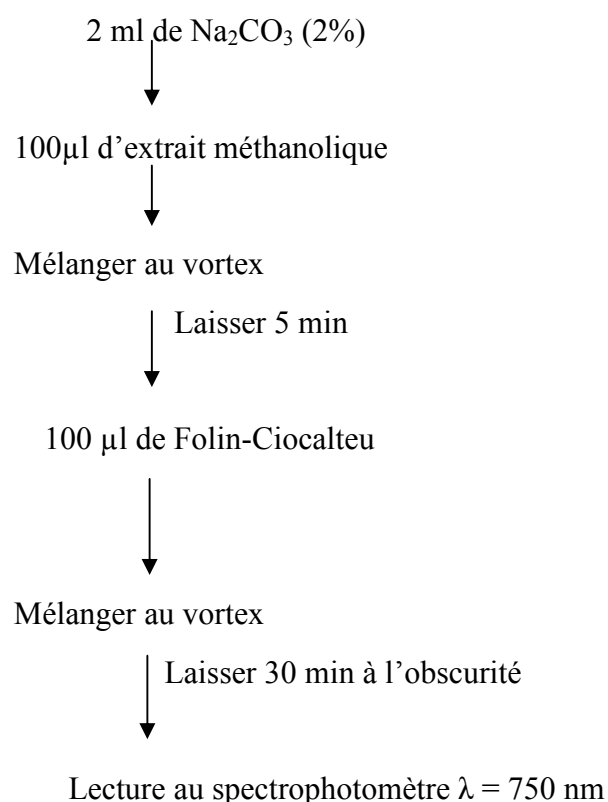


Figure 12: Méthode de dosage des polyphénols (**Singleton, 1999**).

7. Dosage des flavonoïdes:

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à $\lambda = 510$ nm.

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode décrite par (Kim et al, (2004)). La lecture de la densité optique à 510 nm permet de déterminer la concentration des flavonoïdes, en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une série de solutions étalons de catéchine ayant différentes concentrations.

Dans des tubes à essai, on mélange 500 μ l d'extrait méthanolique et 1500 μ l d'eau distillée, puis on ajoute successivement les réactifs suivants :

- ✓ Au temps zéro, 150 μ l de nitrite de sodium NaNO_2 à 5 %.
- ✓ Après 5 minutes, 150 μ l de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 %.
- ✓ Après 11 minutes, 500 μ l d'hydroxyde de sodium NaOH 1M.

Le blanc est préparé en remplaçant la quantité de l'extrait méthanolique par le méthanol, dans les mêmes conditions. Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à $\lambda = 510$ nm.

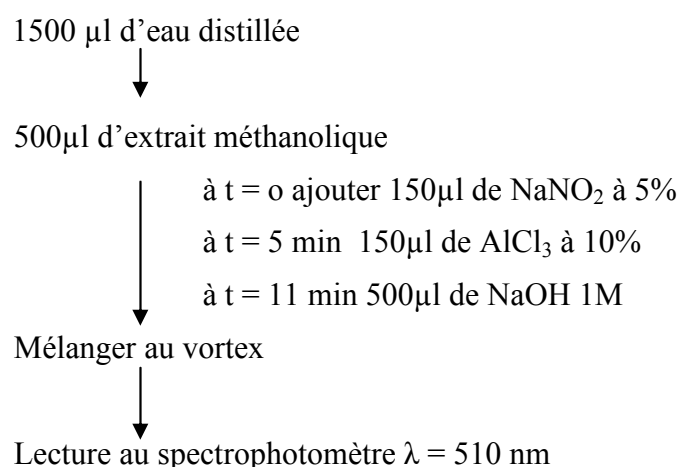


Figure 13: Méthode de dosage des flavonoïdes (Kim et al, (2004)).

8. Chromatographie sur couche mince (CCM):

La chromatographie sur couche mince est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie, une plaque de CCM se compose d'un support en aluminium, en verre ou en plastique, sur lequel est fixé une fine couche d'un milieu de sorption (silice, cellulose, alumine, polyamides...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre. Elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par une micropipette et éventuellement séché, sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire (**Hennebelle, 2006**).

- **Préparation d'éluant :**

Le solvant préparé est le solvant (**BAW**) Butanol, Acide acétique et Eau distillée de volume (4 :1:5)

- **Préparation de la cuve**

- Verser l'éluant 60ml.
- Fermer la cuve.
- Laisser saturer pendant au moins 1 heure. On pourra faciliter la saturation en plaçant un papier filtre imbibé d'éluant dans la cuve le long de la paroi.
- Tracer délicatement au crayon un trait fin (1cm du bord inférieur) : c'est la ligne de dépôt. Les dépôts ne devront pas tremper dans l'éluant.
- Marquer par des croix ou des traits les emplacements correspondant aux échantillons (les extraits) à déposer en gardant un espace minimum avec les bords de la plaque. Repérer par un chiffre.
- Déposer les extraits avec une pipette pasteur.
- Introduire délicatement la plaque dans la cuve et veiller à ce que la ligne de dépôt ne soit pas au contact de l'éluant.
- Refermer la cuve ne plus la toucher et laisser éluer.
- Sortir la plaque. Repérer le maximum atteint par l'éluant.

- **Révélation :**

La révélation peut être effectuée à l'aide d'une lampe UV (port une lunette de protection recommandé).

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle : Rapport frontal ou rétention frontale (**Rf**).

Dans tous les cas il faut noter la position des tâches colorées justes à la fin de la chromatographie en les entourant avec un crayon (**Hamiat, 2006**).

Les rapports frontaux (**Rf**) sont calculés par l'équation suivante :

$$\mathbf{Rf = h/H}$$

h : Distance parcourue par le constituant

H : Distance parcourue par le solvant.

Dans notre travail, nous avons réalisé la séparation des extraits bruts (MeOH) sur un support avec le solvant (**BAW**) Butanol/ Acide acétique/ Eau distillée (4 :1:5) (**Markham, 1982**).

Après développement du chromatogramme, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV à la longueur d'onde 365 nm.

9. Activité biologique

9.1. Activité antioxydante :

9.1.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire (Piégeage du radical libre DPPH) :

La méthode DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre. Elle est utilisée par **Dong- Sun Lee *et al*, (2001)**. Les composés antioxydants présents dans les extraits de nos espèces végétales peuvent réduire le radical libre (DPPH[•]) selon la réaction suivante:

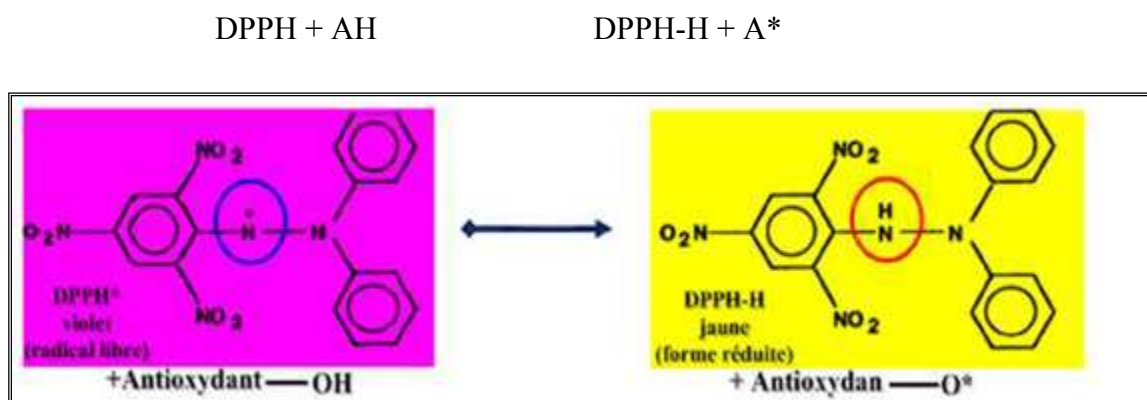


Figure 14 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (**Molyneux, 2004**).

La réduction du DPPH s'accompagne par passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution, mesurable à $\lambda = 515$ nm. La solution de DPPH à 0,0025 g/l est préparée à l'avance (au moins 3 ou 4 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 48h à l'obscurité. On prend 50 μ l de l'extrait à différentes concentrations (g/l) on lui ajoute 1950 μ l de DPPH dissous dans le méthanol. Le contrôle est préparé en parallèle, en mélangeant 50 μ l du méthanol avec 1950 μ l de DPPH.

On incube à la température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. On mesure la densité optique à $\lambda = 515$ nm. Les valeurs obtenues sont la moyenne de trois répétitions.

L'acide ascorbique est un contrôle positif. L'absorbance lue est transformée en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance de la solution témoin.

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante:

$$I\% = [(At - Ae)/At] \times 100 \quad (Wang \textit{ et al}, 2002)$$

Où: At : La densité optique de DPPH sans extrait.

Ae : La densité optique de DPPH avec extrait.

I% : pourcentage d'inhibition.

▪ Calcul des IC50:

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-Michalowska et Czlapka-Matyasik, 2011**).

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant de nos extraits, nous avons introduit le paramètre **IC50** (concentration inhibitrice de 50%), aussi appelée **EC50** (Efficient concentration 50).

L'indice IC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50%. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite (**Popovici et al, 2009**).

Les résultats sont exprimés en µg/ml et les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

9.2. Activité antimicrobienne

9.1. Activité antibactérienne :

Plusieurs études dans le monde ont signalé l'*Ephedra* comme une plante antimicrobienne (Yan *et al*, 2012; AL-Qarawi *et al*, 2013; Shahidi Bonjar, 2004; Mohamed Soltan et Kamal Zaki , 2009; Bussmanna *et al*, 2008; Bussmanna *et al*, 2010; Parsaeimehr *et al*, 2010). Alors que peu d'étude sur le plan local (Chebouat *et al*. 2014) (Kessal *et* Bouafia, 2003) et surtout aucune recherche n'a ciblé l'effet des parties aérienne (tiges et feuilles) et souterraine séparément.

Nous avons donc décidé de l'étudier en testant l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Ephedra alata* et d'*Ephedra major* sur des souches à GRAM négatif et des souches à GRAM positif.

9.1.1. Les souches bactériennes utilisées:

a. Les souches à Gram+ :

- ***Staphylococcus aureus*** : Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est l'un des agents pathogènes les plus importants pour l'homme. C'est une bactérie aérobie-anaérobie facultative à Gram positif, de forme sphérique avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Ce type de bactéries sont immobiles, asporulées, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré (**Patrick et al, 1988**). Elles peuvent causer de nombreuses maladies; d'infections cutanées mineures à des maladies mortelles, telles que les abcès, la pneumonie, la méningite, endocardite, la septicémie, l'arthrite septique, l'ostéomyélite, infections intravasculaires (**David et Daum, 2010 ; Chang et al, 2013**).

- ***Bacillus cereus*** : C'est une bactérie (Gram positif) mobile, sporulée en forme de bâtonnet, associé à deux types distincts de trouble gastro-intestinal, le syndrome diarrhéique et émétique (**Jebberger et al, 2014 ;Li et al, 2016**), après la consommation d'un aliment contaminé, qui contient plus que 10⁴–10⁵ spores ou cellules végétatives de *B. cereus* par gramme (**Jensen et al, 2003; Bannia et Kaul, 2015**).

b. Les souches à Gram- :

- ***Escherichia coli* :** *E. coli* est un bacille à Gram négatif (**Patrick et al, 1988**), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (**Steven et al, 2004**). Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux.

- ***Pseudomonas aeruginosa* :** *P. aeruginosa* est une bactérie mono-flagellée à Gram négative, présente dans divers environnements et souvent dans l'eau (**Méar et al ; 2013**). Elle est responsable d'environ 10% à 20% des infections nosocomiales et possède de multiples mécanismes de résistance qui sont encodés dans les chromosomes intrinsèques, y compris, le développement des pompes multi-résistantes à la pénétration des médicaments, la production de β-lactamases et les enzymes de modification des aminosides (**Mahmoud et al ; 2013**).

- ***Acinetobacter baumannii* :** *A. baumannii* est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Moraxellaceae* (**Wendpoulomé et al, 2016**). Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont ubiquitaires (eau, sol, végétaux, etc.). Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore saprophyte cutanée de la peau saine et sont souvent retrouvés dans les localisations humides (creux axillaires, aines, espaces interdigitaux) (**Joshi et al, 2013**). Depuis quelques décennies, les bactéries du genre *Acinetobacter* ont été impliquées dans de nombreuses maladies infectieuses. Bien qu'elles soient principalement associées aux infections nosocomiales, elles ont également été impliquées dans des cas d'infections acquises communautaires (**Telang et al, 2011**). Leur grande résistance à de nombreux antibiotiques rend le traitement de ces infections difficile.

Nous avons utilisé dans cette étude des souches de références (tableau 6).

Tableau 6: Les différentes souches bactériennes et fongiques et leurs références.

Souches utilisées		Espèces	Références
Bactéries	• Bactéries à gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25921
	• Bactéries à gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
Champignons	• Non filamenteux	<i>C.albicans</i>	IP444
	• Filamenteux	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
		<i>Penicillium s</i>	-

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de nos plantes, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme), celle-ci permet de déterminer la sensibilité et la résistance des souches à partir d'une gamme de concentrations d'extraits. L'absence de croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre. Nous avons testé l'effet antimicrobien de 03 antibiotiques sur la souche.

• **Préparation de l'inoculum:**

À partir d'une culture pure, 1 ou 2 colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées avec une anse de platine et émulsionnées dans un tube contenant 10 ml de BMH, puis bien homogénéisées à l'aide d'un Vortex (**Rahal et al, 2008**).

Après 18-24 h d'incubation à 37°C, Les souches ont été revivifiées, la turbidité a été ajustée à 0,5 McFarland, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries (D.O = 0,08 à 0,1/ $\lambda = 625$ nm), $1-5 \times 10^6$ UFC/mL pour *C. albicans*, (D.O = 0,12 à 0,15 / $\lambda = 530$ nm) (**NCCLS**) et 106 spores /mL pour les champignons filamenteux (68-82% de transmittance / $\lambda = 530$ Nm) (**M. A. PFALLER, al 1998**).

Les milieux de culture de chaque souche sont Mueller-Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour *C. albicans* et PDA pour les Champignons.

- **Ensemencement :**

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, les boîtes de pétries sont coulées à une épaisseur de 4 mm, puis on ensemence l'inoculum par ecofillonage.

Application des disques d'antibiotiques :

Il est préférable de ne pas mettre plus de **06** disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Les disques d'antibiotiques sont déposés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de milieu ensemencé. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Puis on les place à l'étuve pour une incubation de 24 heures à 37°C (**Ammari et al, 2005**).

- **La Lecture :**

À élever de l'étuve, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour du disque d'un halo translucide correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible.

La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé et les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type.

9.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode des puits :

Des puits de 6 millimètres de diamètre ont été percés dans l'agar à l'aide d'une pipette Pasteur stérile; et remplis de **50 μ l** de l'extrait de deux concentrations 20 mg/ml et 30 mg/ml de l'extrait respectivement. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24h à 37°C. Toutes les expériences ont été effectuées en triple. L'activité antimicrobienne a été déterminée par la mesure des zones d'inhibition (**Janakat et al, 2005**).

La sensibilité des souches aux différents extraits a été classée selon le diamètre de la zone d'inhibition comme se suit (**Ponce et al, 2003**) :

- ✓ Diamètre moins de 8 mm : non sensible.
- ✓ Diamètre de 9 – 14 mm : sensible.
- ✓ Diamètre 15 – 19 mm : très sensible.
- ✓ Diamètre supérieur à 20 mm : extrêmement sensible.



Figure15 : Evaluation de l'activité antibactérienne méthode des puits.

9.2. Activité antifongique des extraits *d'Ephedra major* et *d'Ephedra alata* :

9.2.1. Champignons étudiés :

a. Moisissures:

- ***Fusarium oxysporum*** : *F. oxysporum* sont des champignons ascomycètes de la famille des Nectriaceae, responsables de la pourriture racinaire (Ashokvardhan et al ; 2014), dont certaines sont des agents pathogènes majeurs véhiculés par le sol de plantes économiquement importantes. Les membres du complexe d'espèces *F. oxysporum* sont omniprésents dans le sol et ont été trouvés dans un large éventail d'écosystèmes (Kang, 2014).

➤ ***Penicillium sp*** : *P. sp* sont des champignons filamenteux ubiquitaires, fait partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits, reproduction asexuelle) (NGUYEN MINH TRI, 2007). Ces espèces sont des contaminants typiques des céréales de stockage et même ils ont utilisé pour la lutte biologique vis-à-vis quelque champignon tel *qu'Alternaria solani* (Hassine et al ; 2014).

c. **Levures :**

Condida 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.

La technique utilisée est la technique de diffusion en milieu gélosé. On ajoute dans 20 ml du milieu PDA différentes quantités d'extraits de plantes sont dissous dans du DMSO à raison 20mg/ml ou 30mg/ml. Ce mélange est coulé dans des boîtes de Pétri. Après séchage à la température ambiante, on inocule au centre de ces boîtes des disques de mycélium de chaque moisissure de 6 mm de diamètre coupés d'une culture de 5 à 7 jours. Nous incubons ces boîtes à 25° C pendant 7 jours. La mesure des diamètres des zones de croissances de l'hyphe a été effectuée 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 par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule de (Wang et al, 2005).

$$I\% = [(D_t - D_c) / D_t] \times 100$$

Où: **I**: pourcentage d'inhibition du mycélium.

D_t: diamètre de la colonie mycélienne témoin (non traité par des extraits), en centimètre.

D_e : diamètre de la colonie mycélienne (traité par des extraits), en centimètre.

La nystatine est employée comme contrôle positif.

Pour *Candida albicans*, l'activité antifongique a été révélée uniquement par le test de diffusion des puits, exactement comme pour les bactéries mais en faisant un ensemencement sur gélose Sabouraud. Les boîtes sont incubées à 30 C° pendant 24h (Senhaji, 2005).

Les analyses de la variance sont réalisées par Excel. Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SD (n=2 à 3).

Troisième partie
Résultats et discussion

1. Rendements des extraits d'*Ephedra major* et d'*Ephedra alata*:

L'extraction des composés phénoliques par le méthanol des plantes étudiées, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits bruts.

Les résultats sont exprimés dans (la figure16) et (Annexes I.1)

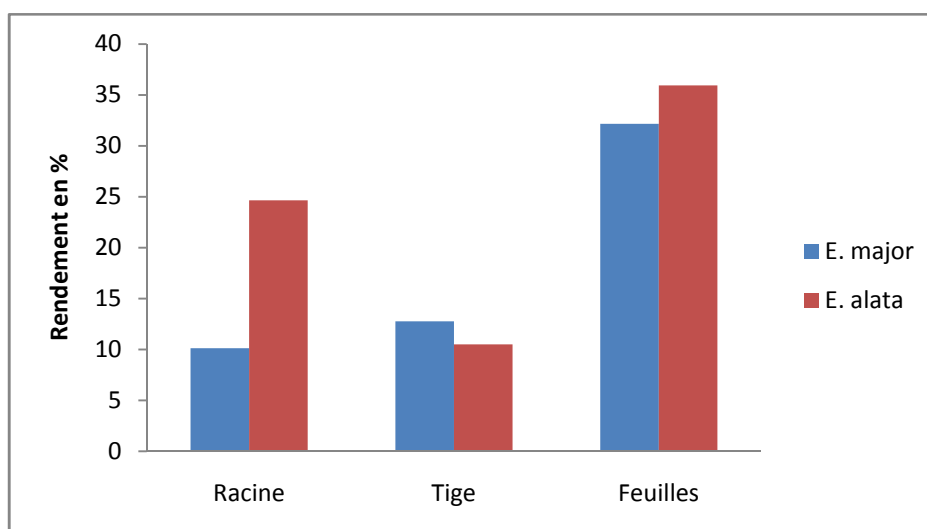


Figure 16: Rendements des extraits bruts (méthanoliques) d'*E. major* et d'*E. alata*.

Nous remarquons que le rendement des extraits d'*E. major* est de 32.17 % pour les feuilles qu'est le meilleur rendement de cette partie par rapport aux autres parties : racine, tige, qui ont les rendements suivants: 10.13%, 12.77% respectivement, et pour le rendement des extraits d'*E. alata* est 37.73% pour les feuilles qu'est aussi le meilleur rendement de cette partie par rapport aux autres parties : racine, tige, qui ont les rendements suivants: 25.65 %, 10.49 % respectivement.

Donc selon les résultats, nous constatons les rendements d'*E. alata* et d'*E. major* sont presque les mêmes sauf au niveau des racines d'*E. alata*, le rendement est plus élevé que le rendement des racines d'*E. major*.

2. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits, on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

D'après **Markham (1982)**, on résumé les résultats de la séparation des composés phénoliques par CCM des extraits d'*E. major* et *E. alata* dans les tableaux (7 et 8) et (la figures 17).

Tableau 7: La séparation des composés phénoliques par CCM d'*E. major* (racine, tige, feuilles) (Système solvant BAW (Butanol/acide acétique/eau) (4/1/5), support : gel de Cellulose.

	Extraits brut (MeOH)	Couleurs (365nm)	Rf	Type des flavonoïdes possible Markham (1982)
	<i>E. major</i>	Racine	Marron	0.39
Bleu			0.45	Acide phénol
Jaune			0.48	Flavonol
Marron claire			0.53	phénol
Jaune			0.84	Flavonol
Tige		Marron	0.39	phénol
		Bleu	0.48	Acide phénol
		fluorescence blanche	0.51	Isoflavone
		Marron foncé	0.55	phénol
		Jaune	0.63	Flavonol
		Marron clair	0.69	phénol
		Jaune	0.75	Flavonol
		Orange clair	0.83	Anthocyanidin
Feuilles		Marron	0.39	phénol
		Bleu	0.48	Acide phénol
		Fluorescence blanche	0.51	Isoflavone
		Marron clair	0.55	phénol
		Jaune	0.63	Flavonol
		Orange clair	0.69	Anthocyanidin
		Jaune	0.75	Flavonol
		Orange foncé	0.83	

Tableau 8: La séparation des composés phénoliques par CCM d'*E. alata* (racine, tige, feuilles) (Système solvant BAW Butanol/acide acétique/eau) (4/1/5), support : g el de Cellulose.

	Extraits brut(MeOH)	Couleurs (365nm)	RF	Type flavonoides possible Markham (1982)
<i>E. alata</i>	Racine	Bleu foncé	0.48	Acide phénol
		Bleu clair	0.51	Acide phénol
		Jaune	0.56	Flavonol
		Violet	0.60	flavone
		Jaune	0.66	Flavonol
		jaune Verdâtre	0.72	Flavonones
		Jaune	0.79	Flavonol
	Tige	Bleu foncé	0.48	Acide phénol
		Bleu clair	0.51	Acide phénol
		Jaune	0.56	Flavonol
		Bleu claire	0.60	Acide phénol
		Violet	0.69	flavone
		jaune Verdâtre	0.75	Flavonones
		Jaune	0.80	Flavonol
		rouge	0.83	Anthocyanidin
	Feuilles	Bleu foncé	0.48	Acide phénol
		Bleu claire	0.51	Acide phénol
		Fluorescence blanche	0.55	isoflavone
		Marron clair	0.58	phénol
		Marron foncé	0.66	phénol
		Violet	0.69	flavone
		Rouge	0.77	Anthocyanidin
		orange	0.88	Anthocyanidin

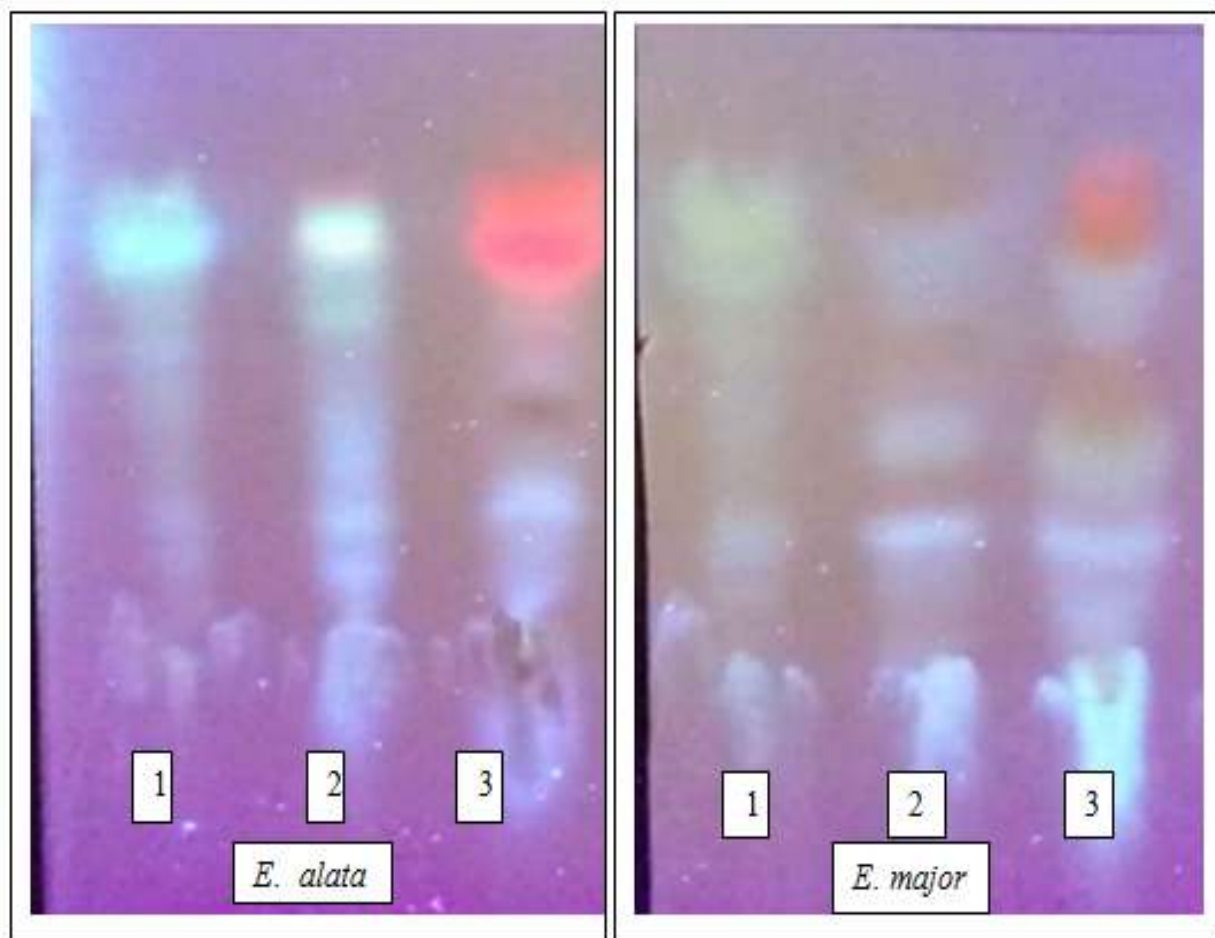


Figure 17 : Chromatogramme des extraits bruts (MeOH) d'*E. major* et *E. alata* (racine, tige, feuilles) sur couche mince (Système solvant BAW Butanol/acide acétique/eau) (4/1/5), support : g el de Cellulose.
1 : Racine; 2 : Tige; 3 : Feuilles.

Selon **Markham** et comme on a mentionné plus haut, la plupart des flavonoïdes ne sont pas visibles sur le gel de chromatographie (cellulose) après leur migration (BAW comme phase mobile), à l'exception des anthocyanines qui apparaissent en spots oranges et les chalcones, aurones et 6 hydroxyflavonols qui apparaissent en jaune. Pour cette raison, les chromatogrammes doivent être visionnés sous lumière UV, et les flavonoïdes deviennent visibles (fluorescents) sous cette lumière (**Markham, 1982 ; Hamlat, 2006**). Le tableau (9) Interpréter les couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes.

Tableau 9: Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes.

Couleur des spots sous lumière UV	Type de flavonoïdes selon lumière UV Markham (II 982)
Violet et violet foncé	Typique pour les flavones et flavonols glycosides (hétérosides)
Fluorescence bleue	Caractéristique des acides phénols
Fluorescence blanche	Isoflavones
Jaune orangé	Flavonols avec 3-OH libre (et dihydroflavonols)
Fluorescence jaune	-Flavonols -Aurones et quelques 2-, 4-OH chalcones
Jaune verdâtre, bleu verdâtre ou vert	-Flavonols avec 3-OH libre -Flavonones ou aurones
Orange, rouge ou mauve	Anthocyanidin 3-glycosides
Rose	La plupart des 3-5 diglycosides

Selon les couleurs des spots obtenues sur les chromatogrammes des deux plantes (tableaux 7 et 8) et selon (la figure 17), on peut dire que:

L'E. major. La partie souterraine (racine) Contient trois (03) couleurs sont : Marron, bleu, jaune. Qui sont des composés phénoliques et flavonols. Et contient dans la partie aérienne (tiges et feuilles) cinq (5) couleurs sont : Marron, Bleu, fluorescence blanche, Jaune et Orange, indiquent des composés phénoliques, flavonols, Isoflavones, et Anthocyanidin.

Aussi *l'Ephedra alata* ; la La partie souterraine (racine) Contient trois 03 couleurs et cinq (5) couleurs dans la partie aérienne (tiges et feuilles). Elle aussi contient des composés phénoliques, flavonols, Isoflavones, et Anthocyanidin.

Enfin, on constate que toutes les taches révélées sont compatibles avec les composés phénoliques et les flavonoïdes par conséquent, les extraits de deux plantes peuvent être riches en métabolites secondaires.

3. Teneur en polyphénols et des flavonoïdes :

Le dosage des polyphénols a été réalisé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par **Vermarris et Nicholson (2006)**, utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. La teneur en polyphénols a été exprimée en équivalent d'acide gallique (GAE) en Milligramme (mg) par gramme(g) de matière végétale sèche. Elle est calculée selon l'équation: $Y = A X + B$ obtenue à partir du graphique standard de ce dernier. (**Annexe I.4**).

Le dosage en flavonoïdes des extraits a été déterminé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (**Kim et al, 2004**). La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par un standard étalon (La catéchine) à différentes concentrations et exprimé en milligrammes (mg) d'équivalents de la catéchine par gramme(g) d'extrait (mg EC /g d'extrait). Le taux des flavonoïdes correspondants de nos extraits ont été déterminés par l'équation : $y = 0,0311x - 0,0254$. (**Annexe I.5**).

3.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits *L'Ephedra major* sont illustrés dans (Figure 18) et (Annexe I.1) :

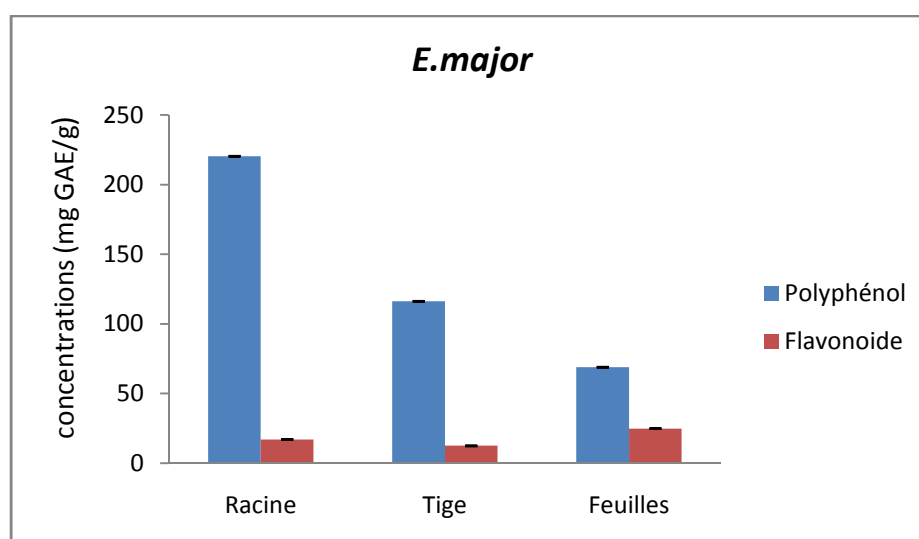


Figure 18: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits bruts d'*E. major*.

Comme montré sur l'histogramme ci-dessus, il y a une variabilité dans la teneur des polyphénols dans nos différents extraits, on obtient une teneur plus élevée en polyphénol avec une valeur de 220.43 mg GAE/g d'extrait brut au niveau de racine d'*Ephedra major*, ensuite moins faible dans les tiges de valeur 116.86 mg GAE/g, puis très faible dans les feuilles de valeur 68.99 mg GAE/g.

Concernons les teneurs en flavonoïdes d'*E. major*, en générales sont faibles. On a obtenu dans les feuilles une teneur de valeur 24.89 mg EC/g et des valeurs de 17.09 et 12.60 mg EC/g dans les racines et tiges.

Et en fin selon nos résultats, on conclut que la teneur en polyphénol des extraits des différentes parties d'*E. major* est forte surtout au niveau partie souterraine (racine) au contraire la teneur en flavonoïdes est forte au niveau partie aérienne (les feuilles).

3.2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits L'*E. alata* sont illustrés dans (Figure 19) et (Annexe I.2) :

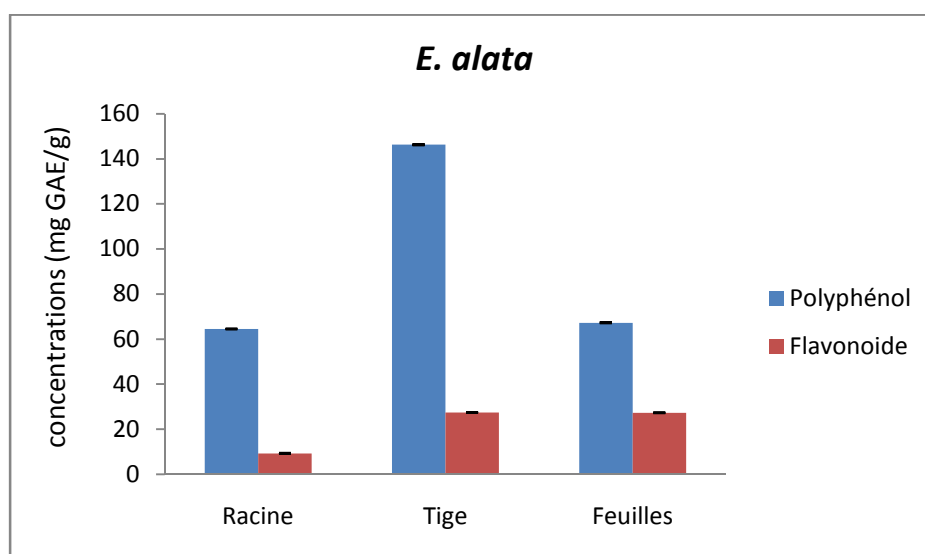


Figure 19: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits bruts d'*E. alata*.

A partir des résultats obtenus, on n'observe que la teneur en polyphénols des extraits d'*E. alata* est forte aux extraits des tiges de valeur 146.30 mg GAE/g, et moins faible aux extraits des feuilles et racines avec des valeurs 67.26 et 64.50 mg GAE/g, respectivement.

Les teneurs en flavonoïdes sont fortes aux extraits de partie aérienne (tiges et feuilles) *d'E. alata* avec des valeurs 27.42 et 27.3 mg EC/g respectivement, et moins faible aux extraits de partie souterraine avec valeur 9.23 mg CE/g.

En fin, nous concluons que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans la partie aérienne (tiges et feuilles) est élevée par rapport dans la partie souterraine

Ces résultat est à l'instar d'autres plusieurs études, par exemple : Les résultats obtenus par **Kabili (2016)** pour *E. alata* de la région d'Ouargla montrent que la valeur la plus élevée en phénols totaux est notée pour l'extrait de la partie aérienne (291,45µg GAE /mg E). il y a aussi les résultats de **Atatra et Bouhdiche (2018)** montre que la teneur en polyphénols totaux dans l'infusé de partie aérienne *d'E. alata* est estimée par 69.01 mg GAE /g MS.

Dans les travaux de **Bosn J (2015)** sur les espèces du genre *Ephédra* trouvent que les teneurs du composés phénoliques totaux contenu (TPC) et les teneurs totale en flavonoïdes (TFC) les plus élevés ont été trouvés chez *E. alata*, (tableau 10).

Tableau 10: les teneurs du composés phénoliques totaux (TPC) et les teneurs en flavonoïdes (TFC) chez les espèces d'éphédra.

les espèces d'éphédra	TPC (mgGAE/g poids sec)	TFC (mg EC/g poids sec)
<i>Ephedra alata</i>	53,3 ± 0,1	2,8 ± 0,0
<i>Ephedra foliata</i>	52,6 ± 0,1	2,5 ± 0,0
<i>Ephedra distachya subsp. helvetica</i>	27,0 ± 0,4	2,1 ± 0,3
<i>Ephedra major</i>	26,2 ± 0,4	1,3 ± 0,2
<i>Ephedra altissima</i>	16,4 ± 0,1	2,0 ± 0,0
<i>Ephedra fragilis</i>	7,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2
<i>Ephedra foeminea</i>	6,8 ± 0,4	0,6 ± 0,2

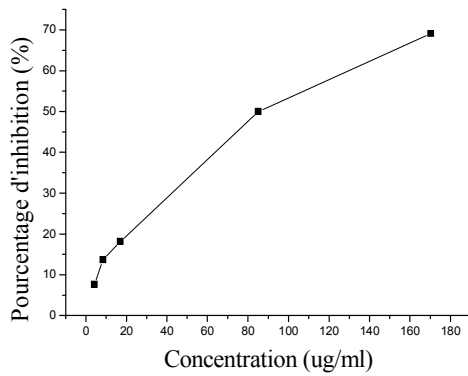
4. Activité biologique

4.1. Activité antioxydante

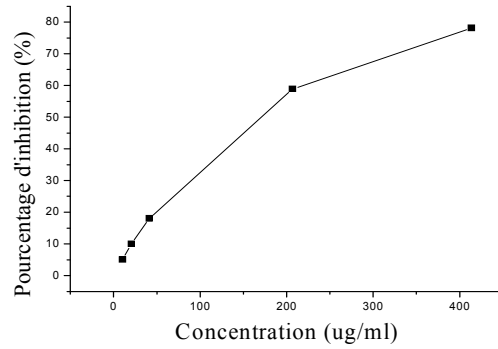
- **Piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl)**

L'activité antioxydante est déterminé par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 515 nm, qui est du à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H.

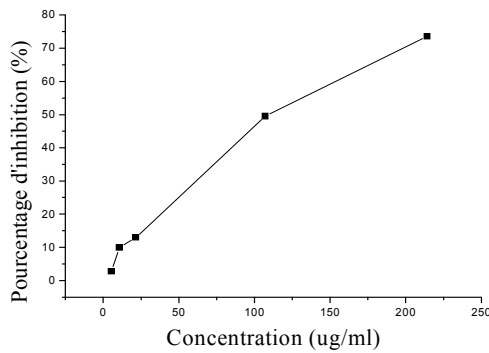
L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de nos extraits *d'E. major* et *d'E. alata* via le test DPPH, a conduit aux résultats illustrer par les graphes dans les figures (20, 21 à et la figure 22) (Annexe III.1 et III.2), qu'ont calculés à l'aide de logiciel (**OriginPro8**).



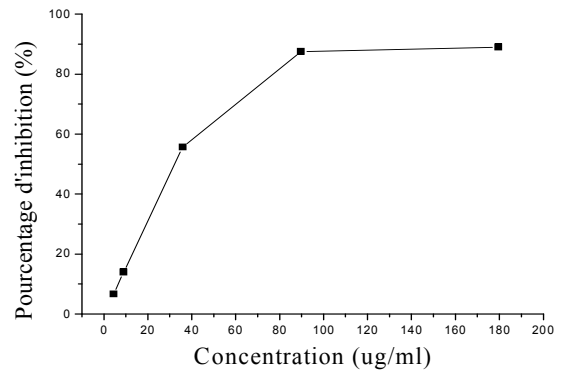
Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des racines d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



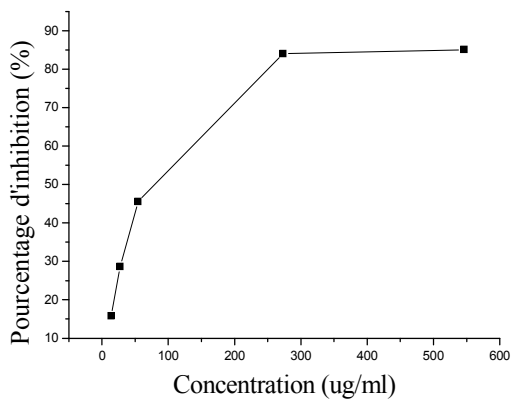
Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des racines d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



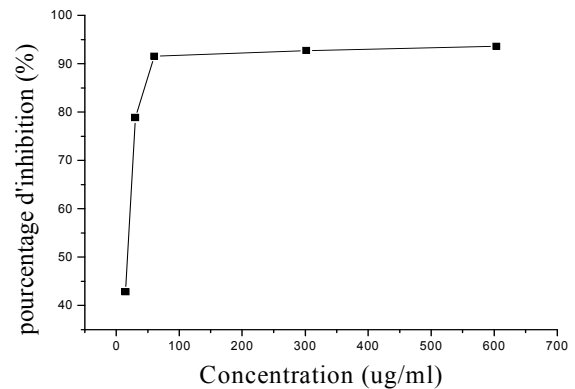
Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des tiges d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des tiges d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH

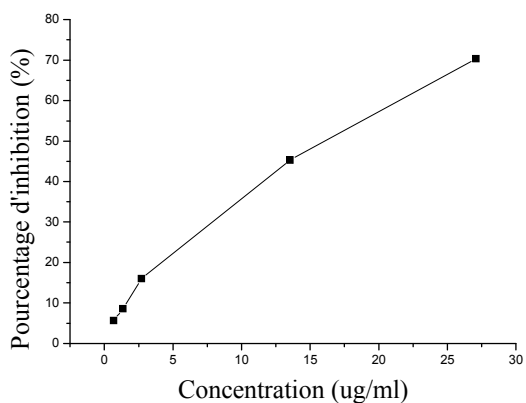


Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des feuilles d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

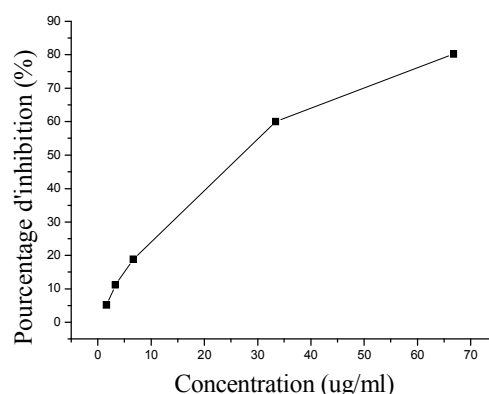


Pouvoir antioxydant d'extraits méthanolique des feuilles d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

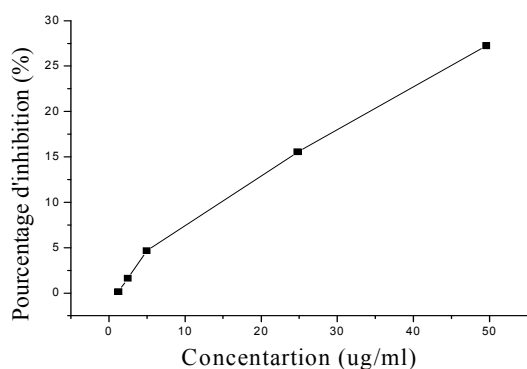
Figure 20 : Pouvoir antioxydante de la fraction méthanolique des deux plantes.



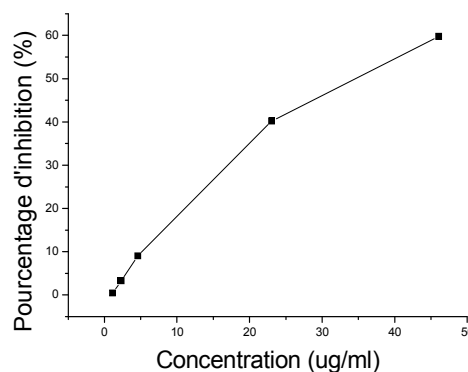
Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des racines d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



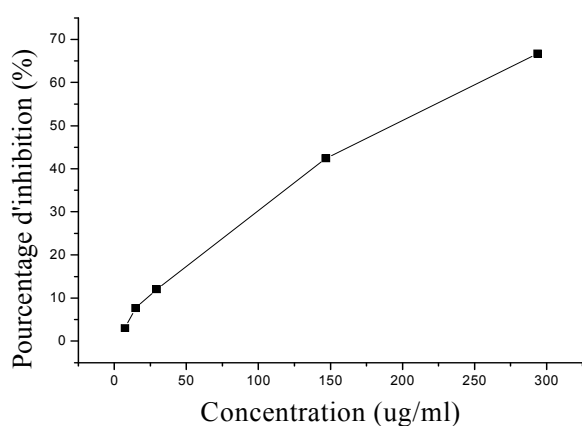
Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des racines d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



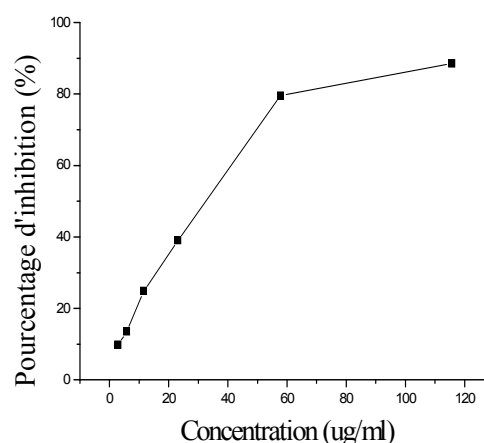
Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des tiges d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des tiges d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH

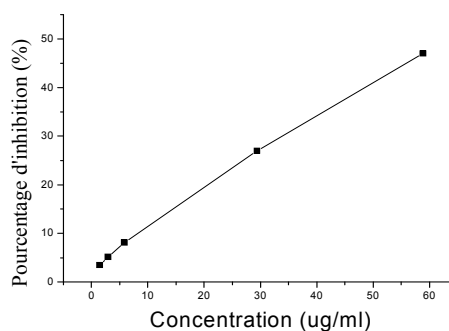
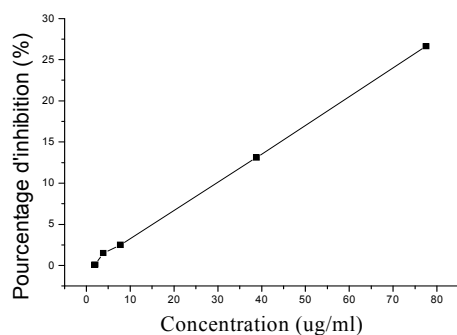


Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des feuilles d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH



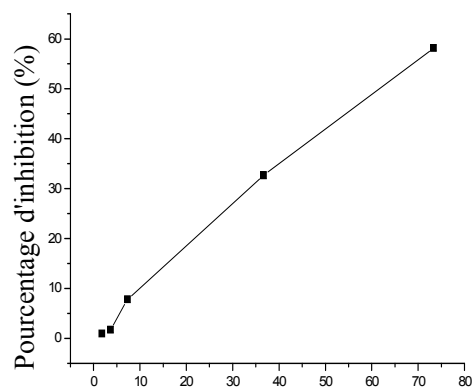
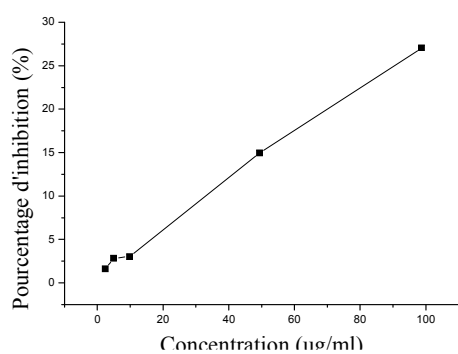
Pouvoir antioxydant d'extraits acétate des feuilles d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH

Figure 21 : Pouvoir antioxydante de la fraction acétate des deux plantes.



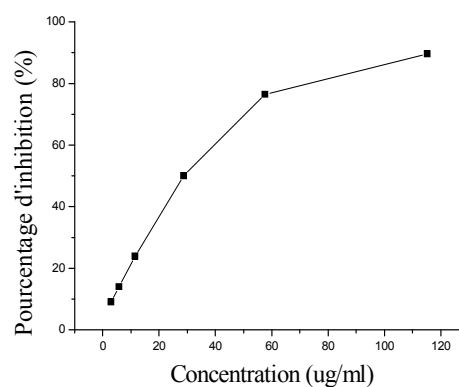
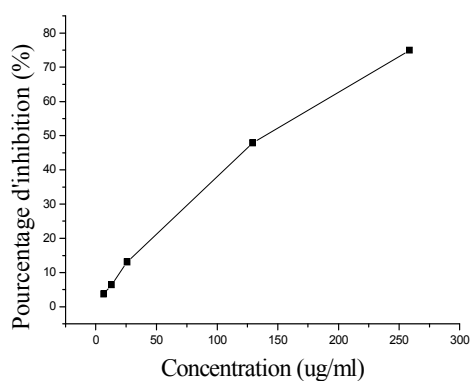
Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des racines d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical

Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des racines



Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des tiges d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des tiges d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.



Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des feuilles d'*E. major* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des feuilles d'*E. alata* testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Figure 22 : Pouvoir antioxydant de la fraction butanolique des deux plantes.

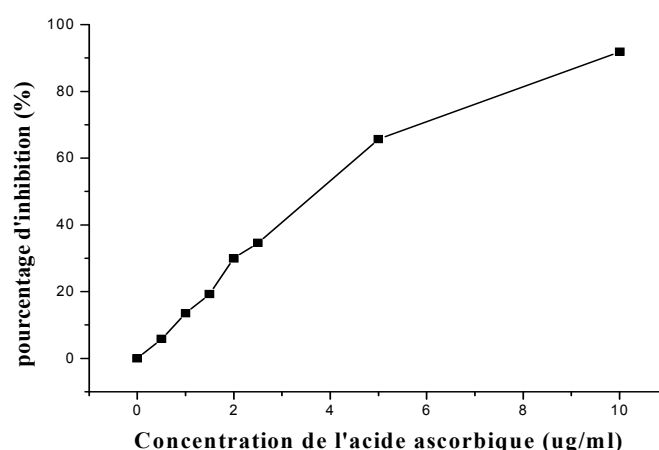


Figure 23 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique testé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Les IC50, Pour les extraits des différentes parties d'*E. major* et d'*E. alata* ou les concentrations nécessaires pour réduire 50% du radical libre DPPH (µg/ml) sont calculée à partir des équation des régressions linéaire des graphes représentés dans les figure (20, 21 et 22). Les valeurs sont représentées dans le (tableau 11).

Tableau 11 : Puissance anti radicalaire des extraits et de l'acide ascorbique.

	Extrait naturel		IC50 (µg/ml)
<i>E. major</i>	Racine	Extrait bruts	85.76
		Extrait acétate	15.75
		Extrait n-butanol	145.18
	Tige	Extrait bruts	109.66
		Extrait acétate	89.92
		Extrait n-butanol	183.79
	Feuilles	Extrait bruts	60.55
		Extrait acétate	187.89
		Extrait n-butanol	137.58
<i>E. alata</i>	Racine	Extrait bruts	154.36
		Extrait acétate	24.13
		Extrait n-butanol	61.83
	Tige	Extrait bruts	31.35
		Extrait acétate	32.65
		Extrait n-butanol	61.507
	Feuilles	Extrait bruts	35.70
		Extrait acétate	28.13
		Extrait n-butanol	27.83
Acide ascorbique		3.54	

L'acide ascorbique présente un pouvoir anti-radicalaire très puissant par rapport à nos extraits. De toute façon, selon (Moure *et al.* 2001), Les antioxydants naturels indiquent souvent un pouvoir antioxydant inférieur à celui des antioxydants synthétiques.

D'après les résultats d'activités anti-radicalaire d'*E. major*, on remarque que les extraits d'AcOEt des racines présentent les valeurs les plus faibles de l'IC₅₀ de valeur **15.75 µg/ml** et donc une activité anti-radicalaire plus importante comparativement aux autres extraits, qu'ils ont d'IC₅₀ élevées avec tous les fractions (MeOH, n-Butanol et AcOEt) avec des valeurs variées entre (60.55 à 187.89 µg/ml) donc aucune activité anti-radicalaire de ces extraits.

Concernant l'*E. alata*, et à partir des valeurs obtenues, nous avons constaté que les extraits des tiges et des feuilles d'*E. alata* ont une activité anti-radicalaire importante de 08 fois que celle de l'acide ascorbique **03.54 µg/ml** avec tous les fractions (MeOH, n-Butanol et AcOEt) avec des valeurs variées entre (24 à 35.65 µg/ml).

4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Nous avons testé les extraits de nos espèces vis-à-vis des souches bactériennes et champignons citées précédemment en appliquant la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé.

4.2.1. Etude de la sensibilité des souches bactériennes et fongiques aux antibiotiques:

La méthode utilisée pour la détermination de la sensibilité des bactéries et des champignons vis-à-vis des antibiotiques est l'antibiogramme.

On a utilisé trois antibiotiques et un antifongique pour tester cette sensibilité : Amoxicilline (AML2) ; Pénicilline (P1) ; Vantamcilline (VA) et Nystatine (Ny).

Les figures (24, 25 et 26) et (Annexe II.1) rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches utilisées.

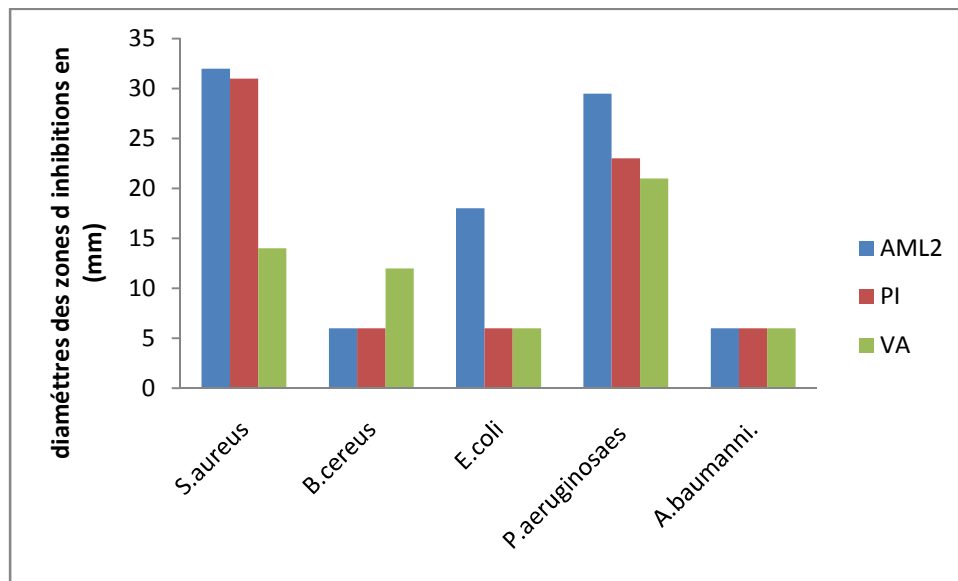


Figure 24 : Activité antibiotiques vis-à-vis des cultures bacteriennes.

AML2 : Amoxicilline ; P1 : Pénicilline; VA : Vantamcilline.

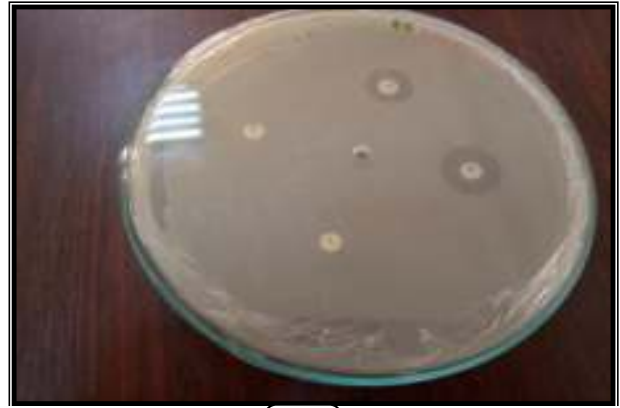
S. aureus: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* : *Escherichia coli* ATCC 8739, *B.cereus* : *Bacillus cereus* ATCC 25921. *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *A. baumannii* : *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

Nos résultats illustrés par le figure (24), montrent que : La souche *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'AML2 et P1 avec des zones d'inhibition de 30 mm vis-à-vis l'AML2 et 29 mm vis-à-vis P1. Et *Pseudomonas aeruginosa* est aussi très sensible à l'AML2 et P1 avec des zones d'inhibition de 29 mm vis-à-vis l'AML2 et 24 mm vis-à-vis P1.

On montre aussi que la souche d'*Acinetobacter baumannii* est résiste à ces antibiotiques.



A



B



C



D



E

Figure 25: Photos d'antibiogramme des antibiotiques vis-à-vis des cultures microbiennes.

A: Aactivité des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa*.

B: Activité des antibiotiques sur *Escherichia coli*.

C : Activité des antibiotiques sur *Acinetobacter baumannii* .

D: Activité des antibiotiques sur *Staphylococcus aureus*.

E : Aactivité des antibiotiques sur *Bacillus cereus*.

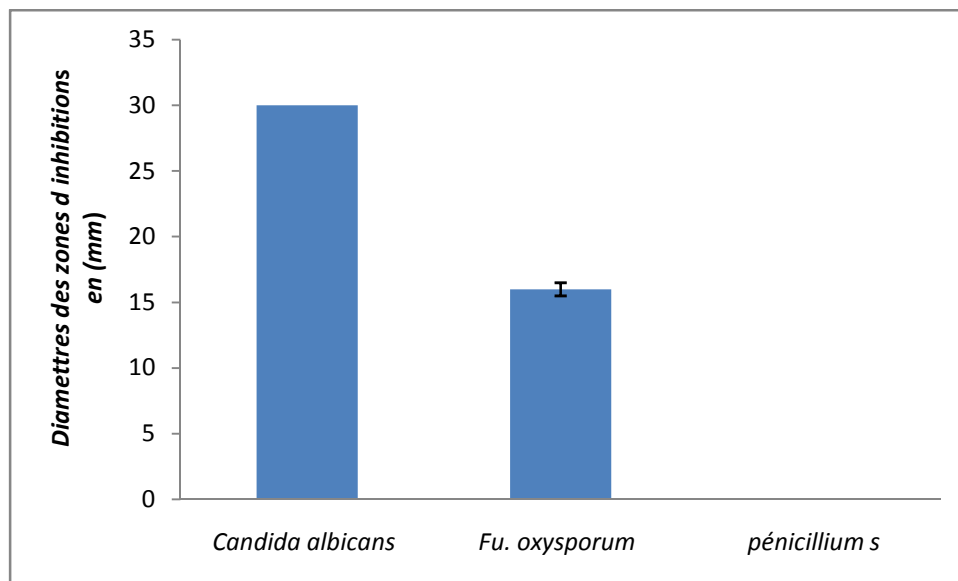


Figure 26 : Activité de la Nystatine sur les souches fongiques.

Pour *Fusarium oxysporum* et *C albicans*, elles sont sensibles à la Nystatine, par contre *pénicilliums sp* est résisté à la Nystatine.

4.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d'*E. major* :

La détermination de l'activité antibactérienne se fait par la méthode des puits. Les résultats obtenus sont dans les tableaux (12 et 13) les diamètres des zones d'inhibitions des extraits de différentes parties (racine, tige, feuilles) d'*E. major* vis-à-vis des souches bactériennes et souches fongiques

Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits d *E. major* vis-à-vis des souches bactériennes.

Concentration	Les parties d' <i>E. major</i>	Les zones d'inhibition des souches (mm)					
		Souches à Gram+		Souches à Gram-			DMSO
		<i>St.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. au</i>	AC	
20mg/ml	Racine	13,67±0,88	13 ±0,58	9,67 ±0,33	13,66±0,72	6	6
	Tige	17 ±0,58	14 ±1,15	6 ±0.00	15.66±0,54	6	6
	Feuille	15 ±1,53	14,67±1,20	13±0,58	18,33±0,98	6	6
30mg/ml	Racine	14,67±0,33	12 ±0,58	13,33±0,33	14.66±0,27	6	6
	Tige	18,33±0,88	15,33±0,88	6 ±0.00	15,33±0,27	6	6
	Feuilles	17,67±1,20	16,67±0,33	15 ±0,58	18 ± 0,81	6	6

Tableau 13: activité antifongique des extraits d *E. major* vis -à-vis des souches fongiques.

Les champignons et les levures							DMSO
concentration	<i>E. major</i>	<i>Fu. oxysporu</i>		<i>Penicillium</i>		<i>C.albic</i>	
		Diam en mm	% d'inhibition	Diam en mm	% d'inhibition		
20mg/ml	Racine	8.5	14.17	0	0	17± 1,53	6
	Tige	3.5	5.83	0	0	13,33± 0,67	6
	Feuilles	7.5	12.5	0	0	14,67± 0,88	6
30 mg/ml	Racine	0	0	0	0	19 ± 1,53	6
	Tige	7.5	12.5	0	0	18,67± 2,40	6
	Feuilles	2.5	4.17	0	0	14,33± 1,20	6



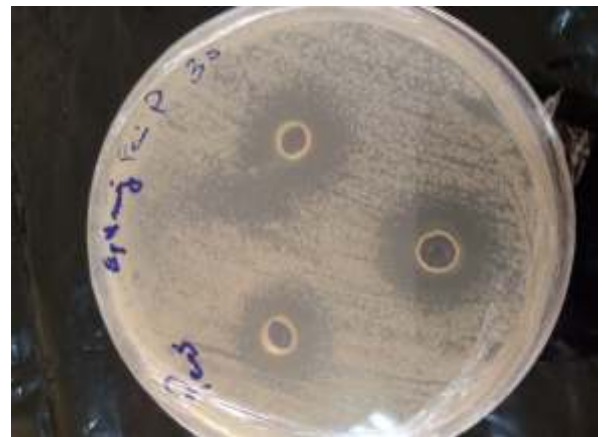
St.aureus "Extrait des tiges *E. major*"



St.aureus " Extrait des feuilles *E.major*"



Pseudemona.ae "Extrait racine d
E. major"



Pseudemona.ae "Extrait feuilles d'*E.*
major"



C. albicans "Extrait racine d *E. major*"



C. albicans " Extrait des feuilles *E.major*"

Figure 27 : Photos les effets des extraits d'*E. major* sur les souches bactériennes et les souches fongiques.

Selon le tableau ci-dessus (tableau 12) et la figure (27), on observe que les différents types de souches réagissent différemment aux extraits d'*E. major* et le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre.

Pour les bactéries à Gram positif ; on observe que *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) est très sensible aux extraits des feuilles et des tiges avec des zones d'inhibitions 17 et 15 mm à concentrations 20mg/ml et des zones d'inhibition (18.33 et 17.67 mm) à concentrations 30mg/ml. Par contre *B. cereus* (ATCC 25921) a une activité moins faible des valeurs varies entre (12 à 16.67 mm) à les deux concentrations.

Pour les bactéries à Gram négatif ; nos résultats montrent que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) est très sensible aux extraits des feuilles d'*E. major* avec des zones d'inhibition (18 mm) dans les deux concentrations. Et une sensibilité très faible *E. coli* ATCC 25921 vis à vis les extraits d'*E. major* des zones d'inhibitions varient entre (6 à 15 mm) à deux concentrations.

On remarque aussi qu'*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 est très résistante à tous les extraits d'*E. major*.

Concernant l'activité antifongique des extraits d'*E. major*; Les résultats sont exprimés dans le tableau (13). On remarque que les extraits des racines et des tiges ont une forte activité vis-à-vis le *C. albicans* avec des diamètres de (19 et 18.67mm) à concentration 30 mg/ml, et une très faible activité contre les champignons filamenteux ; *F. oxysporu* donne un pourcentage d'inhibition 12.5 à 14.17 % à la concentration 30mg/ml et *Penicillium. sp* n a aucune activité.

4.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d *E.alata* :

Les résultats qu'on obtenus, ont été exprimés dans (Tableau 14), (la figure 28).

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits d *E. alata* vis-à-vis des souches bactériennes.

Concentration	Les parties d' <i>E. alata</i>	<i>Les zones d'inhibition des souches (mm)</i>					DMSO
		Souches à Gram+		Souches à Gram-			
		<i>St.aureu</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. au</i>	<i>Ac</i>	
20mg/ml	Racine	16 ± 0,58	13 ± 0,58	15.33 ±0,33	17.33 ±0.27	6	6
	Tige	15± 0,58	9 ± 0.58	17 ± 0,58	14.67 ±0.27	6	6
	Feuilles	12 ± 0.00	10.33 ±0.88	11.67 ±0.88	12.33 ±0.27	6	6
30 mg/ml	Racine	20,67 ±1.76	14.67 ± 0.33	15 ± 0.58	19.67 ±0.27	6	6
	Tige	23.33 ±0,33	11.33 ±0.88	19.67 ±1.45	17 ± 0.47	6	6
	Feuille	13.5 ±0.41	12.33 ± 0.33	12 ±1.15	14.66 ±0.27	6	6

Tableau 15: Activité antifongique des extraits d *E.alata* vis-à-vis des souches fongiques.

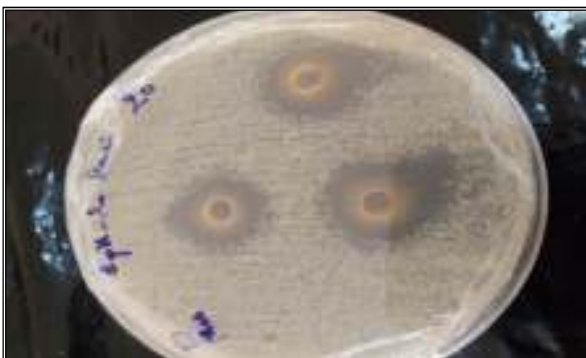
<i>Les champignons et les levures</i>							
concentration	<i>E. alata</i>	<i>Fu. oxysporu</i>		<i>Pénicillium</i>		<i>C. albicans</i>	DMSO
		Diam en mm	% d'inhibition	Diam en mm	% d'inhibition		
20 mg/ml	Racine	0	0	0	0	15.33 ± 0.66	6
	Tige	0	0	0	0	14 ± 0.58	6
	Feuilles	2	3.33			14.67 ± 0.88	6
30 mg/ml	Racine	3.5	5.83	0	0	17.33± 1.33	6
	Tige	3.5	5.83	0	0	14.67 ± 0.33	6
	Feuilles	7.5	12.5	0	0	18 ± 0.58	6



St. aureus extrait tige d *E.alata*



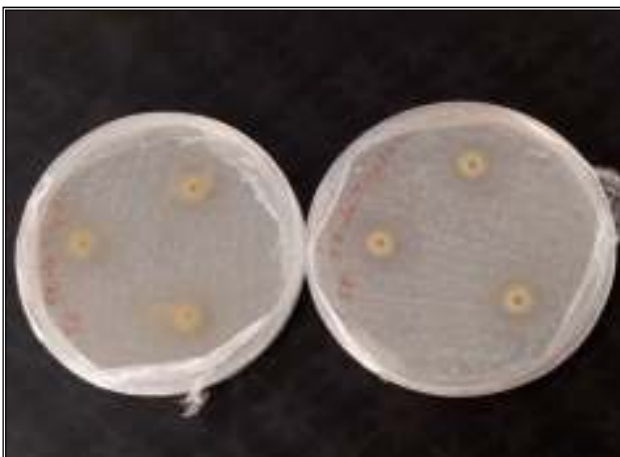
St. aureus "extrait racine d'*E. alata*"



Pseudemona aeruginosa "Extrait racine d *E. alata*"



Pseudemona aeruginosa "extrait tige d *E. alata*"



C albicans Extrait tige d *E. alata*"



C albicans Extrait racine d *E. alata*"

Figure 28 : les effets des extraits d'*E.alata* sur les souches bactériennes et les souches fongiques.

Selon les tableaux et la figure ci-dessus, on montre que pour les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* est très sensible aux extraits des racines et des tiges d'*E. alata* avec des zones d'inhibitions (20.67 et 23mm) à concentrations 30mg/ml. et une sensibilité très faible pour *B. cereus* (ATCC 25921) aux tous les extraits d'*E. alata* avec des valeurs varies entre (9 à 14.67mm).

Pour les bactéries à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible aux extraits des racines et des tiges d'*E. alata* avec des zones d'inhibitions varies entre (19.67 à 14.67mm) dans les deux concentrations. Et aussi avec *E. coli*, elle est très sensible aux extraits des tiges d'*E. alata* avec une zone d'inhibitions 19.67 mm à concentration 30mg/ml et 17 mm à concentration 20 mg/ml.

Et pour l'activité antifongique des extraits d'*E. alata*. On montre que le *C. albicans* sensible aux extraits des racines et des feuilles avec des diamètres des zones d'inhibition 17.33 et 18.83mm à concentration 30mg/ml. Par contre pour *F. oxysporum* a une très faible activité de pourcentage d'inhibition 12.5 % à l'extrait des feuilles à concentration 30mg/ml. Et avec *Penicillium. sp* aucune activité fongique.

Conclusion Générale

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et l'activité biologique (antioxydante et antimicrobienne) des extraits de deux espèces médicinales collectées de la région de Naâma; *Ephedra alata* et *Ephedra major*, ces plantes sont largement distribuées dans cette région et elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle. On peut résumer les résultats obtenus comme suit :

En ce qui concerne *Ephedra major* :

Les extraits des feuilles ont présenté le rendement le plus important de l'ordre de 32.17%, l'analyse des extraits méthanoliques par CCM, nous a révélé la présence des composés phénoliques tels que les flavonoïdes. La quantification par des méthodes spectrophotométriques de l'extrait brute nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes, les résultats obtenus nous ont révélé la richesse des racines en ces composés avec des teneurs de l'ordre 220.43 mg GAE/g et 24.89 mg EC/g respectivement.

L'activité antioxydante des extraits d'*E. major* été évaluée par méthodes de piégeage de radical libre DPPH. Les résultats ont montré que les extraits possèdent une activité antioxydante, grâce à leur constituants (composés poly-phénoliques), et on observe que cette activité est élevée dans l'extrait racines (**IC50 = 15.75µg/ml**).

L'activité antibactérienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes, selon la méthode de diffusion en puits. Les résultats indiquent que tous les extraits possèdent une activité antibactérienne sur toutes les souches testées. *Pseudomonas. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont sensibles aux différents extraits des feuilles (les zones d'inhibitions varient entre 17 à 18.33mm). Par contre *Acinetobacter baumannii* manifeste une résistance aux différentes concentrations des extraits, de plus ces derniers possèdent une faible activité antibactérienne contre les bactéries *Bacillus cereus* et *E. coli* (les zones d'inhibitions varient entre 6 à 16.33 mm).

En ce qui concerne le pouvoir antifongique des extraits d' *E. major*, nous avons remarqué une faible activité contre *Fusarium. oxysporum* et une résistance complète de *Penicillium*. Quant aux levures, des zones d'inhibitions intéressantes des diamètres 19 et 18.67 mm, ont été obtenues pour l' extraits des racines et des tiges (à 30 mg/ml) vis-à-vis *Candida albicans*.

En ce qui concerne la plante *Ephedra alata* :

L'extraction des feuilles de la plante a permis d'obtenir un meilleur rendement de l'ordre de 37.73%, l'analyse par CCM, nous a permis d'identifier des composés phénoliques tels que flavonols, isoflavones, et Anthocyanidin.

Teneurs en polyphénols et flavonoïde d'*E.alata* sont forte aux extraits des tiges de valeur 146.30 mg GAE/g, et moins faible aux extraits des feuilles et racines avec des valeurs 67.26 et 64.50 mg GAE/g, respectivement, et Les teneurs en flavonoïdes sont fortes aux extraits de partie aérienne (Tiges et feuilles) d'*E. alata* avec des valeurs (27.42 et 27.3 mg EC/g) respectivement, et moins faible aux extraits des racines avec valeur 9.23 mg EC/g.

L'activité antioxydante des extraits des tiges et des feuilles d'*E.alata* à une activité anti-radicalaire importante de 08 fois que celle de l'acide ascorbique de valeur (3.54 µg/ml) avec toutes les fractions (MeOH, n-Butanol et AcOEt) avec des valeurs varient entre (24 à 35.65 µg/ml)

L'activité antibactérienne des extraits des racines et des tiges d'*E. alata* est forte contre *Staphylococcus aureus* et *P.aeruginosa* à la concentration 30 mg/ml, les zones d'inhibitions varient entre 20.67 à 23.33 mm et 19.67 à 17 mm respectivement, par contre aucune activité n'a été observée contre *Acinetobacter baumannii*.

Le pouvoir antifongique des extraits d'*E. alata*, nous avons remarqué une faible activité contre *Fusarium. oxysporum* et une résistance complète de *Penicillium*. Quant aux levures, des valeurs intéressantes ont été obtenues pour le *Candida albicans vis-à-vis* des extraits des racines et des feuilles (zones d'inhibition varient entre 17 et 18 mm à 30mg/ml).

L'efficacité des extraits contre les bactéries confère un intérêt certain en tant qu'agents antimicrobiens dans plusieurs domaines tels que le milieu hospitalier et dans le domaine agroalimentaire.

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme, et d'autre part que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives.

De ce fait, d'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante et la capacité antimicrobienne de ces plantes par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire est nécessaire.

Etude Ethnobotanique et Toxicité.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES_BIBLIOGRAPHIQUES

A

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-Qarawi A.A., Abd_Allah E.F. et Abeer H., 2013. Effect of *Ephedra Alata* Decne. On lipids metabolism of *Aspergillus Flavus*. *Bangladesh J. Bot*, 42(1): 45-49.

Ameenah G. F., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med*, 27: 1-93.

Ammari H., Benslimani A., Rahal K. et Tali Maamar H., 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière, 4: 84.

Anderyev A.Y., Kushanareva Y.E. et Starkow A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70 : 200-214.

Arshad H., Shadma W., Iffat Z. et Sarfaraj H., 2010. Antibacterial Activity of the Leaves of *Coccinia indica* (W. and A) Wof India. *Adv. Biol. Res*, 4 (5):241-248.

Ashokvardhan T, Rajithasri A.B, Prathyusha P and Satyaprasad K, 2014. « Actinomycetes from Capsicum annum L.Rhizosphers soil have the biocontrol potentiel against pathogenic fungi ». *Int. J. Curr. Micobiol. App. Sci*3 (4), pp 894 – 903

ATATRA A et BOUHDICHE L., 2018. Etude phytochimique et Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale : *Ephédra alata alenda*. Mémoire de Master, " Immunologie Appliquée", Université 8 Mai 1945 Guelma, 65p.

Attou A., 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister." *Produits naturels : Activités biologiques et synthèses*", Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. P 93.

B

Badiaga M .,(2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat ,université de Bamako.p1.

Bannia M., Kaul G., 2015. Cereulide and diarrheal toxin contamination in milk and milk products: a systematic review. *Toxin Rev* 34, pp 119–124.

Bekkara F, Tay M, Viricel. et MIR., 1998. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of *Vicia faba*. CVS differing in their seed tannin content; and study of their seed, and root phenolic exudation [J] *Plant sou*; 2003: 27-36.

Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, *Ed. Ibis Press*, 4:764.

- Benabbou T.A., 2012.** Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens. Mémoire de magister, "Ecosystèmes microbiens complexes", Université d'Oran. P 06.
- Benhamou N., Bekkara F. et Panovska T.K., 2008.** Antioxydant ami antiniicrobial activities of the *Pistachia lentiscus* and *Pistachia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 2(2). pp. 022-028.
- Bessas A., 2008.** Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Thèse d'Ingénieur d'Etat de l'Université de Sidi Bel Abbes, p197.
- Biyiti L.F., Meko'o D.J.L., Tamzc V. and Amvam Z.P.H., 2004.** Recherche de l'activitéantibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 13: 11–20.
- Boizot N. et Charpentier J.P., 2006.** Méthode rapide d' évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d' arbre forestier, INRA-Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d' Analyses Biochimiques, Le cahier des techniques de *L' Inra*,79-82.
- 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. et Felinger A., 2010.** Détermination of polyphénolic compound by liquid chromatography-mass spectrometry in Thymus species. *J. Chromatogr. A*, 1217 :7972-7980.
- Bosn JB. M., 2015.** Chemical composition of various *Ephedra* species. *Bosn J Basic Med Sci*,15(3):21-27.
- Boudjouref M., 2011.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait d'Artemisia Campestris L.thèse de magister en biochimie .Université ferhat Abbes, Sétif, Algérie, p99.
- Brown M.D., 1999.** Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Alter,Med. Rev*, 4(5): 360-370.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation, Lavoisier, 3ème édition: 1120.
- Bruneton J., 2009.** pharmacognosie et phytochimie.plantes médicinales ,tec &Doc,lavoisier,INBS:978-2-7430-1188-8,4 eme édition.p 261 ,
- Bussmanna R.W., Sharon D., Perez F., Diaz D., Ford T., Rasheed T., Barocio Y. et Silva R., 2008.** Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. *Arnaldoa*, Vol.15, N°.1, pp. 127 – 148.
- Bussmanna R.W., Malca-Garcia G., Glenna A., Sharona D., Chaitc G., Diaz D., Pourmand K., Jonatd B., Somogye S., Guardadof G., Aguirref C., Chanf R., Meyera K., Kuhlmana A., Townesmitha A., Effio-Carbajalb J., Frias-Fernandezb F. et Benitob M., 2010.** Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J. Ethnopharmacol*, 132 :101–108.

C

Carriere A., Galinier A., Fernander Y., Carmona MC. et Penicaud L., 2006. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Med. Sci*, 22 : 47-53.

Caveny S., Charlet D.A., Freitqg H., Maier-Stolete M. et Starratt A. N., 2001. New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). *Am. J. Bot*, 88 (7): 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*, *Psudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtiluis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES microbiologie, Université de Kasdi Merbah Ouargla, p27.

Chang Y., Yang C., Sun R., Cheng Y., Kao W. and Yang P., 2013. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Scientific reports*, 3, pp 1-7.

Chebouat E., Dadamoussa B., Gharabli S., Gherraf N., Allaoui M., Cheriti A., Lahham A. et Zellagui A., 2014. Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. *Der Pharmacia Lettre*, 6 (3): 27-30.

Chemouny B., 2012. Soigner le stress par l'homéopathie et la phytothérapie. ISBN 978-2-7391-7823-7.p77

Chen W.L, Tsai T.H., Yang C.C.H. et Kuo T.B.J., 2010. Effects of *ephedra* on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *J. Ethnopharmacol*, 130: 563–568.

D

David M. Z. et Daum R. S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews* ,23(3), pp 616- 687.

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*, 205: 471–474.

Djemai Z., 2008. Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. Mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder , Batna.

E

ElGharras H., 2009. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12): 2512–2518.

Evans W. C., 2009. Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders, (16^{eme} Ed):616.

F

Favier A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'Act. Chim*,1:108-115.

Ferid L., Ibtissem H.S., Fatma Z.R., Iness B.R., Soumaya B. et Brahim M., 2012. Total phenolics, flavonoides, and antioxydant activity of Sage (*Salvia officianalis* L.) plants as Affected by différent Drying Methods. *Food bioprocess Techno*, 1:106-108.

Fuinel G., 2002. Arbres et plantes médicinales du jordan .ISBN 285157-227-X.p18.

G

Ghourri M., Zidane L. et Douira A., 2013. Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *J. Anim. Plant Sci*, 17: 2388-2411.

Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T. et Kanazaw K., 2008. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine, Free Radical. *Biol. Med*, 45: 1318-1325.

Graglia E., Jonasson S., Michelsen A. et Schmidt I.K., 2001. Effects of shading, nutrient application and warming on leaf growth and shoot densities of dwarf shrubs in two arctic-alpine plant communities, *Ecoscience* 4: 191–198.

Gramza-Michalowska A. et Czlapka-Matyasik M., 2011. Evaluation of the antiradical potential of fruit and vegetable snacks. *Acta Sci. Pol, Technol. Aliment*, 10 (1): 61-72.

Grezele P., Cerletti C., Gglielmini G., Pignatelli P., De Gaetano G. et Violi F., 2011. Effects of resveratrol and other wine polyphenol on vascular function : an update. *J. Nutr. Biochem*, 22 :201-211.

Guignard J.L., 1998. Abrégé de botanique. Masson Editions, Paris.

H

Hamlat L.N., 2006. Flavonoïdes et acides phenoliques de *Pistacia lentiscus*; Thèse de Magister, Ecole normale supérieure Kouba, Alger, p 153.

Harborne J.B. and Simmonds N.W., 1964. The natural distribution of the phenolic aglycones, in *Biochemistry of phenolic Compounds*, Harborn, J.B., Ed., Academie, NewYork.

Harborne J.B. et Williams C., 2000. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Hassine M, Aydi-Ben Abdallah R, Jabnoun-Khiareddine H et Daami-Remadi M, 2014. «Pouvoir antifongique des *Penicillium* sp. et des *Gliocladium* spp. contre *Alternaria solani* in vitro et sur fruits de tomate». *Journal of Medicinal Plants and Natural Products (TJMPNP)*, Tunis, 12 , pp9-28.

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*, 1 (8):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, pp. 16-17.

Hennebelle T., 2006. Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Thèse de doctorat, Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille I, p 304.

J

Janakat S. M., Al-Fakhiri S. M. et Sallal A. K. J., 2005. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia claveryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med. J*, 26(6): 447-450.

Jebberger N., Dietrich R., Bock S., Didier A. and Martlbauer E., 2014. Bacillus cereus enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, 77, pp 49-57.

Jensen G. B., Hansen B. M, Eilenberg J, et Mahillon. J., 2003. The hidden lifestyles of *B. cereus* and relatives. *Environ. Microbiol*, 5,. doi: 10.1046/j.1462-2920. pp 631–64.

K

Kang S, Demers J, Jimenez-Gasco M and Rep M, 2014. «*Fusarium oxysporum* ». Springer-Verlag Berlin Heidelberg (outside the USA). All rights reserved, pp 99-119.

Kebili Z., 2016. Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits d'*Ephedra alata* de la région d'Ouargla. Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah Ouargla.

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.

Khanbabaee, K., Van Ree, T., 2001. Tannins: Classification and definition, *Nat Prod Rep*, 18, 641-649.

Kim, Hee-Woong, Yunjie, Xuand. and Joon Koh., 2004. "A Comparison of Online Trust Building Factors between Potential Customers and Repeat Customers," *Journal of Association for Information Systems*, 5, 10, 392-420.

King D.E., Mainous A.G., Buchanan T.A. et Pearson W.S., 2003. C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabets Care* ; 26 : 1535-1539.

Krishna D., 2001. Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol* 33: 2- 16.

L

Lamprecht M., Greilberger J. et Oetl K., 2004. Analytical aspects of oxidantively modified substances in sport and exercises. *Nutr J*, 20 (7-8) : 728-730.

Li F., Zuo S., Yu P., Zhou B., Wang L., Liu C., Wei H. and Xu H., 2016. Distribution and expression of the enterotoxin genes of *Bacillus cereus* in food products from Jiangxi Province, China. *Food Control*, 67, pp 155-162.

Limberger R.P., Jacques A.L.B., Schmitt G.C. et Arbo M.D., 2013. Pharmacological Effects of Ephedrine. *Nat. Prod*, pp. 1218- 1237.

Lee D.S, et Lee S.H., 2001. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α - glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* 501:84-86.

Lowy F.D., 2003. Antimicrobial resistance:the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest* 2003;111:1265-1273.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K. and Biro L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biol. Venez,* 47 (1-4):119-125.

M

Ma G., Bavadekar S.A., Davis Y.M., Lalchandani S.G., Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A. et Feller D.R., 2007. Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ Adrenergic Receptor Subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther,* 322 (1): 214- 221.

Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 192 pages.

Magder S., 2006. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life, *Crit.care*, 10: 208-216.

Manuel terrestre de l'OIE., 2008. Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance: 61-71.

Markham K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Biological techniques series.

Marouf A.,Reynaud J., 2007. .La botanique de A à Z .ISBN 978-2-10 050638-5. p167.

Martone P., Estevez , J., Lu F., Ruel K., Denny M., Somerville C., Ralph J. 2009. Discovery of Lignin. *Current biology*, 19(2): 169–75.

Méar J. B, Kipnis E, Faure E, Desein R, Schurtz G, Faure K, Guery B, 2013. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association?. *Médecine et maladies infectieuses*, 43, pp 146-151.

Mohamed S. M. et Kamal Z. A., 2009. Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *J.Ethnopharmacol*, 126:102–107.

Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219.

Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. et Parajo J. C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72 :145-171.

Muthu C., Ayyanar M., Raja N. and Ignacimuthu S., 2006. Medicinal Plants Used by Traditional Healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 43-52.

N

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

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.

Newman D.J. et Cragg G.M., 2012. Natural products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J.Nat.Prod*, 75:311-335.

Nguyen minhtri M., 2007. «Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines». Thèse de doctorat. 147p.

O

Okusa N.P., 2012. Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*). Thèse de doctorat. "Sciences Pharmaceutiques", Université Libre De Bruxelles, P. 26.

Oszmianski j., Wojdylo A., Lamer-Zarawska E. et Swiader K., 2007. Antioxydant tannins from Rosaceae plant roots. *Food chem.*, 100(2) : 579-583.

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, (3^{ème} Editions. Paris:662.

P

Parsaeimehr A., Sargsyan E. et Javidnia K., 2010. A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxydant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of *Ephedra*. *Molecules*, 1 (15):1668-1678.

Patrick B., Jean L. and Michel S., 1988. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp 100-108-274.

Perry J.J., Staley J.T. et Lory S., 2004. Microbiologie. Cours et questions de révision. Dunod, 912 :98.

PFALLER M. A., MESSER S. A., KARLSSON Å. and BOLMSTROM A., 1998. Evaluation of the test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media, *J. Clin. Microbiol*, 36(9): 2586 - 2589.

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. p161.

Pietta P.G., 2000. Flavonoïdes as antioxydants. *J. Nat. Prod*, 63(7) : 1035-1042.

Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the nativemicroflora of organic Swiss chard. *Lebenson Wiss Technol*, 36: 679–684.

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

R

Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M. F. K., Aboun A. et Ammari H., 2008. Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine, selon les recommandations de l'OMS. 5ème Edition.

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.

S

Safer A.M. et Al-Nughamish A.J., 1999. Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxytoluene (BTH) in rats: An electron microscopical study. *Histol. Histopathol.* 14:391-406.

Senhaji O., Faid M., Elyachioui M. and Dehhaoui M., 2005. Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 220-229.

Sanchez-Moreno C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food. Sci. Technol. Int*, 8: 121–137.

Santelli M., 2012. Chimie bio-organique. ISBN 978-2-257-20526-1. p 299.

Shahidi B.G.H., 2004. Anti Yeast Activity of Some Plants Used in Traditional Herbal medicine of Iran. *J. Biol. Sci*, 4(2): 212-215.

Singleton V.L., Ortfer R., Lameela R. M., 1999. Analus of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In; Packer L. (ed) *Methods in enzymology. Academic press*: 152-178.

Steven P., Rachel C., Martha E., Paul H., Jane S. and Peter W.J., 2004. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. pp 71-132.

Subramanian S., Stacey G., et Yu O.,(2007) Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.* 12: 282-285.

Sylvie Meyer., Catherine R et Bosdeveix R., 2008. La botanique biologie et physiologie végétales 2ème édition. p15.

T

Tadeusz A., 2007. Alkaloids – secrets of life, Alkaloid chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, Elsevier.

Tela Botanica., 2011. La flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica – 2011.

Timmerman G.M., Frew T.J., Weeden N.F., Miller A.L. and Goulden D.S., 1994. Linkage analysis of *er-1* recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysia D.C.*). Theor Appl Genet 88 :1050-1055.

Tlili M.L., 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.

Tringali C., (2001). Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation Characterisation and Biological Properties; Ed1: TAYLOR & FRANCIS; p: 1- 24, 339- 367.

V

Vermerris W. et Nicholson R., 2006. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry. *Springer, florida USA, 15: 1-196.*

W

Wang s. y., Chen P. F., Chang., S. T., 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves againsts wood decay fungi. *Bioresour Technol*, 96 : 813-818.

Walton N. J. et Brown D. E., 1999. Chemivals from plants, Perspectives on secondary products, World Scientific. 56-66.

Wendpoulomé A.D., Kaboré., Ali Konaté., Evariste Bako., Touwendsida Serge Bagré., Sylvie Boisramé., Fathia Chandad., Alfred S Traoré., Nicolas Barro. et Lassana Sangaré., 2016. Détection d'Acinetobacter baumannii, agent pathogène opportuniste et multirésistant dans les infections bucco-dentaires à Ouagadougou, Burkina Faso, pp 105-106.

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

Y

Yan R., Jil H., Wu Y., Kerr P.G., Fang Y. et Yang L., 2012. An Investigation into the Kinetics and Mechanism of the Removal of Cyanobacteria by Extract of *Ephedra equisetina* Root. *PLoS ONE*, 7:1-8.

Yang J., Guo J. and Yuan J., 2008. In vitro antioxidant properties of rutin .LWT.41:1060-1066. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Yarnell E., 2007. Plant chemistry in veterinary medicine: Medicinal constituents and their mechanisms of action. In: veterinary herbal medicine. Mosby Elsevier edition, St Louis: 159-182.

Z

Zaika L. L., 1988. Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination. *J. Food Saf*, 9(2):97-118.

Annexes

Annexe I

Les flavonoïdes (*Ephedra major* et *Ephedra alata*).An I.1 : Rendement des extraits des différentes parties d'*Ephedra major* et d'*Ephedra* .

		Poids de matières végétales (g)	Poids de l'extrait (mg)	Concentrations de l'extrait (g/l)	Rendement R(%)
<i>Ephedra major</i>	Racine	2.0157	204.3	68.1	10.13
	Tige	2.0132	257.2	85.7	12.77
	Feuilles	2.037	655.5	218.5	32.17
<i>Ephedra alata</i>	Racine	2.0136	496.4	165.47	24.65
	Tige	2.536	215.4	71.8	10.49
	Feuilles	2.0452	724.4	241.47	35.95

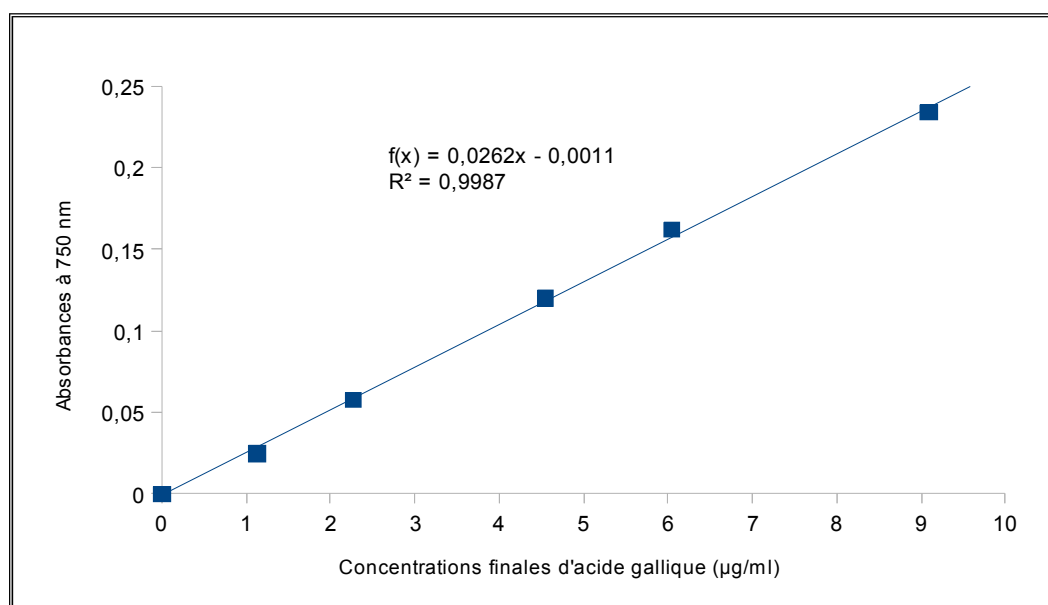
An.I.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits bruts d' *Ephedra major*.

<i>Ephedra major</i>	polyphénols <i>E. major</i> (Ex MeOH) mg GAE/g d'extrait brut	flavonoïdes <i>E. major</i> (Ex MeOH) mg EC/g d'extrait brut
Racine	220,42 ± 0,001	17.098 ± 0.002
Tige	116,36 ± 0.004	12.61 ± 0.001
Feuilles	76,514 ± 0.001	24.89 ± 0.007

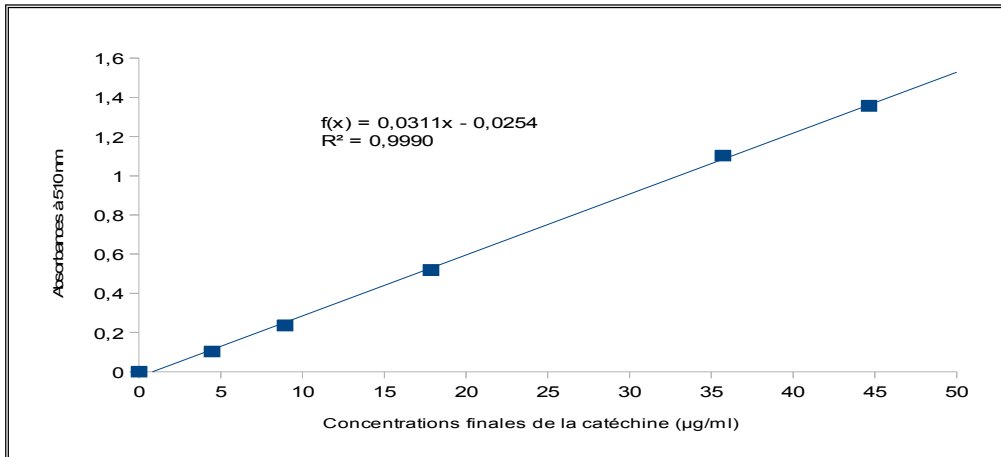
An 1.3: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits bruts d'*Ephedra alata*.

<i>Ephedra alata</i> .	Polyphénols <i>E.alata a</i> (EMeOH) mg GAE/g d'extrait brut	flavonoïdes <i>E.alata</i> (Ex MeOH) mg EC/g d'extrait brut
Racine	64.50 ± 0.004	9.29 ± 0.002
Tige	14630 ± 0.003	27.42 ± 0.003
Feuilles	67.26 ± 0.002	27.3 ± 0.006

**An 1.4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.
(A = 0,0262, B = 0,0011, R² = 0,9987).**



An I.5 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.



Annexe II

An II.1 : Activité des antibiotiques vis-à-vis les souches bactériennes (le diamètre de la zone d'inhibition en mm).

Les souches						
Antibiotiques	<i>E.coli</i>	<i>St.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginos</i>	AC	DMSO
AML2	18 ± 0.5	32 ± 0.00	06 ± 0.00	29.5 ± 0.5	6 ± 0.00	6
P1	06 ± 0.00	31 ± 0.00	06 ± 0.00	23 ± 1	6 ± 0.00	6
VA	06 ± 0.00	14 ± 0.5	12 ± 0.00	21 ± 0.00	6 ± 0.00	6

An II.2 : diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques vis-vis des souches fongiques et les levures (le diamètre de la zone d'inhibition en mm).

Levures et champignons	Nystatine	DMSO
<i>Candida albican</i>	30 ± 0.00	06
<i>Fusarium oxysporum</i>	16.5 ± 0.00	06
<i>pénicillium s</i>	0.00	06

Annexe III: L'activité antioxydante

An III.1: L'activité antioxydante des extraits d' *E.major* organiques vis-vis du piégeage du radical libre DPPH.

<i>E.major</i>	Extraits flavoniques	Concentration mg /ml	Densité optique (DO + E)	% Inhibition
Racine <i>E.maj</i>	Extrait brut	6.81	0.186±0.002	69.10
		3.405	0.301±0.002	49.97
		0.681	0.493±0.002	18.13
		0.3405	0.520±0.009	13.70
		0.1702	0.557±0.004	1.62
	Extrait Acétate d'éthyle	1.0833	0.191±0.005	70.33
		0.5416	0.353±0.001	45.30
		0.1083	0.542±0.003	15.99
		0.05416	0.590±0.004	8.56
		0.02708	0.609±0.004	5.62
	Extrait n-Butanol	3.1033	0.471±0.011	26.64
		1.5516	0.558±0.002	13.11
		0.3103	0.627±0.0009	2.48
		0.1551	0.633±0.001	1.50
		0.0775	0.643±0.0002	0.10
Tige <i>E.maj</i>	Extrait brut	8.87	0.124±0.006	73.56
		4.285	0.237±0.004	49.46
		0.857	0.408±±0.002	13.006
		0.4285	0.422±0.005	9.95
		0.21425	0.456±0.0049	2.77
	Extrait Acétate d'éthyle	1.9833	0.0464±0.003	27.23
		0.9916	0.538±0.001	15.52
		0.1983	0.608±0.001	4.65
		0.0991	0.627±0.003	1.62
		0.0495	0.636±0.004	0.15
	Extrait n-Butanol	3.95	0.474±0.0009	27.04
		1.975	0.553±0.002	14.95

		0.395	0.631±0.003	3.02
		0.1975	0.632±0.002	2.81
		0.0987	0.640±0.002	1.58
Feuilles <i>E.maj</i>	Extrait brut	21.85	0.071±0.0009	85.09
		10.925	0.076±0.002	84.04
		2.185	0.259±0.006	45.55
		1.0925	0.339±0.006	28.68
		0.54625	0.401±0.001	15.80
	Extrait Acétate d'éthyle	11.75	0.212±0.0008	66.71
		5.875	0.367±0.002	42.38
		1.175	0.560±0.004	12.03
		0.5875	0.588±0.006	7.69
		0.2937	0.618±0.005	2.98
	Extrait n-Butanol	10.35	0.162±0.001	74.94
		5.175	0.338±0.001	47.84
		1.035	0.564±0.0009	13.09
		0.5175	0.607±0.0007	6.41
		0.25875	0.625±0.0009	3.69
		0.5	0.89± 0.00	5.82
		1	0.82± 0.00	13.55
		1.5	0.76± 0.00	19.32
	Acid ascorbique	2	0.66± 0.01	29.97
		2.5	0.062± 0.02	34.62
		5	0.32± 0.02	65.72
		10	0.07± 0.00	91.84

An III 2 : L'activité antioxydante des extraits organiques d' *E. alata* vis-vis du piégeage du radicale libre DPPH.

<i>E. alata</i>	Extraits flavoniques	Concentration mg /ml	Densité optique (DO + E)	% Inhibition
Racine <i>E.alata</i>	Extrait brut	16.56	0.159±0.003	78.13
		8.273	0.300±0.01	58.87
		1.654	0.598±0.001	18.02
		0.827	0.657±0.002	9.99
		0.413	0.693±0.002	5.06
	Extrait Acétate d'éthyle	2.673	0.126±0.003	80.20
		1.336	0.256±0.002	60
		0.267	0.519±0.003	18.85
		0.133	0.568±0.0007	11.14
		0.066	0.607±0.001	5.10
	Extrait n-Butanol	2.353	0.333±0.006	46.98
		1.176	0.459±0.001	26.95
		0.235	0.578±0.002	8.10
		0.117	0.579±0.001	5.13
		0.058	0.607±0.001	3.49
Tige <i>E.alata</i>	Extrait brut	7.18	0.078±0.002	89.01
		3.59	0.089±0.001	87.52
		1.436	0.317±0.002	55.67
		0.359	0.615±1.734	14.01
		0.1795	0.668±1.734	6.65
	Extrait Acétate d'éthyle	1.843	0.252±0.001	59.74
		0.921	0.374±0.001	40.20
		0.184	0.569±0.0007	8.99
		0.092	0.605±0.002	3.24
		0.046	0.623±0.005	0.42
	Extrait n-Butanol	2.933	0.260±0.003	58.14
		1.466	0.418±0.0007	32.69
		0.293	0.573±0.002	7.82

		0.1466	0.611±0.001	1.71
		0.0733	0.622±0.002	0.96
	Extrait brut	24.146	0.0386±0.0007	93.62
		12.073	0.0443±0.001	92.69
		2.4146	0.0513±0.001	91.54
Feuilles <i>E.alata</i>		1.2073	0.1283±0.01	78.85
		0.6036	0.3473±0.005	42.77
	Extrait Acétate d'éthyle	4.63	0.077±0.005	88.57
		2.315	0.139±0.003	79.55
		0.926	0.414±0.02	39.01
		0.463	0.510±0.001	24.90
		0.2315	0.588±0.011	13.48
	Extrait n-Butanol	4.606	0.067±0.002	89.58
		2.303	0.151±0.004	76.64
		1.1516	0.321±0.01	50.02
		0.460	0.489±0.002	23.89
		0.230	0.553±0.001	13.99
		0.115	0.585±0.0009	9.02
	Acid ascorbique	0.5	0.89± 0.00	5.82
1		0.82± 0.00	13.55	
1.5		0.76± 0.00	19.32	
2		0.66± 0.01	29.97	
2.5		0.62± 0.00	34.62	
5		0.32± 0.02	65.72	
10		0.07± 0.00	91.84	