



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



MEMOIRE DE MASTER

Département: Biologie Des Etres vivants

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences biologiques

Option: Biotechnologie des plantes médicinales

Thème

**Etude du contenu polyphénolique d' *Ephedra alata*
Decne. et de l'activité antioxydante par différentes
méthodes d'extraction**

Présenté par
MESSADIA Samir

Membres du jury:

Souahi Hana
Hioun Soraya
Neffar Souad

MCB Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
MAA Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
MCA Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Présidente
Rapporteur
Examinatrice

Date de soutenance: **31Mai 2017**

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore algérienne et surtout les plantes sahariennes, on s'est intéressé à l'étude d'une plante médicinale, *Ephedra alata*. Le but de ce travail est de comparé les teneurs polyphénolique et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits obtenus par trois méthodes d'extraction, la décoction, l'infusion et la macération.

Les extraits des tiges d'*Ephedra alata* obtenus par décoction ont donnés les résultats les plus élevés pour, les polyphénols avec 58.37 ± 2.31 mg EAG/g MS, en anthocyanes avec 36.18 ± 6.76 mg/ml, en flavonoïdes avec 6.24 ± 1.86 mg ECAT/g MS et en flavonoïdes aglycones avec des teneurs de 8.54 ± 1.05 mg ECAT/g MS. Les meilleurs teneurs obtenues pour les tanins sont obtenues par decoction avec 0.30 ± 0.04 mg EAT/g MS.

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits d'*Ephedra alata* par le test de DPPH et par le pouvoir réducteur de fer (FRAP) concorde avec les résultats des polyphenols avec une bonne activité antioxydante par décoction suivie par infusion et macération.

Mots clés: *Ephedra alata*, polyphénols, DPPH, FRAP, méthodes d'extraction.

Abstract

In the context of the valorization of medicinal plants of the Algerian flora and especially the Saharan plants, we were interested in the study of a medicinal plant, *Ephedra alata*. The purpose of this work is to compare the polyphenolic contents and to evaluate the antioxidant activity of extracts obtained by three methods of extraction, decoction, infusion and maceration.

The extracts from *Ephedra alata* stems obtained by decoction gave the highest results for polyphenols with 58.37 ± 2.31 mg EAG / g MS, anthocyanins with 36.18 ± 6.76 mg / ml, flavonoids with 6.24 ± 1.86 mg ECAT / G MS and flavonoids aglycones with grades of 8.54 ± 1.05 mg ECAT / g MS. The best grades obtained for tannins are obtained by decoction with 0.30 ± 0.04 mg EAT / g MS.

The evaluation of the antioxidant activity of the various extracts of *Ephedra alata* by the DPPH test and by the iron reducing power (FRAP) agrees with the results of the polyphenols with a good antioxidant activity by decoction followed by infusion and maceration.

Key words: *Ephedra alata*, polyphenols, DPPH, FRAP, extraction methods.

الملخص

في اطار تّثمين النباتات الطبية الجزائرية وخاصة النباتات الصحراوية، اهتمنا في هذه الدراسة بنبّنة العنّدة *Ephedra alata*. وكان الغرض من هذه الدراسة هو مقارنة محتويات البوليفينول وتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات التي تم الحصول عليها عن طريق الاستخراج بثلاث طرق: الغلي والصب والنقع.

كشفت التحاليل الكمية ثراء سيقان الإيفيدرا بالبوليفينول، الانثوسيانين، الفلافونويد الفلافونويد اللاسكري مع محتويات 2.31 ± 58.37 ملغ مكافئ حمض الغاليك، 36.18 ± 6.76 ملغ / مل ، 1.86 ± 6.24 ملغ مكافئ الكاتشين و 1.05 ± 8.54 ملغ مكافئ الكاتشين على التوالي وتم الحصول على أفضل مستويات التانينات بواسطة طريقة الغلي بمحتوى مقدر ب 0.30 ± 0.04 ملغ مكافئ حمض التانيك.

تقييم النشاط المضاد للأكسدة من مستخلصات مختلفة من العنّدة من قبل اختبار DPPH و FRAP يتفق مع نتائج مادة البوليفينول المضادة للأكسدة مع نشاط جيد لمستخلص الغلي الذي يليه مستخلص النقع ثم الصب.

كلمات البحث: عنّدة، بوليفينول، DPPH ، FRAP ، النشاط المضاد للأكسدة . طرق

الاستخلاص

	page
Résumé	i
Abstract.....	ii
المخلص	iii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction générale	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
1. Les polyphénols	3
1.1. Définition	3
1.2. Biosynthèse des polyphénols	3
1.2.1. Voie de l'acide shikimique	3
1.2.2. Voie de phénylpropanoïde	4
1.3. Classification des polyphénols	4
1.3.1. Polyphénols non-flavonoïdes	4
1.3.1.1. Phénols simples	4
1.3.1.2. Acides phénoliques	4
✓ Acide phénols dérivés d'acide benzoïque	5
✓ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique.....	5
1.3.1.3. Stilbènes	6
1.3.1.4. Coumarines	6
1.3.1.5. Lignines	6
1.3.1.6. Quinones	7
1.3.2. Les Flavonoïdes	8
1.3.2.1. Flavanones	10
1.3.2.2. Flavonols	10
1.3.2.3. Flavones	10
1.3.2.4. Flavan-3-ols ou flavanols	10
1.3.2.5. Isoflavones	10
1.3.2.6. Anthocyanes	11
1.3.3. Polyphénols sous forme de polymères	11

1.3.3.1. Tanins	11
a. Tanins hydrolysables.....	11
b. Tanins condensées	12
2. Méthodes d'extraction	13
2.1. Les différents modes de préparation des plantes	13
2.2. Facteurs influençant les performances de l'extraction	13
2.2.1. Taille des particules	13
2.2.2. La nature du solvant	14
2.2.3. La température	14
2.2.4. Temps d'extraction	15
2.2.5. Degré d'agitation	15
3. Généralités sur la plante <i>Ephedra alata</i> Decne	16
3.1. Description botanique	16
3.2. Classification d'<i>Ephedra alata</i> Decne	17
3.3. Chimie de la plante	17
3.4. Utilisations traditionnelles	18
3.5. Toxicologie	19
3.6. Pharmacologie	19
3.7. Travaux antérieurs	20
3.7.1. Activité antimicrobienne	20
3.7.2. Effet sur la masse corporelle	20
3.7.3. Effet hypoglycémiant	20
3.7.4. Effet anti-inflammatoire	20
3.7.5. Action sur la pression artérielle	21
4. Activité antioxydante	22
4.1. Stress oxydatif	22
4.1.1. Définition	22
4.1.2. Radicaux libres	22
4.1.3. Nature des radicaux libres	22
4.1.3.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)	22
4.1.3.2. Espèces libres non oxygénées	23
4.1.4. Cibles cellulaires de l'ERO	23
4.1.4.1. Peroxydation lipidique	24

4.1.4.2. Oxydation des protéines.....	24
4.1.4.3. Dommages de l'ADN.....	24
4.1.5. Maladies liées au stress oxydant.....	25
4.2. Antioxydants.....	25
4.2.1. Définition.....	25
4.2.2. Antioxydants naturels ou exogènes.....	25
4.2.2.1. Composés phénoliques	25
4.2.2.2. Vitamine E (tocophérol)	26
4.2.2.3. Vitamine C (Acide ascorbique)	26
4.2.2.4. Vitamine A (rétinoïdes)	26
4.2.2.5. Caroténoïdes.....	27
4.2.2.6. Oligoéléments.....	27
4.2.3. Antioxydants endogènes	27
4.2.4. Antioxydants enzymatiques.....	27
4.2.4.1. Superoxyde dismutase.....	27
4.2.4.1.1. Catalase.....	28
4.2.4.1.2. Glutathion peroxydase	28
4.2.5. Antioxydants non enzymatiques.....	28

Chapitre II: Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal.....	29
2. Présentation du site de récolte.....	29
3. Tests phytochimiques préliminaires.....	30
3.1. Mise en évidence des flavonoïdes et des leucoanthocyanes.....	30
3.2. Mise en évidence des quinones.....	30
3.3. Mise en évidence des anthocyanes.....	30
3.4. Mise en évidence des coumarines.....	30
3.5. Mise en évidence des tanins.....	31
3.6. Mise en évidence de saponines.....	31
3.7. Mise en évidence des Terpenoïdes et des stéroïdes	31
3.8. Mise en évidence des alcaloïdes	31
4. Teneur en cendres et en matière organique.....	32
5. Extractions et rendements des composés phénoliques	32
5.1. Teneur en substances extractibles par l'eau.....	32

5.2. Teneur en substances extractibles par l'éthanol.....	32
5.3. Méthodes d'extraction.....	33
5.4. Rendement d'extraction des polyphénols.....	33
5.5. Extraction et Récupération de l'extrait brut.....	34
5.5.1. Macération et récupération de l'extrait brut.....	34
5.5.2. Décoction et récupération de l'extrait brut.....	35
5.5.3. Infusion et récupération de l'extrait brut.....	36
5.6. Affrontements.....	37
6. Dosages.....	37
6.1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
6.2. Dosage des flavonoïdes	37
6.3. Dosage des flavonoïdes aglycones.....	38
6.4. Dosage des anthocyanes.....	38
6.5. Dosage des Tanins condensés.....	38
7. Evolution de l'activité antiradicalaire.....	39
7.1. Méthode DPPH.....	39
7.2. Méthodes FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)	40
8. Traitement statistique.....	42

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Résultats.....	43
1.1. Criblage phytochimique.....	43
1.2. Méthodes analytiques.....	44
1.2.1. Teneur en matière organique et en cendre	44
1.3. Extractions	44
1.3.1. Teneur en substances extractibles par l'eau ou éthanol	44
1.3.2. Rendements des extraits bruts.....	45
1.4. Dosages des composés phénoliques.....	46
1.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	46
1.4.2. Dosage des flavonoïdes	47
1.4.3. Dosage des flavonoïdes aglycones.....	48
1.4.4. Dosage des anthocyanes.....	49
1.4.5. Dosage des tanins condensés.....	50
1.5. Activités antioxydantes.....	51

1.5.1. L'activité antioxydant au DPPH.....	51
1.5.2. Réduction de fer FRAP	54
2. Discussion et Conclusion	56
Références bibliographiques.....	62
Annexes.....	79

Liste des figures	Page
Figure 01: Voie de synthèse des flavonoïdes du raisin à partir de l'acide aminé phénylamine	3
Figure 02: Structure chimique de stilbène	6
Figure 03: Structure chimique de lignine.....	7
Figure 04 : Structures chimiques de quinines	7
Figure 05: formation d'hétérocycle d'un flavonoïde	8
Figure 06: Structure générale de tanins hydrolysable	12
Figure 07: Structure générale de tanins condensés	12
Figure 08 : Arbuste <i>Ephedra alata</i>	16
Figure 09: Branches fleuries d' <i>Ephedra alata</i>	17
A: Fleurs mâles d <i>E. alata</i>	17
B: Fleurs femelles d <i>E. alata</i>	17
Figure 10: Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR	23
Figure 11: Situation géographique du site de récolte	29
Figure 12: Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par macération	35
Figure 13 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par décoction	36
Figure 14 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par infusion	37
Figure 15: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH•entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	39
Figure 16: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).	40
Figure 17 : Rendements des extraits méthanoliques bruts au niveau des tiges de la plante <i>E. alata</i>	45
Figure 18 : Teneurs en polyphénols totaux de trios extraits méthanoliques d' <i>Ephedra alata</i>	46
Figure 19 : Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques par différentes méthodes d'extraction d' <i>Ephedra alata</i>	47
Figure 20: Teneurs en flavonoïdes aglycones de trios extraits méthanoliques d' <i>E. alata</i>	48
Figure 21: Teneur en anthocyanes des trois extraits méthanoliques d' <i>Ephedra alata</i>	49
Figure 22: Teneurs en tannins condensés pour les trois méthodes d'extraction de extrait méthanolique d' <i>E. alata</i>	51

Figure 23: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait de la macération, décoction et infusion.	53
Figure 27 : Pouvoir réducteur de fer des extraits méthanoliques bruts de <i>E. alata</i>	55

Liste des tableaux

	Page
Tableau 01: Structure des squelettes des polyphénols.....	4
Tableau 02: Les dérivés de l'acide benzoïque.....	5
Tableau 03: Les dérivés de l'acide cinnamique.....	5
Tableau 04: Classes des flavonoïdes.....	9
Tableau 05 : Tests phytochimiques sur les tiges d' <i>Ephedra alata</i>	43
Tableau 06: Teneurs en matière organique et en matière minérale des tiges de la plante <i>E. alata</i>	44
Tableau 07: Teneur en substances extractibles par l'eau ou éthanol des tiges d' <i>Ephedra. Alata</i>	44
Tableau 08 : Analyse de la variance de en substances extractibles par l'eau ou éthanol des tiges de la plante <i>E. alata</i>	44
Tableau 9 : Analyse de la variance de Rendements des extraits méthanoliques bruts des tiges de la plante <i>E. alata</i>	45
Tableau 10: Analyse de la variance des résultats du dosage des polyphénols totaux des tiges de la plante <i>E. alata</i>	46
Tableau 11 : Analyse de la variance des résultats du dosage des flavonoïdes des tiges de la plante <i>E. alata</i>	48
Tableau 12: Analyse de la variance des flavonoïdes aglycones des trois méthodes d'extraction chez les tiges de la plante <i>E. alata</i>	49
Tableau 13 : Analyse de la variance des résultats du dosage des anthocyanes des tiges de la plante <i>E. alata</i>	50
Tableau 14 : ANOVA des résultats du dosage des anthocyanes des tiges de la plante <i>E. alata</i>	51
Tableau 15: comparaison de l'IC ₅₀ des extraits des tiges d' <i>Ephedra alata</i>	52
Tableau 16 : Analyse de la variance de pourcentages d'inhibitions des extrait des tiges de la plante <i>E. alata</i>	54
Tableau 17: Analyse de la variance pouvoir réducteur de fer des extraits méthanoliques bruts de <i>E. alata</i>	55

Liste des abbreviations

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
1O₂	Oxygène singulier
4-HNE	4-hydroxynonenal
AA	Acide ascorbique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGPI	acides gras polyinsaturés
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
ANOVA	Analyse de la variance
C	Carbone
C4H	cinnamate4-hydroxylase
CAT	Catalase
Cu²⁺	Ion cuivre
DCM	dichlorométhane
DO	Densité optique
DPPH	2, 2-diphényl- 1 –picrylhydrazyl
E	Equivalent
EAG	Equivalents de l'acide gallique
<i>E. alata</i>	<i>Ephedra alata</i>
EOB	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
ERO	espèces réactives oxygénées
Fe²⁺	Ions ferreux
FeCl₃	Chlorure ferrique
Fig.	Figure
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
g	Gramme
g/l	Gramme par litre
GPx	Glutathion peroxydase
GPx	la glutathion peroxydase
H	Hydrogène
H₂O	Eau distillée
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HOCl	Acide hypochlorique
HSV	Herpes simplex virus
IC₅₀	Concentration inhibitrice 50%
K₂CrO₃	Chrome de potassium
M	Molaire

MDA	malondialdéhyde
MeOH	Méthanol
mg EAG	Milligramme équivalent acide gallique
mg EAT	Milligramme équivalent acide tannique
mg ECAT	Milligramme équivalent catechene
mg	Milligramme
ml	millilitre
mn	Minute
MS	Matière Sèche
N	Normalité
N	Molécule d'azote
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
NO•	Monoxyde d'azote
O	oxygène
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OCH₃	groupe methoxyl
OH	Hydroxyl
OH•	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻	Peroxynitrite
PAL	phénylalanine ammonia-Lyase
R	Radical
SNC	système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
Tab.	Tableau
TBARS	acides thiobarbiturique
UV	Ultrat Violet
V/V	Volume / Volume

Introduction

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques (**Machies et al., 2005**).

Parmi ces métabolites secondaires on trouve essentiellement les composés phénoliques ou polyphénols qui sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois (**Boizot et Charpentier, 2006**).

L'extraction des extraits bruts, naturels de ces composés à partir des plantes s'effectue selon de nombreuses méthodes telles que la macération, la décoction et l'infusion, ces composés utilisés en médecine traditionnelle, peuvent être des ressources de nouveaux médicaments (**Karmakar et al., 2011**). Cette extraction a pour objectifs d'évaluer les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telle que les pathologie du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddour et al. 2007**).

La flore algérienne regorge d'espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques (**Bnouhamet al, 2002**). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce *Ephedra alata*, une plante largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie notamment au sud de pays.

L'objectif de notre travail est de déterminer les teneurs des composés phénoliques par trois méthodes d'extractions et d'évaluer leurs activités antioxydant, pour cela notre étude englobe deux aspect: dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction par trois méthodes et la quantification des composés phénolique s (polyphénols, les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins)

Le second aspect est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par évaluation du pouvoir piègeur (scavenger) des extraits vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH) et par réduction de fer (FRAP).

Chapitre I: Synthèse bibliographique

1. Les polyphénols

1.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolite secondaire des végétaux regroupe un vaste ensemble Plus de 8000 structures phénoliques ont été signalées et elles sont largement dispersées dans tout le royaume des plantes (**Strack, 1997**), divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence d'au moins d'une cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (**Lefébure, 1999**) ou engagé dans une autre fonction tels que: éther, ester, hétéroside...etc (**Bruneton, 1999**) ils sont sensibles à l'oxydation. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (**Gorham, 1977**).

1.2. Biosynthèse des polyphénols

Phénylalanine et tyrosine sont des acides aminés aromatiques présentes dans les protéines mais aussi considéré comme l'origine de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux. La biosynthèse de ces composés est passe par deux grandes voies :

1.2.1. Voie de l'acide shikimique

Cette voie est caractérisée par la désamination des phénylalanines pour former les précurseurs immédiats des phénols. La forme active des acides hydroxycinnamiques qui forme par la séquence des phénylpropanoïdes avec la coenzyme à permettent d'accéder aux principales classes des composé phénoliques. Citons quelques transformations (**Gomez, 2009**):

- Vers les acides de la séries benzoïques (acides gallique, protocatéchique...) par b-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques)
- Vers les esters de type chlorogéniques par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartirique, shikimique...)
- Vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations; prénylation...)
- Vers les lignines par réduction, formation de monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases.

1.2.2. La voie de phénylpropanoïde

Cette voie utilise la phénylalanine comme précurseur pour former les principaux acides phénoliques simples tels que les coumarines, les isoflavonoïdes, les acides salicylique et les précurseurs de lignine qui est le second biopolymère le plus important après la cellulose (Fig. 01).

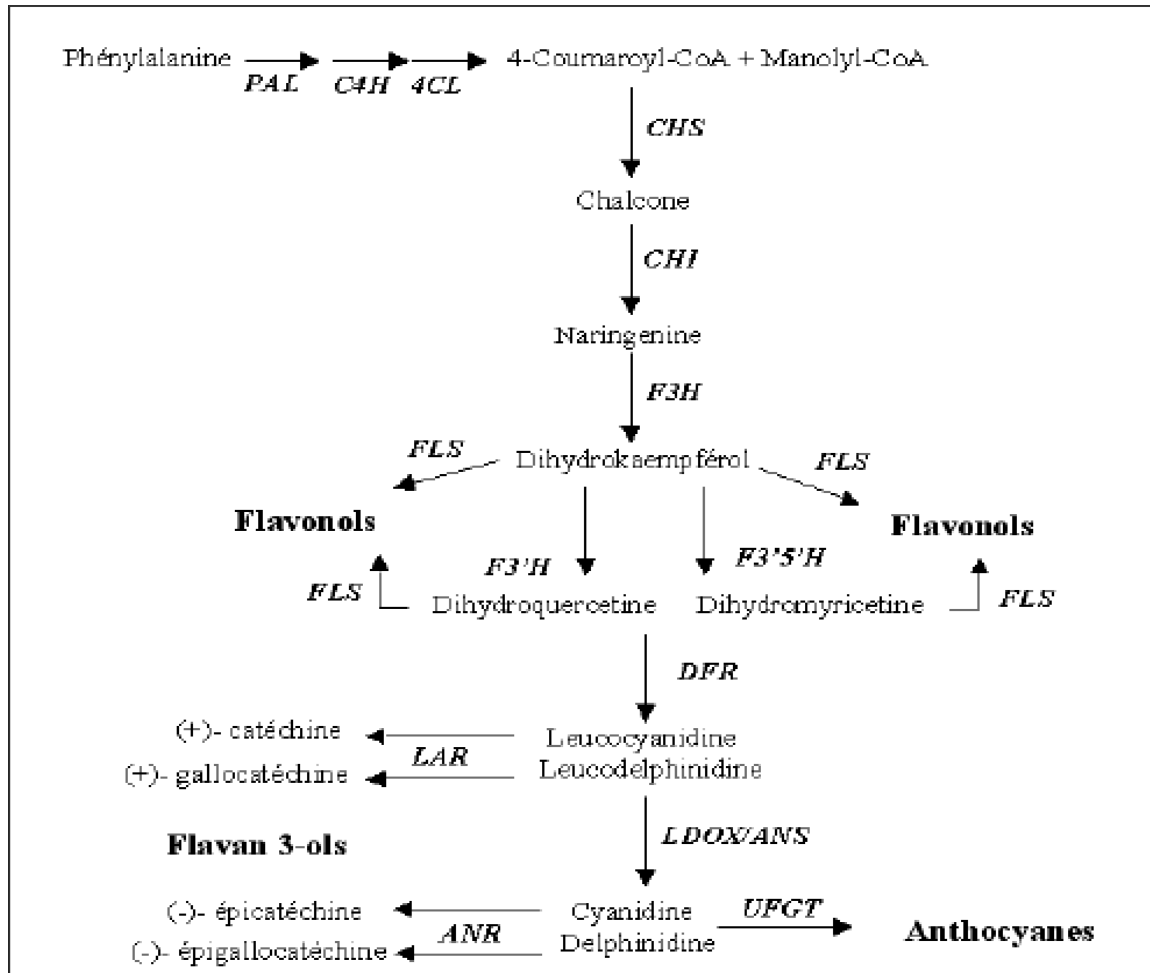

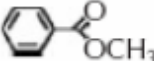
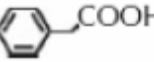
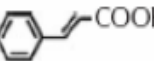
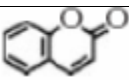
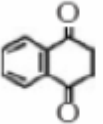
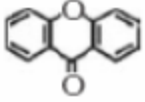
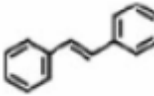
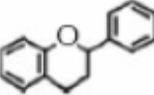


Figure 01: Voie de synthèse des flavonoïdes du raisin à partir de l'acide aminé phénylalanine (d'après Gomez, 2009).

1.3. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont des composés simples, à faible poids moléculaire, à anneaux aromatiques simples à des tanins grands et complexes et à des polyphénols dérivés. Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'agencement de leurs atomes de carbone (Tab. 01) et sont communément conjugués aux sucres et aux acides organiques. Les phénoliques peuvent être classés en deux groupes: les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Crozier *et al.*, 2008).

Tableau 1: Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2008).

Nomre de carbones	squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide - hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide - coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

1.3.1. Les Polyphénols non-flavonoïdes

1.3.1.1. Phénols simples

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

1.3.1.2. Acides phénoliques

Le composant principal des acides phénoliques est l'acide gallique son nom est dérive du mot galle, ce qui signifie un gonflement dans le tissu d'une plante après une

attaque par des insectes parasites (Gross, 1992). Ils sont répartie en deux classes (Pandey et Rizvi, 2009):

✓ **Acide phénols dérivés d'acide benzoïque**

Sont des hydroxybenzoïques de structure générale de type (C6-C1) (Tab 02), ils sont sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar, 2012). Les plus fréquents sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

Tableau 02: Les dérivés de l'acide benzoïque (Pawlowska *et al.*, 2006).

	R1	R2	R3	R4	Formule
Acide parahydroxybenzoïque	H	H	OH	H	
acide protocatéchique	H	OH	OH	H	
acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H	
acide gallique	H	OH	OH	OH	
acide syringique (en)	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	
acide salicylique	OH	H	H	H	
acide gentisique	OH	H	H	OH	

✓ **Acide phénols dérivés d'acide cinnamique**

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (Tab. 03) sont souvent estérifiés. La majorité sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide synaptique (Haslam, 1994).

Tableau 03: Les dérivés de l'acide cinnamique (Gorham, 1977).

	R1	R2	R3	Formule
acide paracoumarique	H	OH	H	
acide caféique	OH	OH	H	
acide férulique	OCH ₃	OH	H	
acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃	
E-anéthole	H	OCH ₃	H	
acide 3,4-diméthoxycinnamique	OCH ₃	OCH ₃	H	

1.3.1.3. Stilbènes

Sont des composés phénoliques possédant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison (Fig. 02), le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress et, en cas d'attaque par des agents pathogènes fongiques, bactériens et viraux (**Burns et al., 2002**). Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes oxydase et les peroxydases (**Perret, 2001**).

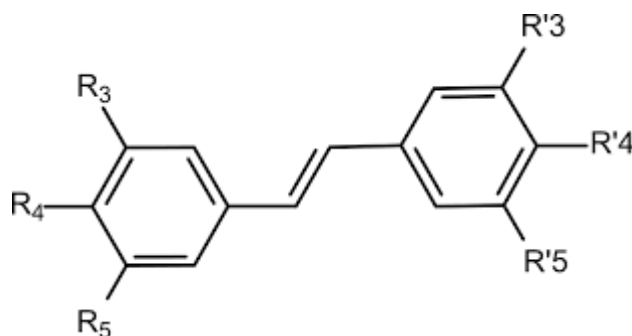


Figure 02: Structure chimique de stilbène (**Perret, 2001**).

1.3.1.4. Coumarines

La famille des coumarines est formée des composés phénoliques dérivés de la coumarine simple, la 2H-1-benzopyrane-2-one, molécule elle-même dénuée de groupe hydroxyle phénolique OH. Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique (**Benayache, 2005**). Elles se trouvent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (**Bruneton, 1999**).

La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques, bactériostatiques et anti fongiques. Ils ont un effet anti- œdémateux (**Hoult et Paya, 1996**).

1.3.1.5. Lignines

Les lignines sont le polymère biosource aromatique naturel le plus abondant sur Terre (**Privas, 2013**), elle constitue de 15 à 40% de la matière sèche des arbres et de 5 à 20% des tiges des plantes annuelles. Éprouvant les contraintes de la gravité, la lignine est apparue afin notamment de rigidifier les parois cellulaires (**Cruz et al., 2001**).

Les lignines jouent un rôle dans l'évolution des végétaux, ils forment une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores, la

lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure (Murray *et al.*, 1982).

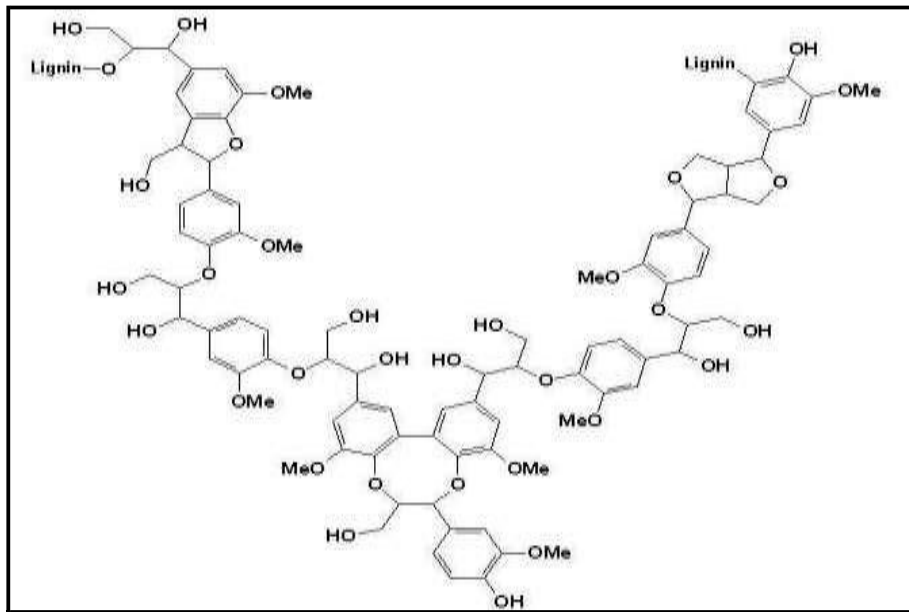
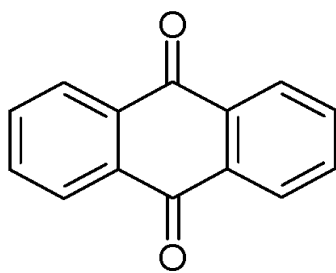


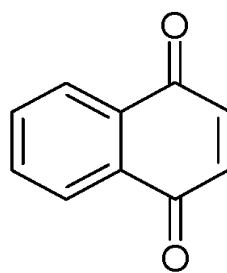
Figure 03: Structure chimique de lignine (Scalbert et Williamson, 2000).

1.3.1.6. Quinones

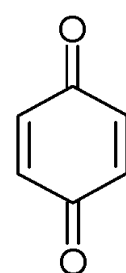
Les quinones sont des transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale interne et dans la membrane des thylakoïdes (Peters *et al.*, 2005). Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques (Fig 04). Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Bruneton, 1993). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).



anthraquinone



naphthoquinone



benzoquinone

Figure 04 : Structures chimiques de quinones (Peters *et al.*, 2005).

1.3.2. Les Flavonoïdes

C'est la famille la plus répandue des composés phénoliques, elles présentent des structures chimiques diverses et des caractéristiques propres (**Benhammou, 2012**). plus de 4000 composés flavoniques sont connus (**Fang *et al.*, 2007**). Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux, ces composés se trouvent sous forme libre dite aglycone ou liée à des oses et autres substances forme d'hétérosides (**Heller *et al.*, 1994**). Ayants une origine biosynthétique commune et un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) relié entre eux par une chaîne en C3 qui peut muter en un hétérocycle (Cycle C) (Fig.05) cette structure est nommée 2- phényl-benzopyrone (**Bourzeix *et al.*, 1986 ; Perret, 2001**).

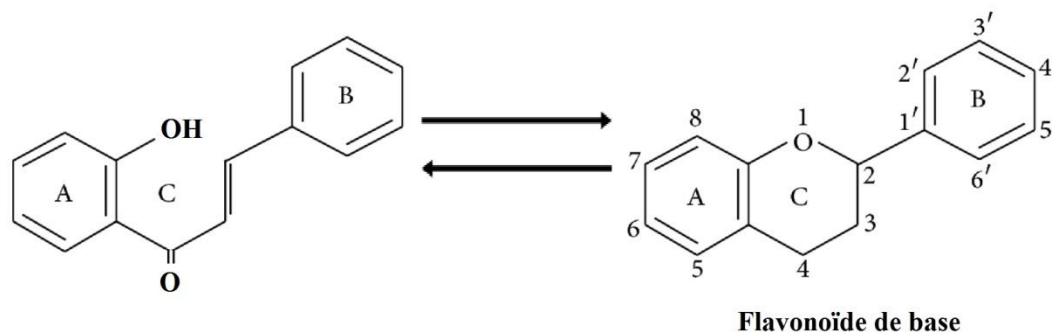
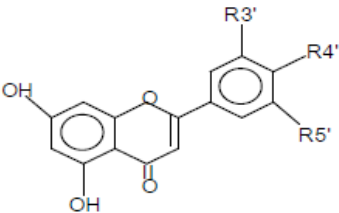
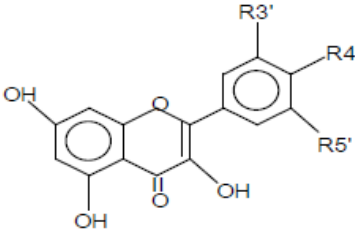
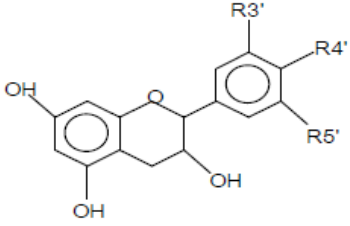
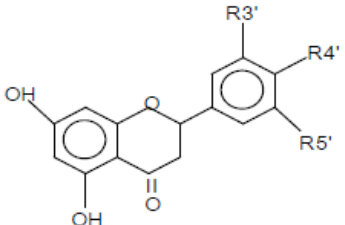
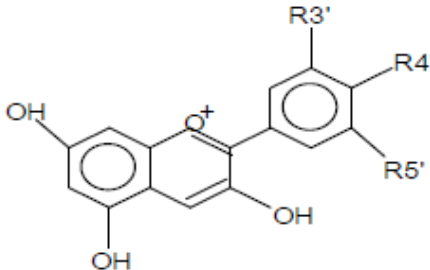
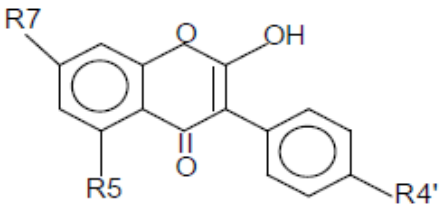


Figure 05: formation d'hétérocycle d'un flavonoïde (**Heller *et al.*, 1994**).

La nature chimique des flavonoïdes est basé sur leur classe structurale, leur degré d'hydroxylation et de méthylation, leur degré de polymérisation, leur substitutions et leur conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (**Yao *et al.*, 2004**).

Ils se divisent en plusieurs classes comprenant les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes (**Cseke *et al.*, 2016**). La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (**Afanas'eva *et al.*, 2001**). Les plus importants sont classés dans le tableau (04).

Tableau 04: Classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; Erdman *et al.*, 2007)

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

1.3.2.1. Flavanones

Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence des centres d'asymétrie en position 2 (**Bruneton, 1999**). Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée (**Portet, 2007**). La principale source des flavanones reste les agrumes (Les agrumes incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarins et les clémentines)

1.3.2.2. Flavonols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, elles sont caractérisés par couleur varie du blanc au jaune (**Fraga, 2009**), Leur structure est présenter double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (**Heller et al., 1998; Richter, 1993**) elles sont essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Parmi les flavonols on a la quercétine, le kaempférol et la myricétine (**Mazza et Gao, 2005**).

1.3.2.3. Flavones

Les flavones sont différent aux flavonols par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (**Heller et al., 1998**), dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7 (**Bruneton, 1999**). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible (**Fraga, 2009**).

1.3.2.4. Flavan-3-ols ou flavanols

Les flavan-3-ols sont la sous-classe la plus complexe de flavonoïdes allant du simple Monomères (+) - catéchine et son isomère (-) – épicatechine (**Crozier et al., 2008**). Elles se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 et toujours hydroxylées en C3. (**Fraga, 2009**). Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... etc (**Del Rio et al., 2010**).

1.3.2.5. Isoflavones

Les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2 (**Heller et al., 1998; Bruneton, 1999**). Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes Les isoflavones représentent une sous-classe importante et très distinctive (**Bouheroum, 2007**).

1.3.2.6. Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments très répandues dans tout le règne végétal (**Hong *et al.*, 2003**), ce qui est particulièrement évident dans les tissus de fruits et de fleurs où elles sont responsables des couleurs rouge, bleu et violet (**Crozier *et al.*, 2008**).

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués d'où l'absorption de lumière visible (**Gomez , 2009**).

1.3.3. Polyphénols sous forme de polymères

1.3.3.1. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes hydrosolubles synthétisée par les plantes, possèdent un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (**Kamra *et al.*, 2006**). ils sont caractérisent par leur facilité à se coordonner aux protéines (**Makkar, 2003; Mangan, 1988; Mcsweeney *et al.*, 2001**) Grace à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques (**Khenaka, 2011**), Aussi à d'autre polymères organiques comme des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables (**Haslam, 1998**).

Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les *conifères*, les *Fagacée*, les *Rosacée* (**Ghestem *et al.*, 2001**). Ils peuvent trouver dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains (**Khanbabaee et Ree, 2001**). En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts selon le type de l'acide phénolique et le type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (**Rira, 2006**).

1.3.3.1.1. Tanins hydrolysables:

Sont des hétéros polymères (Fig.06) caractérisées par la présence d'un noyau central constitué d'un polyol, ils sont facilement hydrolysable dans les milieux acides et alcalins et aussi facilement scindés par les enzymes de tannase pour donner des glucides et des acides phénoliques (**Leinmüller *et al.*, 1991**). Selon leur nature on distingue: les tanins galliques (Gallo tanins), ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique et les tanins ellagiques (Ellagitanins), Ainsi sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (**Paris et Hurabielle, 1981**).

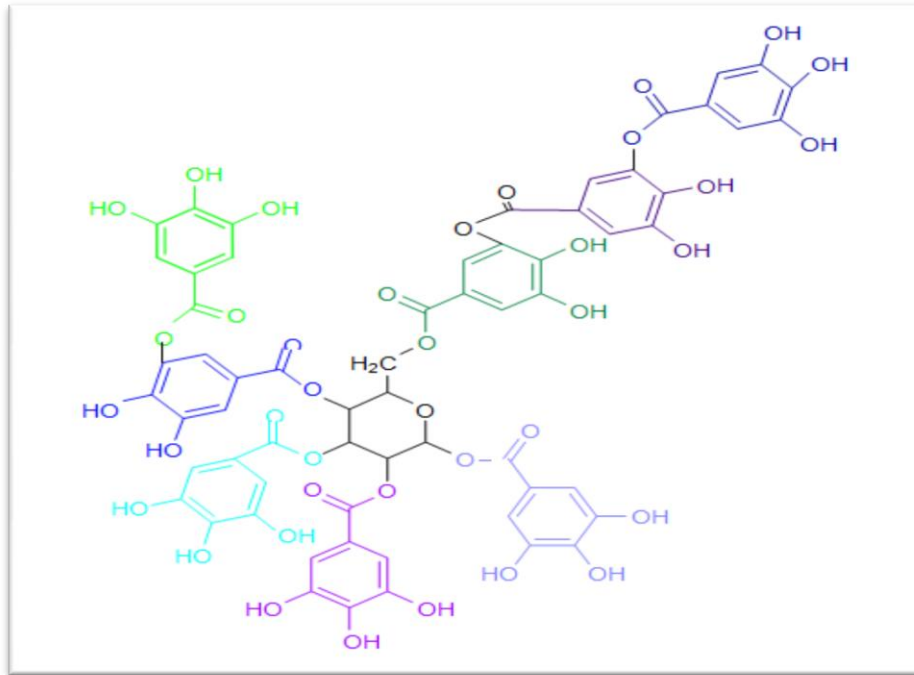


Figure 06: Structure générale de tanins hydrolysables (Gilbert et Norris, 1968).

1.3.3.1.2. Tanins condensées

Sont plus complexes que les tanins galliques (Fig.07) non hydrolysables (dits catéchiques et proanthocyaniques), ayant un squelette phényl-2- chromane de flavonoïdes (Alilou, 2012). Aujourd'hui on trouve ces tanins constitués par le mélange des produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4-dioles), on peut les qualifier encore de tanins flavaniques (Richter, 1993).

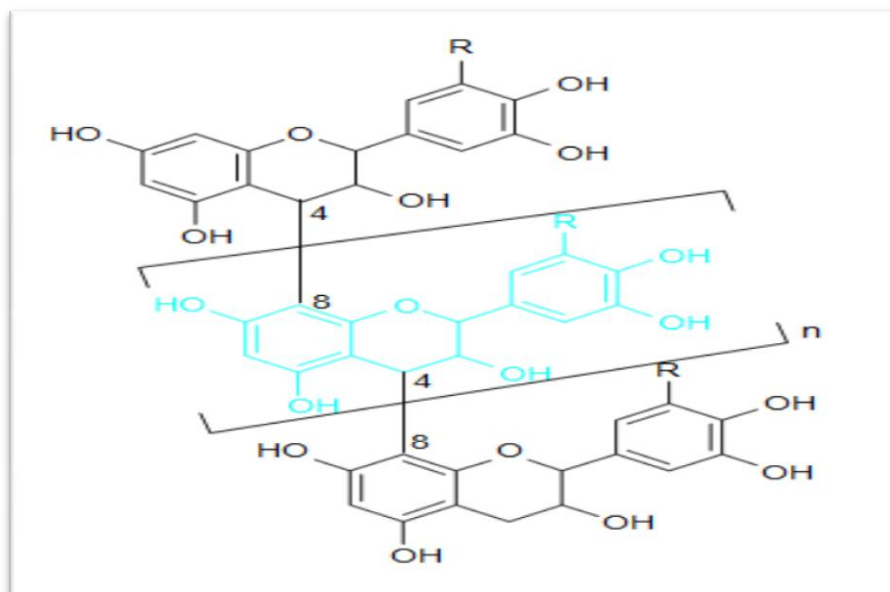


Figure 07: Structure générale de tanins condensés (Gilbert et Norris, 1968).

2. Méthodes d'extraction

2.1. Différentes méthodes d'extraction

Parmi les étapes d'identification des molécules bioactives, l'extraction est une étape primordiale qui a pour but la désorption des principes actifs à partir des plantes, puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes qui vont suivre (**Mendiola et al., 2007**).

Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, infusion, décoction, le Soxhlet, l'hydrodistillation et l'extraction par percolation ou par reflux, utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels. Cependant, ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvants organiques (**Vinatoru et al., 1997**).

Dans la médecine traditionnelle les modes les plus courants sont : l'infusion, la décoction et la macération. Les trois modes de préparation ont été testés par l'équipe de recherche **Konkon et al. (2006)** afin d'identifier les groupes de constituants chimiques présentant un intérêt pharmacologique ; ces derniers ont trouvés que les trois méthodes étaient aussi efficace avec des rendements allant de 25% à 15%.

Afin d'évaluer la meilleure technique d'extraction de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés d'artichaut, **Mahmoudi et al. (2013)** ont utilisés deux méthodes d'extraction à savoir la décoction et la macération en utilisant l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés par la décoction soit une moyenne de 17,34 % versus 15,64 % pour la macération

La méthode par décoction a été comparée avec une nouvelle technologie d'extraction qui utilise les micro-ondes et les ultrasons, le résultat de cette étude démontre que la nouvelle technologie d'extraction présente une efficacité plus importante que celle de la décoction avec un rendement de Polyphénols chez le thé de 27% contre 20% (**Nshimiyimana et He, 2010**).

2.2. Facteurs influençant les performances de l'extraction

2.2.1. Taille des particules

Tous les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange

entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel. Ainsi que le plus grands rendements d'extraction de composés phénoliques et d'anthocyanes ont été observés avec la diminution de la taille des particules (**Gao and Mazza, 1996**) ; ou des résidus de pression de jus de cassis (**Landbo and Meyer, 2001**).

2.2.2. La nature du solvant

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène (**Gerin 2002**). Un solvant d'extraction est choisi en fonction de ses propriétés physiques : densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc. déterminant les conditions de l'épuisement, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, etc.... Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, ininflammable, et non explosif ainsi ses caractéristiques économiques et son prix de revient (**Vignerot, 1954**).

2.2.3. La température

Dans la plupart des cas, les gammes élevées de température sont favorables au rendement d'extraction et ceci pour quatre principales raisons (**Leybros et Frémeaux, 1990**):

- La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation.
- La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire.
- Enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation.

La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de (**Leybros et Frémeaux, 1990**):

- Dégradation thermique du soluté.
- Risques d'extraire des composés nuisibles

2.2.4. Temps d'extraction

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc....).

A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes (**Groubert, 1984**).

2.2.5. Degré d'agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération.

Dans le cas de l'extraction aqueuse, l'agitation permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide liquide (couche limite) et d'augmenter le coefficient de transfert. Si l'agitation est maintenue durant une longue période, elle va favoriser les chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (**Dibert et al., 1989**).

3. Généralités sur la plante *Ephedra alata* Decne العنّدة.

Le genre *Ephedra* est le seul genre représenté par la famille des Ephedraceae, il inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009). L'espèce *Ephedra alata* Decne est une plante médicinale originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Égypte et l'Arabie Saoudite (Caveney *et al.*, 2001). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991). Elle se développe habituellement dans les des pentes sèches et des côtés de montagnes (Limberger *et al.*, 2013)

3.1. Description botanique

L'espèce *Ephedra alata* Decne est un arbuste dioïque vivace de 1 à 3 m de hauteur, caractérisée par des 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 (Limberger *et al.*, 2013). Les fleurs sont en petits cônes, (Fig. 21) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Derbel *et al.*, 2010).



Figure 08: Arbuste d'*Ephedra alata* (Chaieb *et al.*, 2008)

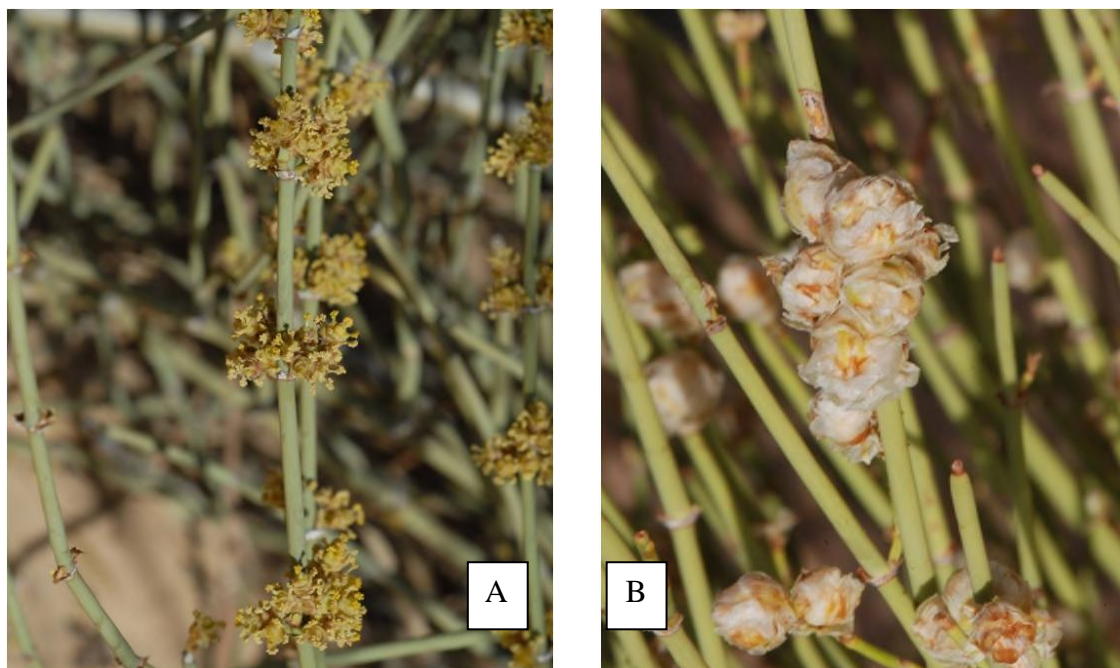


Figure 9: Branches fleuries d'*Ephedra alata* (Chaieb *et al.*, 2008)

A: Fleurs mâles d *E. alata*

B: Fleurs femelles d *E. alata*

3.2. Classification d' *Ephedra alata* Decne.

Embranchement: *Spermaphytes*

Sous embranchement: *Gymnospermes*

Classe: *Gnetopsida*

Ordre: *Ephedrales*

Famille: *Ephedraceae*

Genre: *Ephedra*

Espèce: *Ephedra alata*

Sous espèce: *Ephedra alata alenda* (Ozenda, 1991)

3.3. Chimie de la plante

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

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

80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (**Phinney et al., 2005 ; Soni et al., 2004 ; Caveney et al., 2001**).

3.4. Utilisations traditionnelles

Cette espèce est bien utilisée dans le domaine de la médecine traditionnelle notamment dans les pays arabes, par l'utilisation des jeunes tiges (**Abourashed et al., 2003**). Ces tiges sont généralement bouillies environ 30 minutes dans l'eau et la décoction est consommée par voie orale comme thé chaud à une dose de 1,5 à 9 g d'herbe (**Jaradat et al., 2015**).

Les tiges de *E. alata* sont utilisées pour traiter les reins, les bronches, le système circulatoire, les troubles du système digestif et soulager l'asthme ainsi que le traitement du cancer (**Jaradat et al., 2015**). Les tiges sont ainsi mâchées afin de traiter les infections bactériennes et fongiques (**Al-Qarawi et al., 2011**), le traitement de la toux ainsi qu'un effet décongestionnant (**Abourashed et al., 2003**).

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

En Arabie Saoudite, *Ephedra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2012**).

Au Maroc, l'*Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**). Ainsi Par voie vaginale, l'*Ephedra* est utilisée pour provoquer l'avortement ; en effet les tiges broyées d'*Ephedra alata* et cuites dans du beurre, seraient ingérées par les femmes du Sahara pour avorter (**Bellakhdar, 1997**).

En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2013**).

En Asie les chinois donne le terme **Ma-huang** à la partie aérienne des espèces de l'*Ephedra*, l'*Ephedra alata* est utilisée pour lutter contre l'asthme bronchiale, rhume, grippe, fièvre, *frissons*, rhinite, congestion nasale, œdème, maux de tête, arthralgies et comme diaphorétique, anti allergique et antitussif (**Abourashed et al., 2003 ; Soni et al.,**

2004; Ma *et al.*, 2007), et à fabriquer clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (Caveney *et al.*, 2001).

3.5. Toxicologie

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

3.6. Pharmacologie

Les effets pharmacologiques et toxicologique de cet arbuste semble être attribuable à ses alcaloïdes de types éphédrine, principalement (-)-éphédrine et (+)- pseudoéphédrine. L'Éphédrine, malgré l'absence de groupement phénolique caractéristique des catécholamines, est un sympathomimétique, agoniste à la fois des récepteurs adrénergiques α et β . Elle présente aussi un effet indirecte sur le système sympathique via l'augmentation de la libération de noradrénaline à partir des vésicules de stockage dans les neurones sympathiques vers la zone synaptique où il se fixe sur les récepteur post-synaptiques α et β (Limberger *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2007). L'effet principal de la stimulation des récepteurs adrénergiques α et β inclue l'augmentation de la fréquence cardiaque et la contractilité. Elle favorise également la vasoconstriction périphérique due à la fraction pseudoéphédrine, la bronchodilatation, ce qui explique son utilisation traditionnelle comme décongestionnant nasal et antiasthmatique, ainsi que la stimulation du SNC (Abourashed *et al.*, 2003 ; Phinney *et al.*, 2005). Cependant, les effets hypertenseurs et vasoconstricteurs liés à l'éphédrine, sont moins rapides et moins puissants, mais plus durables et plus stables dans les conditions du métabolisme contrairement à l'adrénaline (Chopra *et al.*, 1960). C'est pour cela que l'administration de l'éphédrine, qui semble le majeur principe actif de la plupart des espèces *Ephedra*, est contre indiqué chez les patients atteint d'hypertension ou toute autre maladies cardio-vasculaires, de glaucome, ou de l'hyperthyroïdie (Soni *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2010).

3.7. Travaux antérieurs

3.7.1. Activité antimicrobienne

Selon **Ghanem et El-Magly (2008)** L'extrait acétonitrile de *l'E. alata* de l'Egypte présente simultanément, une forte activité contre des bactéries à GRAM+ et à GRAM- ainsi que des champignons et champignons de type levure. *L'E. alata* de la région d'Ouargla testé par **Kessal et Bouafia (2003)** et **Chebouat et al. (2014)** s'est révélée avoir des activités plus ou moins importantes sur la croissance de bactéries à GRAM + et à GRAM - selon la souche ciblée.

Ephedra alata ayant un pouvoir contre le HSV (Herpes simplex virus) (**Soltan et Zaki, 2009**), son extrait aqueux présente un potentiel d'inhibition significatif in vitro et in vivo contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* (**Al-Qarawi et al., 2011**).

3.7.2. Effet sur la masse corporelle

L'Ephedra favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids. Un tel effet a été principalement attribué à une augmentation de la tonicité sympathomimétique entraînant une augmentation de la lipolyse et la glycogénolyse, avec la stimulation sympathique du centre de la satiété central conduisant à la suppression de l'appétit (**Boozer et al., 2001**).

3.7.3. Effet hypoglycémiant

L'extrait alcoolique de *l'E.alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun (**Shabana et al., 1989**).

3.7.4. Effet anti-inflammatoire

L'extrait aqueux de *l'E.sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue (**Ling et al., 1995**). Par ailleurs, **Hikino et al. (1982)** ont suggéré que la pseudoéphédrine est le principe actif responsable de l'activité anti-inflammatoire montrée par *l'E. intermedia*. **Konno et al., (1979)** ont rapporté que la partie aérienne des espèces d'*Ephedra* contient de l'Ephedroxane qui s'est révélée également posséder une activité anti-inflammatoire.

3.7.5. Action sur la pression artérielle

Les croyances chinoises prétendent que la partie aérienne et souterraine de l'*Ephedra* ont des effets opposés. Cela a été confirmé, pour l'action sur la pression artérielle, par des tests sur des animaux. Un polyphénol nommé l'Ephedrannine A isolé à partir des racines de la plante (**Hikino *et al.*, 1982**) ainsi qu'un type mineure d'alcaloïdes dans la plante isolé de ses racines, nommé l'Ephedradine, présentaient un effet hypotensif (**Tamada *et al.*, 1979**). Par contre, l'éphédrine présente une action hypertensive (**Abourashed *et al.*, 2003**).

4. Activité antioxydante

4.1. Stress oxydatif

4.1.1. Définition

Le stress oxydatif, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes de l'organisme, ce qui conduit à des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles tels que: protéines, lipides et acides nucléique (**Soares, 2005**).

Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité des radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas des ressources antioxydantes suffisantes pour les éliminer (**Pincemail et al., 1999**).

4.1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Les mécanismes responsables de la production des radicaux libres peuvent être dûs à:

- Fuites des électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurousseau, 2002**).
- Processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milane, 2004**).
- Exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette (**Lamamra, 2010**).

4.1.3. Nature des radicaux libres

4.1.3.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux ERO par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours du métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique (**Cristina et al., 2009**).

Les espèces réactives oxygénées (ERO) regroupent les espèces radicalaires telles que Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), Radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et Monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) les espèces non radicalaires telles que Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) Acide hypochlorique ($HOCl$) Oxygène singulier ($1O_2$) Peroxynitrite ($ONOO^-$) (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

4.1.3.2. Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation des dommages oxydatifs ; par exemple : Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

4.1.4. Cibles cellulaires de l'ERO

L'oxydation peut conduire à des dommages sur l'organisme tels que : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN (Fig.10) (Hadj, 2009)

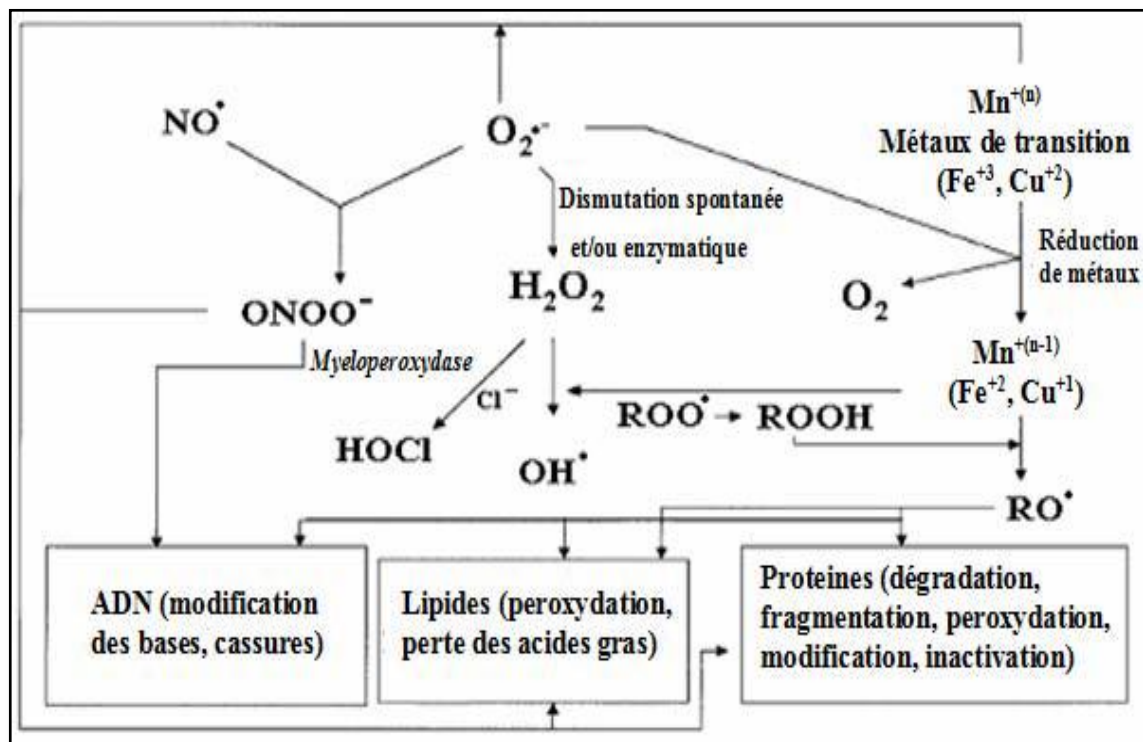


Figure 10: Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les ERO (Hadj, 2009).

4.1.4.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbert, 2005).

La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Benzidane, 2011). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique on distingue: l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui sont étudiés comme des marqueurs de la peroxydation lipidique (Del *et al.*, 2005).

4.1.4.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , elles peuvent être classées en deux catégories :

- Celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.
- Modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases) (Levine, 2002).

4.1.4.3. Dommage de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des EOR. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire. Les mécanismes explicatifs proposés sont :

- Absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial.
- Localisation proche de la membrane interne.
- Structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Garait, 2006).

4.1.5. Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans des nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Mohammedi, 2013**). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (**Sohal et al., 2002**).

4.2. Antioxydants

4.2.1. Définition

Les antioxydants sont des substances ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme (**Tang et Halliwell, 2010**). Ainsi, ils servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (**Guan et al., 2007**).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (**Goudable et Favier, 1997**). On distingue les antioxydants endogènes et antioxydants naturels (exogènes).

4.2.2. Antioxydants naturels ou exogènes

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les antioxydants d'origine naturelle ». Ils sont essentiels pour l'homme dont les apports peuvent prévenir et même aider au traitement des maladies liées au stress oxydant (**Vertuani et al., 2004**).

4.2.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donateurs d'atomes d'hydrogènes; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote (**Laughton et al., 1989**).

4.2.2.2. Vitamine E (tocophérol)

La vitamine E est le principal agent antioxydant liposoluble capable de s'insérer dans les membranes cellulaires telles que globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central) (Sebei *et al.*, 2007).

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes tels que les tocophérols α , β et γ qui détruisent les radicaux peroxydes et les alkoxydes grâce à leur hydroxyle phénolique, en formant des hydroperoxydes lipidiques et le radical tocophéryle (Stahl et Sies, 1997).

4.2.2.3. Vitamine C (Acide ascorbique)

La vitamine C est l'antioxydant hydrosoluble majeur, efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxyle et superoxyde ainsi que contre le peroxyde nitrite. Elle est également capable de réduire les métaux de transition et donc d'avoir des effets prooxydants. La vitamine C est abondante dans les agrumes, les fruits rouges, les pommes de terre primeurs, les brocolis. La vitamine C peut également contribuer à limiter la peroxydation lipidique en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine E. Il faut toutefois signaler qu'à forte dose et en présence de quantités importantes de fer. Elle peut devenir prooxydante (Weissburger, 1997).

4.2.2.4. Vitamine A (rétinoïdes)

La vitamine A est présente dans les aliments d'origine animale (lait, foie, jaune d'œuf), alors que les provitamines A se rencontrent dans des nombreux fruits et légumes. Elle est responsable de la neutralisation de singulet d'oxygène, d'anion superoxyde, de peroxyde nitrite, des radicaux lipidiques ; son action se fait dans les milieux lipidiques. Dans les huiles végétales, la vitamine A ne serait efficace qu'en présence de vitamine E et il existe une étroite collaboration entre ces deux vitamines liposolubles. La vitamine A agit sur les ERO en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A. En excès la vitamine A pourrait agir comme prooxydants en favorisant l'oxydation de l'ADN (Van *et al.*, 2009).

4.2.2.5. Caroténoïdes

Le caroténoïde tel que le β -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs des radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet, ce qui permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation des fruits, des légumes, de thé et d'autres produits végétaux (Erdman *et al.*, 1993).

4.2.2.6. Oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes. D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium) (Erdman *et al.*, 1993)

4.2.3. Antioxydants endogènes

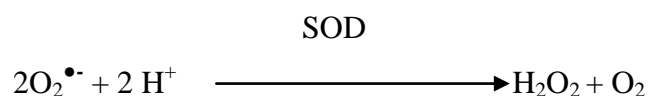
L'organisme dispose d'une large gamme d'antioxydants endogènes sous forme des systèmes enzymatiques, ou non enzymatiques (Avissar *et al.*, 1989)

4.2.4. Antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement des trois enzymes: le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Avissar, 1989).

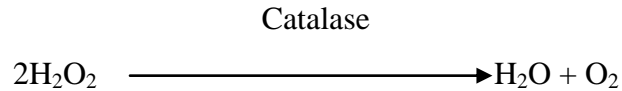
4.2.4.1. Superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène selon la réaction (Jacques et André, 2004):



4.2.4.1.1. Catalase

La catalase est une enzyme qui transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène (produit par dismutation de SOD) en eau et en oxygène qui sont des composés stables selon la réaction (**Jacques et André, 2004**):



4.2.4.1.2. Glutathion peroxydase

Le glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importantes systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (**Ganther, 1999**).

4.2.5. Antioxydants non enzymatiques

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme ou dans les membranes cellulaires (**Vertuani *et al.*, 2004**).

Chapitre II: Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des jeunes tiges de l'espèce *Ephedra alata alenda*. La récolte s'est effectuée le 25/11/ 2017.

Après récolte, le matériel végétal est séché à l'ombre et à l'air libre et à température ambiante. Environ une quinzaine de jours.

Les tiges sont broyées finement et conservées dans des boîtes fermées hermétiquement.

2. Présentation du site de récolte

La Wilaya d'El Oued est une ville du sud de l'Algérie à climats aride, elle est délimitée par :

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

Au niveau de la zone de Taleb Larbi (wilaya d'El Oued) qui est située au Sud-Est de l'Algérie au niveau de route nationale N°48, à la position de Latitude: 33°40'56.9"N, Longitude: 7°14'27.9"E Avec une altitude de 84 m par rapport au niveau de la mer.

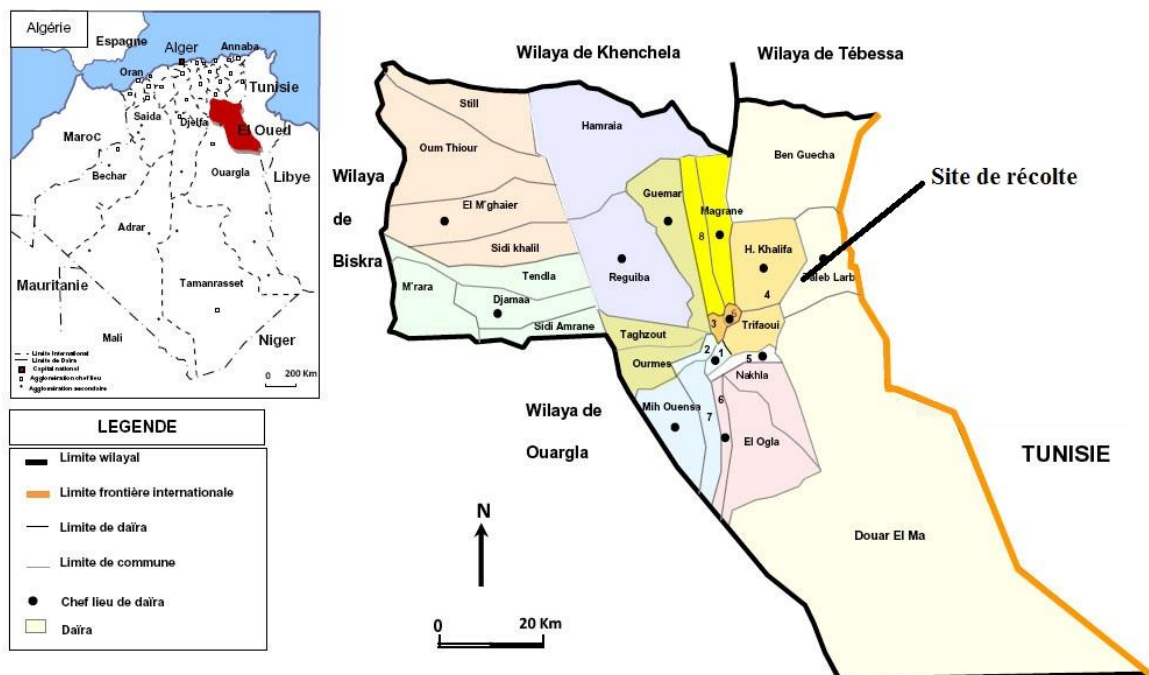


Figure 11: Situation géographique du site de récolte (Medarag et Farhi, 2009)

3. Tests phytochimiques préliminaires

La partie aérienne de *Ephedra alata* réduite en poudre a subi différentes tests chimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des principales familles de métabolites secondaires

Selon **Dohou *et al.* (2003)** le screening phytochimique suivant a été effectuée

3.1. Mise en évidence des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

5 g de matériel végétal placés dans un Erlenmeyer sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, 6 ml d'infusé sont prélevés et introduit dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube. A l'infusé on additionne respectivement, 1 ml de NaOH, 1 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl concentré et des copeaux de Magnésium pour les flavonoïdes et sans copeaux de Magnésium au bain marie pour les leucoanthocyanes. En présence des flavonoïdes les colorations suivantes sont obtenues Jeune-rougeâtre, Rouge à rouge-violacé, Rouge foncé au violet ou bleu, jaune et rose respectivement pour les flavones, les flavonols, les flavonones, les isoflavones et les Leucoanthocyanes.

3.2. Mise en évidence des quinones

5g de matériel végétal broyé sont humectés de quelques gouttes de HCl concentré. Puis mise à macérer pendant 24 heures dans un Erlenmeyer fermé et contenant 10 ml d'éther de pétrole. Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10 %. La coloration rouge virant au violet apparaît en présence des quinones.

3.3. Mise en évidence des anthocyanes:

5 g de matériel végétal sont placés dans un Erlenmeyer puis infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, 6 ml d'infusé sont prélevés et introduit dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube. Quelques gouttes d'ammoniaque sont ajoutées, la réaction donne une coloration bleu en présence d'anthocyanes.

3.4. Mise en évidence des coumarines:

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de 2 ml d'eau distillée, la solution est divisée dans deux tubes: un tube témoin et dans l'autre tube on ajoute l'ammoniaque (NH_4OH) à 10 %. Les tubes sont alors exposés à la lumière UV. L'apparition d'une intense fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence de coumarines et leurs dérivés. On s'assure auparavant que les tubes ne présentent pas de fluorescence à vide.

3.5. Mise en évidence des tanins

5 g de matériel végétal sont infusés dans 50 ml d'eau bouillante contenue dans un Erlenmeyer pendant 30 minutes; 2 ml de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai auquel on ajoute quelques gouttes de Chlorure ferrique à 1%. L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité. Indique la présence des tanins catéchiques.

2 ml de l'infusé sont placés dans un tube à essai saturé en acétate de sodium avec quelques gouttes de FeCl_3 . La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

3.6. Mise en évidence de saponines

5 g de poudre végétal sont mise dans un Erlenmeyer au quel on ajoute 50 ml d'eau distillée pour réaliser une décoction pendant 30 minutes. Après refroidissement, 5ml sont filtrés du décocté et introduite dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et 160 mm de hauteur après agitation, l'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

Cependant, en cas d'une faible mousse, le décocté est testé avec un mélange à volume égal de H_2SO_4 1N et K_2CrO_3 à 10 % (chrome de potassium)

3.7. Mise en évidence des Terpenoïdes et des stéroïdes

En présence de l'acide acétique anhydre et de l'acide sulfurique concentré (réactif de LIEBERMAN-BIJRCHARD), l'extrait organique étheré contenant les stéroïdes donne des colorations mauves et vertes. Par ailleurs, 2 ml de la solution sont traités par quelques gouttes de réactif de HIRSCHSON pour mettre en évidence votre principe actif Terpenoïdes par l'apparition d'une coloration rouge.

Prendre 1g de matériel végétal qu'on met à macérer pendant 24 heures dans 100 ml l'éther de pétrole, ou dans le benzène Après filtration le solvant est évaporé au bain de sable. Le résidu est récupéré par 1 ml de chloroforme, 1ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Il se produit une coloration violette devenant progressivement verte; La coloration verte se stabilise au bout de 30 min et indique la présence des stéroïdes.

3.8. Mise en évidence des alcaloïdes

1g de matière végétale sèche qu'on met à macérer dans 10 ml de méthanol à la température ambiante pendant 24 heures. L'évaporation est faite à l'étuve à 50°C pendant 4 heures. Le résidu est recueilli deux fois par 2 ml de solution chaude d'acide chlorhydrique 1%.

La solution acide est ajoutée de l'ammoniaque concentrée et 15 ml de Chloroforme, le tout dans une ampoule à décanter. On laisse évaporer à l'air libre ou au rotavapeur on obtient un résidu. Au résidu on ajoute 0,5 ml de HCl 1%, après agitation.

Ainsi, les alcaloïdes ayant été protonés sont supposés être passés en phases aqueuses. La phase aqueuse au dessus est prélevée l'aide d'une pipette Pasteur, six gouttes sont disposées sur une lame porte-objet auxquelles on ajoute le réactif de Wagner. En présence d'alcaloïdes on obtient une coloration jaune.

4. Teneur en cendres et en matière organique

Le but est de déterminer la teneur en matières minérales dans les plantes, de façon à calculer la quantité de matière organique (MO). Elle représente la différence entre la matière sèche (MS) et les matières minérales (MM) (Jarrige, 1985).

$$MM=MS-MO$$

La minéralisation est faite à 550°C dans un four à moufle dans le but de détruire la matière organique. Le travail est effectué sur le végétal broyé. Les cendres représentent le poids des minéraux dans la plante.

5. Extractions et rendements des composés phénoliques

5.1. Teneur en substances extractibles par l'eau

Suivant le protocole décrit par Diallo (2005), décoction d'un gramme de poudre (PE) avec 20 ml d'eau distillée pendant 15 mn. Après refroidissement et filtration sur papier filtre, le filtrat a été mis dans une capsule pesée et tarée au préalable (n) et évaporé à sec (n'). La teneur en substances extractibles par l'eau est évaluée par la formule:

$$SEE\% = (n-n') \times 100 \div PE.$$

5.2. Teneur en substances extractibles par l'éthanol

Suivant le protocole décrit par Diallo (2005), macération de 1g du végétal pendant 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été mis dans une capsule préalablement pesée et tarée (n) et évaporé à sec. Après refroidissement la capsule a ensuite été pesée (n') et la masse de résidu déduite. La teneur en substances extractibles par l'éthanol est évaluée par la formule:

$$SEEt\% = (n-n') \times 100 \div PE.$$

5.3. Méthodes d'extraction :

Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle.

Cependant, pour les composés très polaires tel que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs les mélanges d'alcool-eau ou acétone-eau sont recommandés. Les solvants moins polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle..). Les extractions sont répétées deux à trois fois et les extraits sont ensuite combinés.

Les extractions solide / liquide de cette plante ont été réalisées selon trois modes de préparation : infusion, décoction et macération.

- **L'infusion** est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir.
- **La décoction** consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant (au bain-marie). Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le solvant d'extraction est froid.
- **La macération** est une méthode d'extraction liquide-solide (solvant-poudre végétal) similaire à l'infusion qui s'effectue à température ambiante, Elle est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur.

Macération 1: éthanol

Macération 2: méthanol ou hexane

5.4. Rendement d'extraction des polyphénols

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par **Falleh et al. (2008)**:

$$R (\%) = 100 \cdot M_{\text{ext}} / M_{\text{éch.}}$$

R: Le rendement en %.

M_{ext}: La masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg.

M_{éch} : La masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

5.5. Extraction et Récupération de l'extrait brut.

5.5.1. Macération et récupération de l'extrait brut

La macération est faite dans le méthanol / eau (30 :70 v/v) pour 2 g de poudre végétal, pendant 72 heures avec renouvellement du solvant chaque 24 heures et agitation de temps à temps. On récupère le macéra de chaque échantillon séparément

Les macéras des 3 jours pour chaque échantillon sont réunis puis filtrés sur papier filtre. Les filtrats sont évaporés à sec dans l'étuve de 55°C.

Le résidu sec est repris dans 30 ml d'eau distillée chaud pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du contenant.

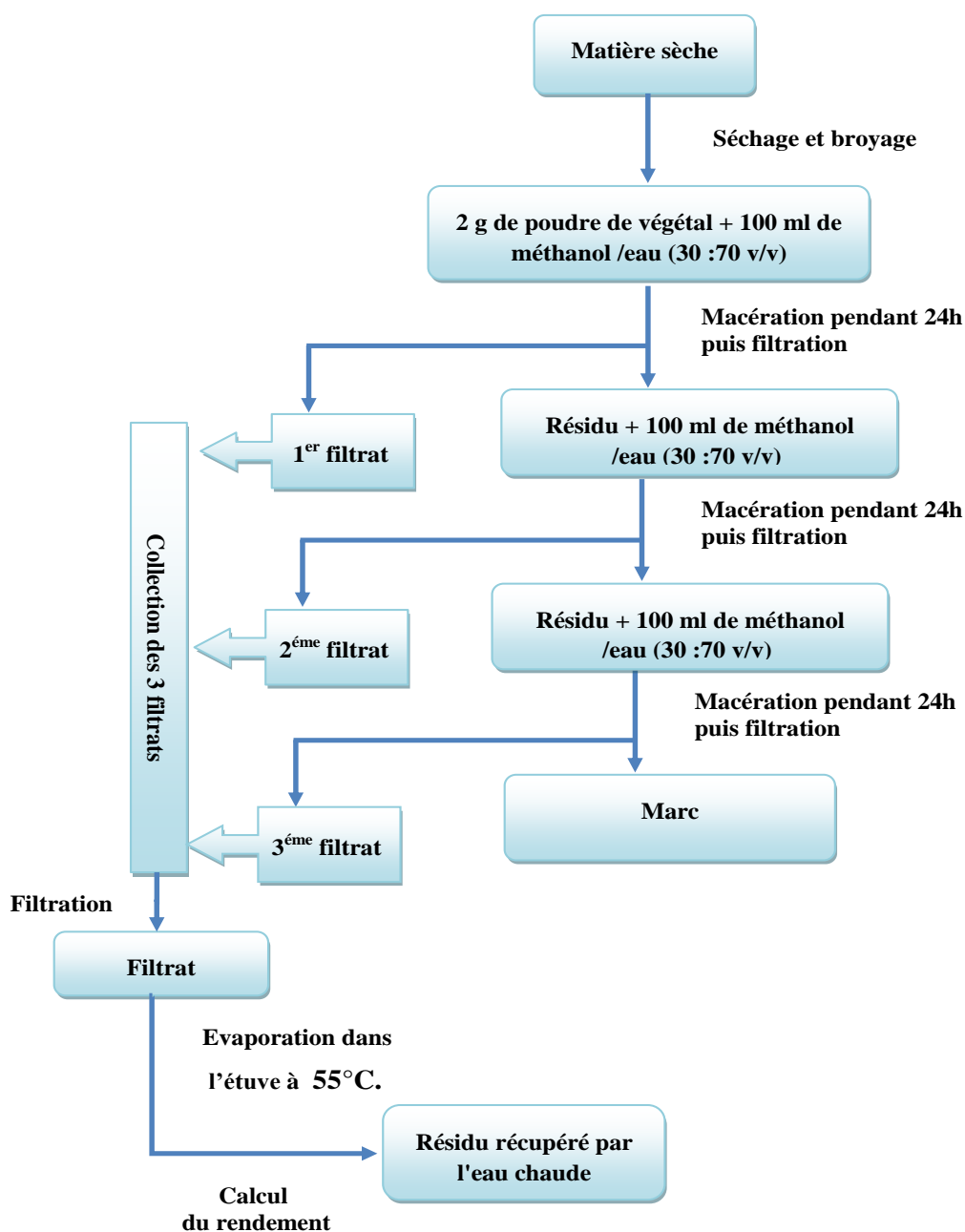


Figure 12: Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par macération

5.5.2. Décoction et récupération de l'extrait brut

La décoction est faite dans le méthanol /eau (30 :70 v/v) pour 2 g de poudre de végétal au bain-marie pendant 15 minutes, après refroidissement les échantillons sont filtrés ; Les filtrats sont évaporés à sec dans l'étuve à 55°C.

Le résidu sec est repris dans 30 ml d'eau distillée pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du contenant.

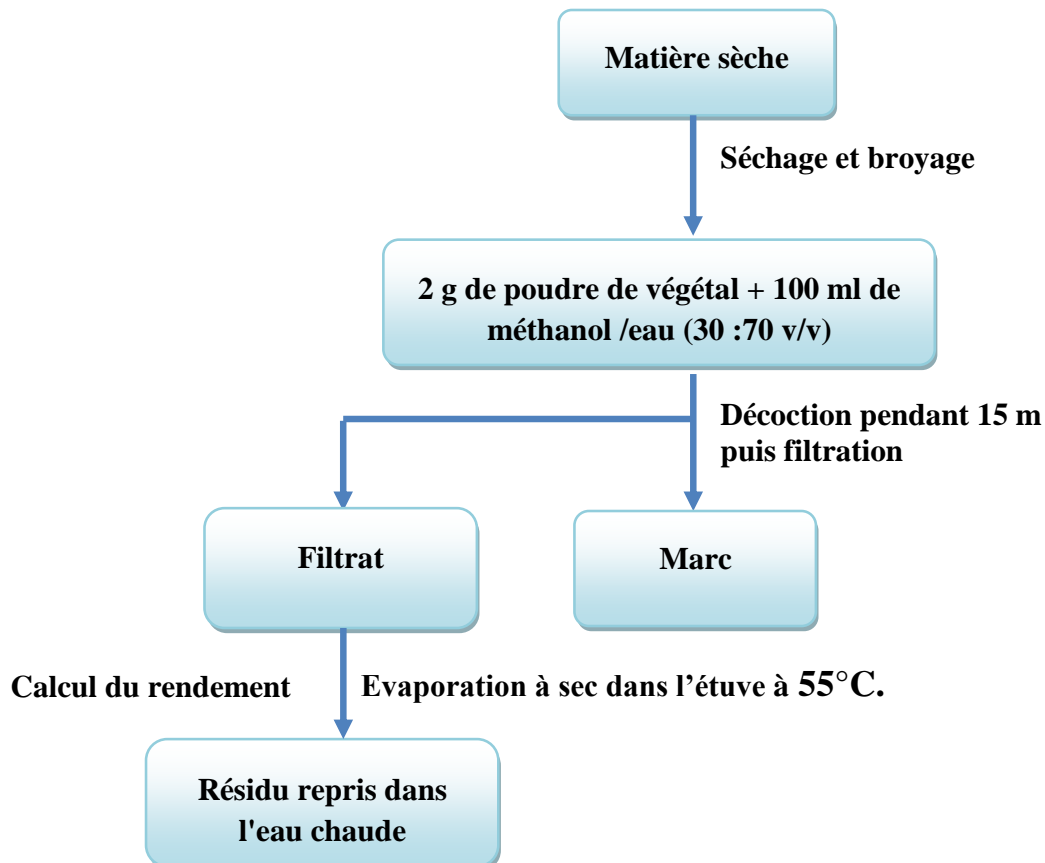


Figure 13 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par décoction

5.5.3. Infusion et récupération de l'extrait brut

2 g de matériel végétal sont infusés dans un mélange de 100 ml de méthanol /eau (30 :70 v/v), après refroidissement les échantillons sont filtrés. Les filtrats sont évaporés à sec dans l'étuve à 55°C.

Le résidu sec est repris dans 30 ml d'eau distillée pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du contenant.

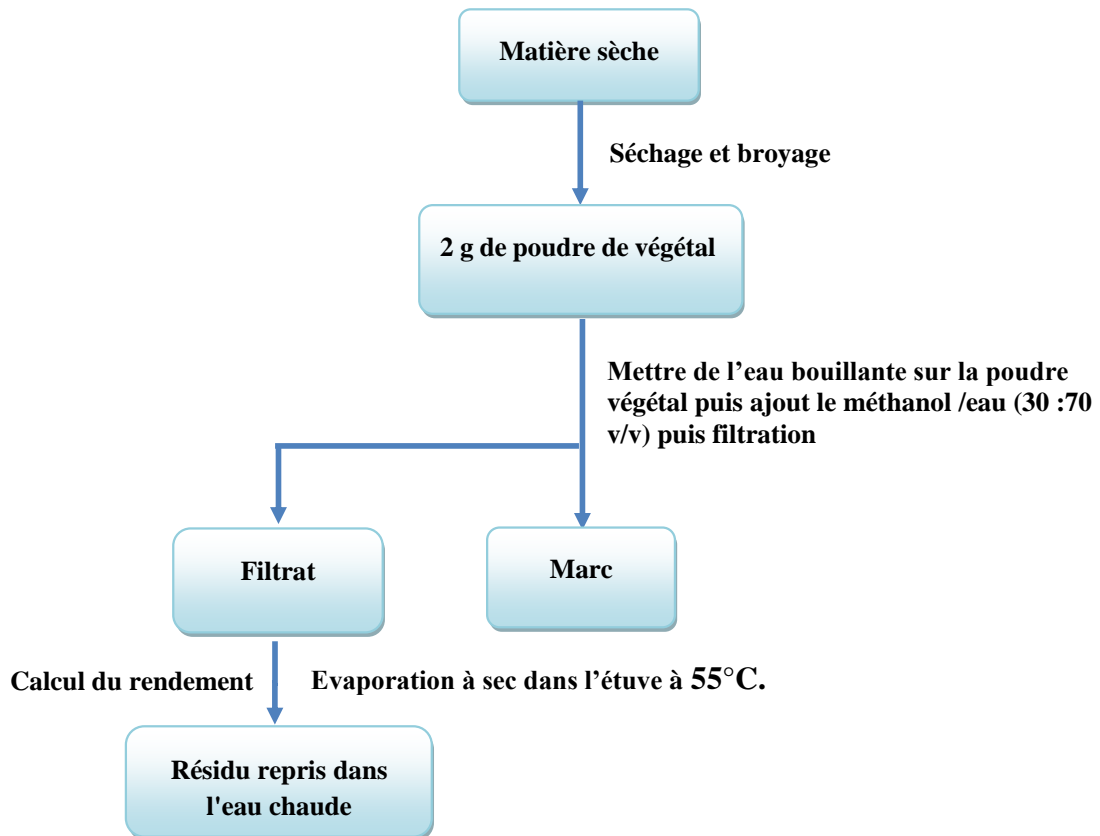


Figure 14 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par infusion

5.6. Affrontements:

Les extraits bruts ainsi obtenus sont soumis à un affrontement par l'éther de pétrole pour éliminer les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides ; tous composés non phénoliques (Torck et Pinkas, 1992).

Cet affrontement se fait dans des ampoules à décanter. La phase récupérée est évaporée à sec avec le rotavapeur ou dans l'étuve de 55°C puis reprise dans du méthanol 20 ml pour les dosages.

6. Dosages

6.1. Dosage des polyphénols totaux

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Elle consiste à prendre un volume de 200 µl de l'extrait, un volume de 1 ml du réactif Folin Ciocalteu (dilué dix fois : 9 V eau +1V Folin) était ajouté. Après 4 mn, un volume de 800 µl de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) (75mg/ 100 ml d'eau distillée) a été verse sur la solution. Les tubes ont été places à l'obscurité.

Après deux heures, les résultats étaient lus par spectrophotomètre à 765 nm, la concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-200 µg /ml).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (courbe d'étalonnage).

6.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits (Zhishen *et al.*,1999); 1 ml de chaque extrait (avec dilution convenable) est ajouté à 1 ml d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 mn de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catechine (0-40 µg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de catechine par gramme de matière sèche (mg ECAT/g MS). (Courbe d'étalonnage).

6.3. Dosage des flavonoïdes aglycones

Le dosage différentiel des flavones et des flavonols est effectué en se basant sur les propriétés chélatantes de AlCl_3 à 1% (m / v) en solution dans l'éthanol à 96% (v / v) (Lebreton *et al.*, 1967). Après un repos de 10 mn, le spectre est balayé de 380 à 460 nm, et l'absorbance maximale est retenue. L'absorbance du pic différentiel contre un blanc ne contenant pas d' AlCl_3 est proportionnelle à la concentration de l'échantillon en aglycones flavoniques. La teneur en flavonoïdes aglycones est exprimée en milligramme d'équivalent de catechine par gramme de matière sèche (mg ECAT/g MS). (Courbe d'étalonnage).

6.4. Dosage des anthocyanes:

Selon Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1965) le dosage des anthocyanes d'un extrait végétal s'effectue en utilisant deux propriétés dues à leurs structures : la modification de leurs couleurs en fonction du pH ; la transformation en dérivés incolores sous l'action de certains réactifs comme les ions bisulfite. Ainsi, la variation de l'absorbance lue à 520 nm après addition d'ions bisulfite (NaHSO_3) en excès, est proportionnelle à la teneur en anthocyanes.

A 0.5 ml de l'extrait végétal est ajouté 0,5 ml d'éthanol à 0,1% ainsi que 10 ml d'HCl à 2%. Les tubes à hémolyses sont préparés comme suit:

- Série A (tube témoin) : 5 ml du mélange + 2 ml d'eau distillée.
- Série B (tube bisulfite) 5 ml du mélange + 2 ml de bisulfite de sodium à 15g/100 ml.

La lecture au spectromètre se réalise après 20 minutes d'attente à 520 nm et les concentrations en anthocyanes totales, en mg/g, sont établies à l'aide de la formule:

$$\text{Concentration en anthocyanes totales} = 875 * (\text{Do tube témoin} - \text{Do tube bisulfite})$$

6.5. Dosage des Tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (Price *et al.*, 1978). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

400 µl de chaque extrait, est ajouté à 3 ml d'une solution méthanolique à 4 % de vanilline, et 1.5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 500 nm.

La concentration des tanins condensés est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec l'acide tannique 1 mg/ml.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de l'acide tannique par gramme de matière sèche.

7. Evolution de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Deux méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques: ce sont les méthodes DPPH ou (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), et méthodes FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

7.1. Méthode DPPH

Le test DPPH° permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Molyneux, 2004).

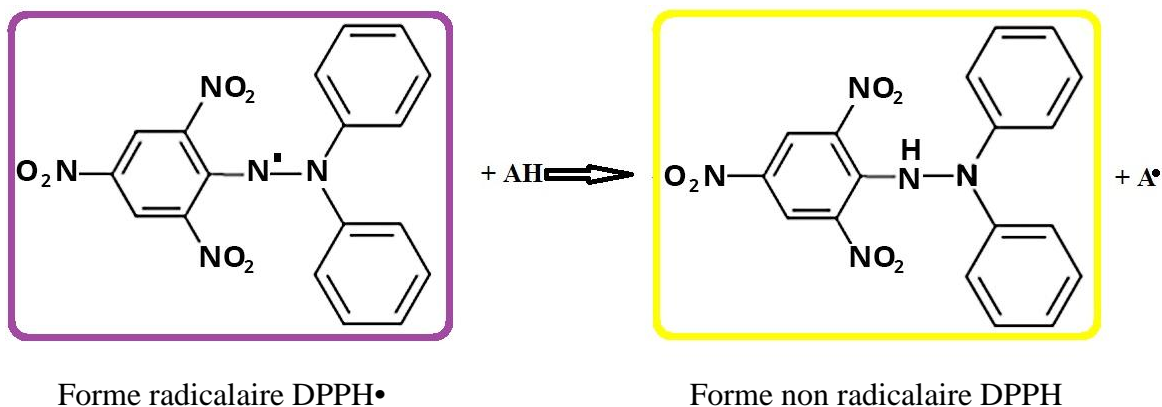


Figure 15: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH-entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Molyneux, 2004).

Selon Tekao *et al.* (1994) Test de piégeage du radical libre DPPH : Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode an DPPH. 50 µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0.001 à 1 mg/ml) sont ajoutés à 2 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,04 g/L). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 2 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 mn d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme antioxydant standard 0.001 à 10 mg/ml. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante **Kumarasamy et al. (2007)**:

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

La concentration efficace de l'échantillon nécessaire pour éliminer le radical DPPH de 50 % (valeur de l'IC50) a été obtenue par analyse de régression linéaire du diagramme de la courbe dose-réponse entre % inhibition et concentrations.

Dans ce test on définit deux paramètres:

- La concentration effective à 50%, $EC_{50} = IC_{50} / \text{mg de DPPH/ml}$.
- Le pouvoir antiradicalaire, $APR = 1 / EC_{50}$.

Les valeurs de l' EC_{50} ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

7.2. Methodes FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}) (**Oyaizu, 1986**), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

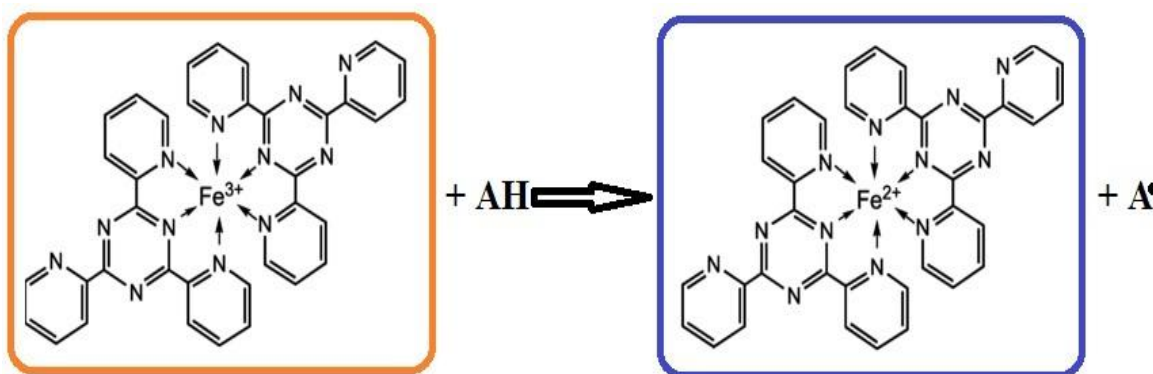


Figure 16: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).

Procédure expérimentale:

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique de **Yildirim *et al.* (2001)**. Les différentes concentrations des extraits (0.5 ml) sont mélangées avec 1.25 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, Ph = 6.6) et 1.25 ml de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min au bain marie. Après refroidissement, 1.25 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionnée pour stopper la réaction. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

A la fin, deux répétitions de 1 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1 ml d'eau distillée et 0.2 ml de $FeCl_3$ (1%).

Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions, et le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurer dans les mêmes conditions que les échantillons 10 mg/ml. L'absorbance est mesurée à 700 nm.

La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mmol Equivalent Acide Ascorbique (EAA)/g de matière sèche selon la formule:

$$C (\%) = (c \times C \times 100) / M \times Ci$$

C: concentration en composés réducteurs d'extrait sec;

c: Concentration de l'échantillon lue;

Ci: Concentration de la solution mère d'extrait;

M: Masse molaire de l'acide ascorbique (176,1 g/mol)

Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Singleton et Rossi, 1965**). Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivant:

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = [(A_o - A_1 / A_o)] \times 100.$$

Ao: l'absorbance de $FeCl_3$.

Al: l'absorbance de $FeCl_3$ solution en présence de l'extrait .

8. Traitement statistique

Les valeurs des paramètres étudiés ont été exprimées sous forme de moyennes \pm écart type. La comparaison entre les échantillons a été effectuée par l'analyse des variances (ANOVA à un facteur contrôlé suivie du test de Tukey. Ces analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel MINITAB V 17, le seuil de signification est de 0,05.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Criblage phytochimique

Le Criblage phytochimique a consisté à une mise en évidence de quelques métabolites dans les tiges de la plante *Ephedra alata* par des réactions de caractérisation.

Les tests phytochimiques réalisés, ont révélé la présence des flavonoïdes, des Tanins catéchiques, des anthocyanes, des Leucoanthocyanes, des alcaloïdes et des stéroïdes. Cependant, on a noté l'absence des saponosides, des quinones, des coumarines, des tannins galliques et des terpenoïdes.

Tableau05 : Tests phytochimiques sur les tiges d'*Ephedra alata*

Composés phytochimique	Observation	Résultats
Flavonoïdes	Coloration jaune-rougeâtre	+ flavones
Leucoanthocyanes	Coloration rouge	+
Quinones	Coloration rouge	-
Tanins catéchiques	Colorations bleu foncé	+
Tanins galliques	Pas de précipité	-
Anthocyanes	Coloration bleue	+
coumarines	Pas de fluorescence	-
soponines	Pas de mousse	-
Terpenoïdes	Coloration verte	-
Stéroïdes	Pas de coloration jaune	-
Alcaloïdes	Précipite jaune	+

(+) Présence (-) Absence

1.2. Méthodes analytiques

1.2.1. Teneur en matière organique et en cendre

Les résultats de la composition chimique obtenus ont une forte teneur en matière organique de la matière minérale (Cendre), qui représente en moyenne 91.89 %, par contre la teneur en cendre est d'une moyenne 8.11% (Tab. 06).

Tableau 06: Teneurs en matière organique et en matière minérale des tiges de la plante *E. alata*

	Teneur (%)
matière organique (MO)	91.89 ± 1.82
matière minérale (cendre) (MM)	8.11 ± 1.82

1.3. Extractions

1.3.1. Teneur en substances extractibles par l'eau ou éthanol

Les teneurs en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol à partir des tiges de la plante *Ephedra alata* sont exprimées en pourcentage de la matière sèche (% MS)

Tableau 07: Teneur en substances extractibles par l'eau ou éthanol des tiges d'*Ephedra. alata*

	Teneur (%)
Substances extractibles par l'eau	25.80 ± 5.62
Substances extractibles par l'éthanol	23.33 ± 5.77

L'analyse de la variance représentée dans le tableau 09 a montré des résultats non significatifs entre les teneurs en substances extractibles par l'eau ou éthanol

Tableau 08 : Analyse de la variance de teneur en substances extractibles par l'eau ou éthanol des tiges de la plante *E. alata*

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	1	9.127	9.127	0.28	0.624	NS
Erreur	4	129.847	32.462			
Total	5	138.973				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif. NS non Significatif

1.3.2. Rendements des extraits bruts

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale (Vuong *et al.*, 2013).

Les tiges de la plante *Ephedra alata* ont été soumises à trois types d'extractions des composés phénoliques, ces méthodes sont basées sur le mélange de la poudre végétale à chaud ou à froid (macération, décoction et infusion) avec un mélange hydrométhanolique. Les résultats montrent que le rendement le plus élevé est obtenu par la méthode d'infusion (61.87 ± 8.31%) suivi du rendement de l'extrait réalisé avec la macération (49.93 ± 5.42%), et la valeur la plus faible est celle obtenue par la décoction (32.67± 13.37 %), (Fig.17).

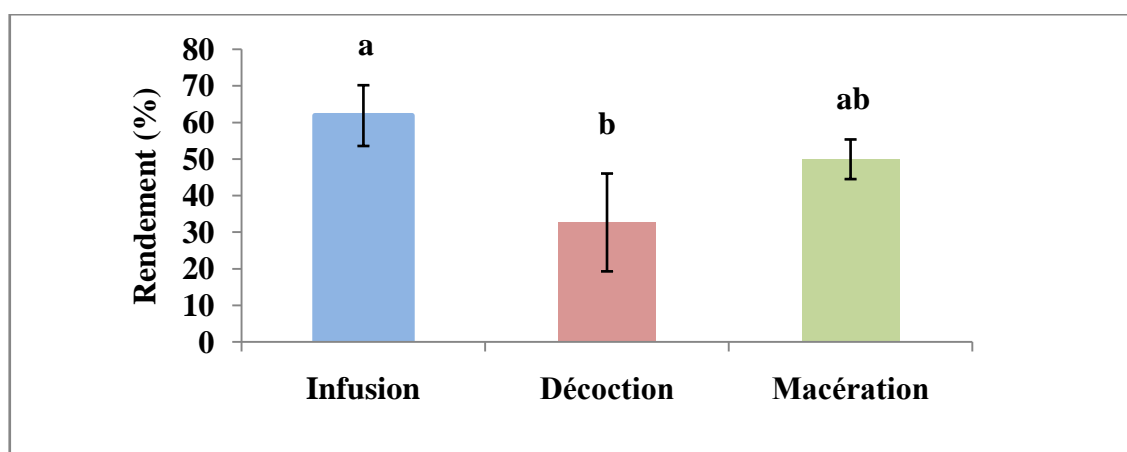


Figure 17 : Rendements des extraits méthanoliques bruts au niveau des tiges de la plante *E. alata*

a, b groupes selon le test de Tukey

L'analyse de la variance a montré des résultats significatifs entre les méthodes d'extraction, (Tab .10). Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey ; la comparaison a été fait au seuil de $\alpha = 0.05$

Tableau 09 : Analyse de la variance de rendements des extraits méthanoliques bruts des tiges de la plante *E. alata*

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	1293.2	646.59	7.00	0.027	*
Erreur	6	554.3	92.39			
Total	8	1847.5				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

1.4. Dosages des composés phénoliques

1.4.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux, de l'extrait Brut d'*Ephedra alata* est déterminée en utilisant les méthodes de Folin-Ciocalteu, et calculée par (mg EAG/g MS) à partir des équations de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimées en μg équivalent d'acide gallique $Y = 0.0104 X + 0.046$ (Annexe 2).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont illustrés par la figure 18 où la teneur la plus élevée est obtenue par la décoction: 58.37 ± 2.31 mg EAG/g MS suivies par l'infusion: 28.95 ± 1.67 mg EAG/g MS, et la macération: 27.03 ± 2.45 mg EAG/g MS.

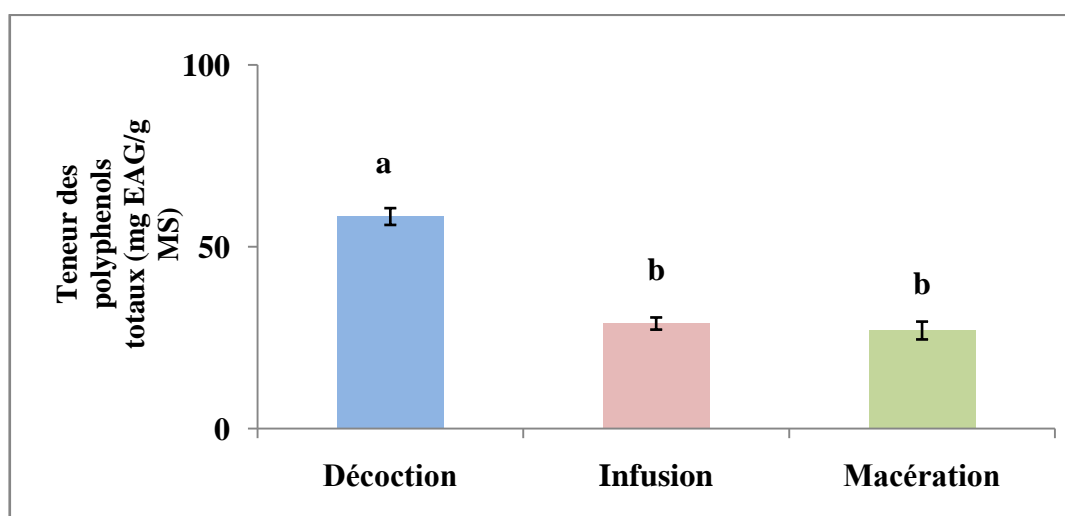


Figure 18 : Teneurs en polyphénols totaux de trios extraits méthanoliques d'*Ephedra alata*
a, b groupe selon le test de Tukey

L'analyse de la variance des résultats du dosage des polyphénols totaux est représentée dans le tableau 10 avec des différences très hautement significatives ($p < 0.001$).

Tableau 10: Analyse de la variance des résultats du dosage des polyphénols totaux des tiges de la plante *E. alata*

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	3085.15	1542.57	326.68	0.000	***
Erreur	12	56.66	4.72			
Total	14	3141.81				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

D'autre part, le test de Tukey, fait ressortir deux groupes homogènes, le 1^{er} groupe (a) représente par la méthode de valeur le plus élevé la décoction et le 2^{ème} groupe (b) qui renferme deux méthodes avec les valeurs les plus faibles représenté par l'infusion et la macération

1.4.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de l'extrait brut de la tige d'*Ephedra alata* est déterminée en utilisant les méthodes du trichlorure d'aluminium ; Celle ci a été calculée en mg ECAT/g MS à partir des équations de la régression linéaire du courbe d'étalonnage exprimées en µg équivalent catéchine: $Y = 0.0229 X - 0.0198$ (Annexe 3).

La figure 19 présente les teneurs de la tige de l'*Ephedra alata* en flavonoïdes, la teneur la plus élevée est obtenue par la méthode de décoction: 6.24 ± 1.86 mg ECAT/g MS, suivies par la méthode d'infusion avec une teneur de 3.91 ± 1.03 mg ECAT/g MS, et les en dernier la méthode de macération avec une teneur de 1.85 ± 0.32 mg ECAT/g MS.

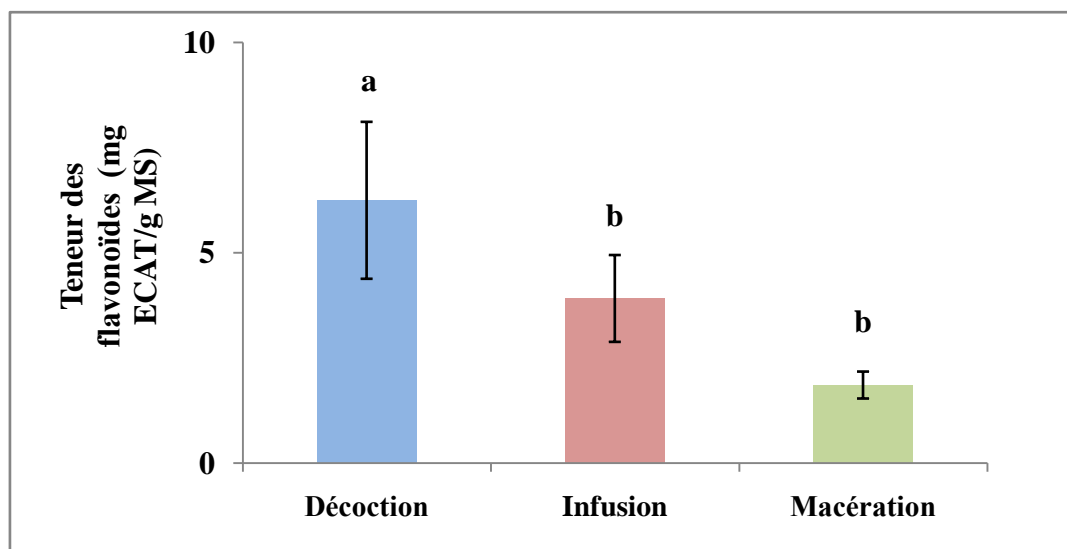


Figure 19 : Teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques par différentes méthodes d'extraction d'*Ephedra alata*
a, b groupe par le teste de Tukey

L'analyse de la variance, représentée dans le tableau 11, révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.001$).

Tableau 11 : Analyse de la variance des résultats du dosage des flavonoïdes des tiges de la plante *E. alata*.

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	48.29	24.143	15.58	0.000	***
Erreur	12	18.60	1.550			
Total	14	66.88				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

Les résultats du test de Tukey fait ressortir deux groupes homogènes, le groupe (a) représente par la méthode de la valeur la plus élevée en comparaison avec le 2^{ème} groupe (b) qui renferme deux méthodes avec les valeurs les plus faibles. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey.

1.4.3. Dosage des flavonoïdes aglycones

La figure 20 présente les teneurs des tiges de l'*Ephedra alata* en flavonoïdes aglycones, la teneur la plus élevée est obtenue par la méthode de décoction: 8.54 ± 1.05 mg ECAT/g MS, suivies par la teneur obtenue par la méthode d'infusion: 7.66 ± 0.67 mg ECAT/g MS, et les teneurs faibles sont obtenues par la méthode de macération: 6.10 ± 0.69 mg ECAT/g MS

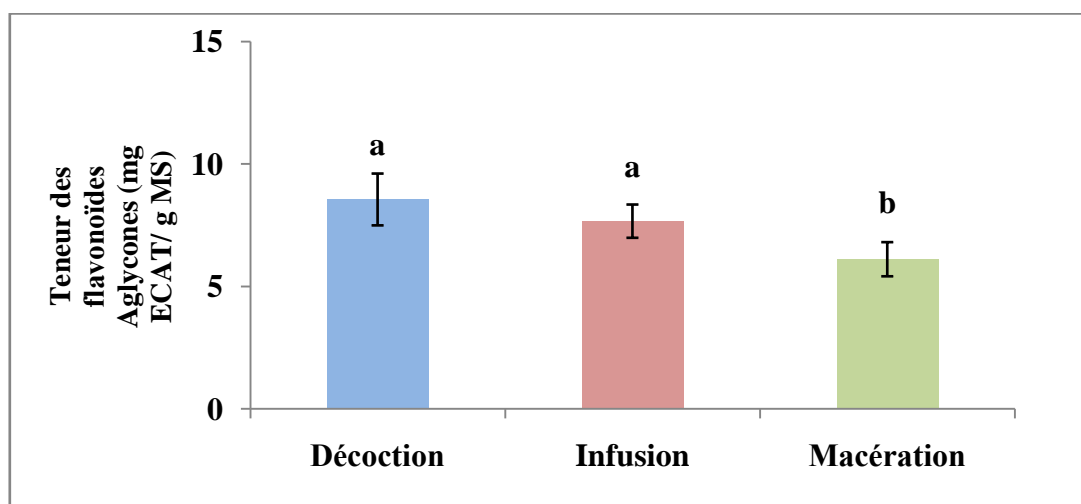


Figure 20: Teneurs en flavonoïdes aglycones de trios extraits méthanoliques d'*E. alata*
a, b groupe selon le test de Tukey

L'analyse de la variance, représentée dans le tableau 12, révèle des différences hautement significatives ($p < 0.01$).

Tableau 12: Analyse de la variance des flavonoïdes aglycones des trois méthodes d'extraction chez les tiges de la plante *E. alata*.

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	15.252	7.6260	11.07	0.002	**
Erreur	12	8.266	0.6888			
Total	14	23.518				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

Les résultats du test de Tukey font ressortir deux groupes homogènes, le groupe (a) pour la décoction et l'infusion en comparaison avec le 2^{ème} groupe (b) la macération. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey

1.4.4. Dosage des anthocyanes

La teneur en anthocyanes de l'extrait brut des tiges d'*Ephedra alata* est déterminée selon la modification de leurs couleurs en fonction du pH.

Les résultats obtenus sont présentés par la figure 21, elle montre que la plus forte valeur a été obtenue par la méthode d'infusion 1.44 ± 0.27 mg/g MS suivie par la teneur obtenue par la méthode de décoction 1.28 ± 0.38 mg/g MS et la teneur plus faible est obtenue par la méthode de macération 0.33 ± 0.08 mg/g MS.

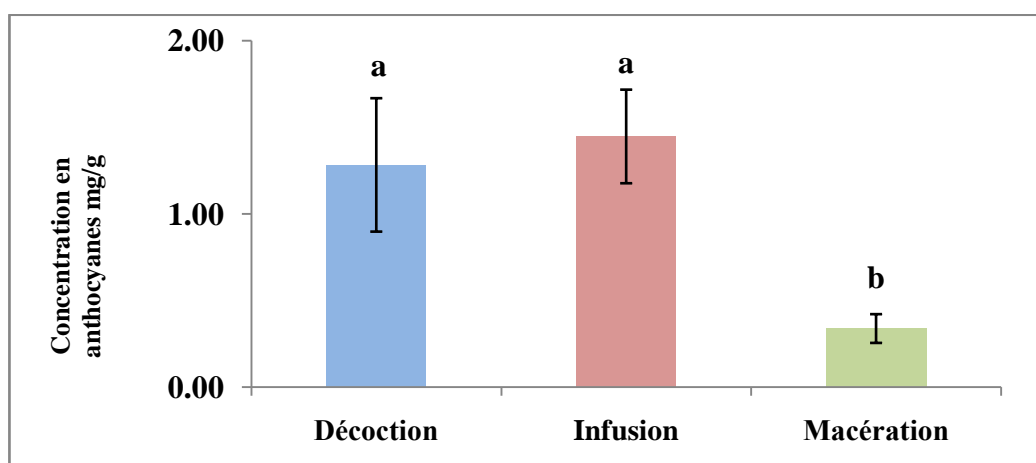


Figure 21: Teneur en anthocyanes des trois extraits méthanoliques d'*Ephedra alata*
a, b groupe selon le test de Tukey

L'analyse de la variance, représentée dans le tableau13, révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.001$).

Tableau 13 : Analyse de la variance des résultats du dosage des anthocyanes des tiges de la plante *E. alata*.

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	5.741	2.87050	37.67	0.000	***
Erreur	21	1.600	0.07621			
Total	23	7.341				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

Les résultats du test de Tukey font ressortir deux groupes homogènes, le groupe (a) représenté par la décoction et l'infusion avec des valeurs élevées en comparaison avec le 2^{ème} groupe (b) macération qui renferme la méthode de la valeur la plus faibles.

1.4.5. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés de l'extrait brut des tiges d'*Ephedra alata* est déterminé par la méthode de la vanilline en milieu acide, Celle ci est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimées en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS):

$$Y = 0.2504X - 0.0011 \text{ (Annexe 4).}$$

La figure 22 présente les teneurs des tiges de l'*Ephedra alata* en tanins condensés. La teneur la plus élevée est obtenue par la méthode de décoction: 0.30 ± 0.04 mg EAT/g MS Suivie par la méthode d'infusion: 0.16 ± 0.07 mg EAT//g MS, et en dernier lieu la macération: 0.06 ± 0.02 mg EAT//g MS.

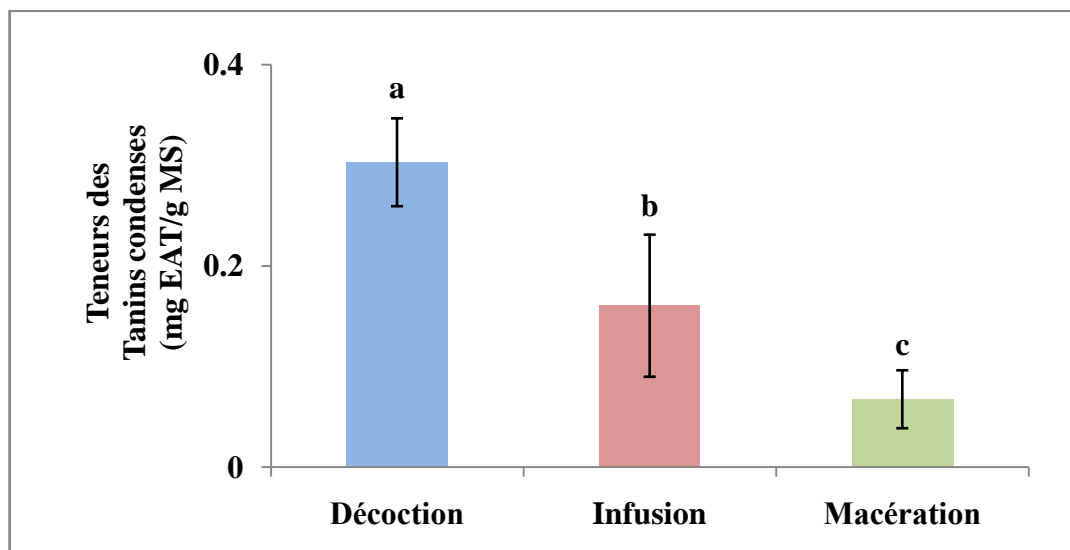


Figure 22: Teneurs en tannins condensés par les trois méthodes d'extraction de extrait méthanolique d'*E. alata*
a, b et c groupe de comparaison par le test de Tukey

L'analyse de la variance, représentée dans le tableau 14, révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.001$) entre les méthodes d'extraction.

Tableau 14 : ANOVA des résultats du dosage des anthocyanes des tiges de la plante *E. alata*.

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	0.14085	0.070423	27.35	0.000	***
Erreur	12	0.03089	0.002574			
Total	14	0.17174				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

Les résultats du test de Tukey fait ressortir trois groupes, la décoction suivie par l'infusion et en dernier la macération.

1.5. activités antioxydantes

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de la plante a été réalisée par deux techniques chimiques (la réduction de fer et le piégeage du radical libre DPPH).

1.5.1. L'activité antioxydant au DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits. La figure montre que les extraits

d'*Ephedra alata* obtenues par différents méthodes d'extraction sont présentes un effet en comparaison avec l'antioxydant standard « acide ascorbique ».

Le pourcentages d'inhibitions est de l'ordre de $(57.87 \pm 23.94\%)$ exercé par l'antioxydant standard (acide ascorbique) suivi par l'extrait obtenu par décoction $(56.51 \pm 23.95\%)$ puis l'extrait obtenu par infusion $(55.34 \pm 25.31\%)$ et enfin l'extrait obtenues par macération $(53.1698 \pm 29.7374\%)$

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, les résultats sont exprimés en termes d'IC₅₀ (concentration de substrat qui inhibe 50% de radicaux DPPH présent dans le milieu réactionnel). Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité de l'extrait testé est élevée.

L'IC₅₀ est déduit à partir de l'équation de régression correspondant à sa courbe d'étalonnage et exprimé en mg/ ml $Y = 304.15 X + 4.8642$ pour l'acides ascorbique (Annexe 5).

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le **tableau 15**.

Tableau 15: comparaison de l'IC₅₀ des extraits des tiges d'*Ephedra alata*

	décoction	infusion	macération	VIT C
IC50 (mg/ml)	0.18	0.20	0.21	0.14

L'extrait de l'*Ephedra alata* obtenu par macération montre une activité antiradicalaire élevée avec une IC₅₀ de 0.14 mg/ml de DPPH ce qui identique a l'IC₅₀ du contrôle positif a la bibliographie. L'extrait obtenu par décoction enregistre une meilleur IC₅₀ de 0.18 mg/ml de DPPH, suivé par l'extrait obtenu par infusion avec IC₅₀ de 0.20 mg/ml de DPPH et en dernier lieu la macération montre une IC₅₀ de 0.21 mg/ml de DPPH

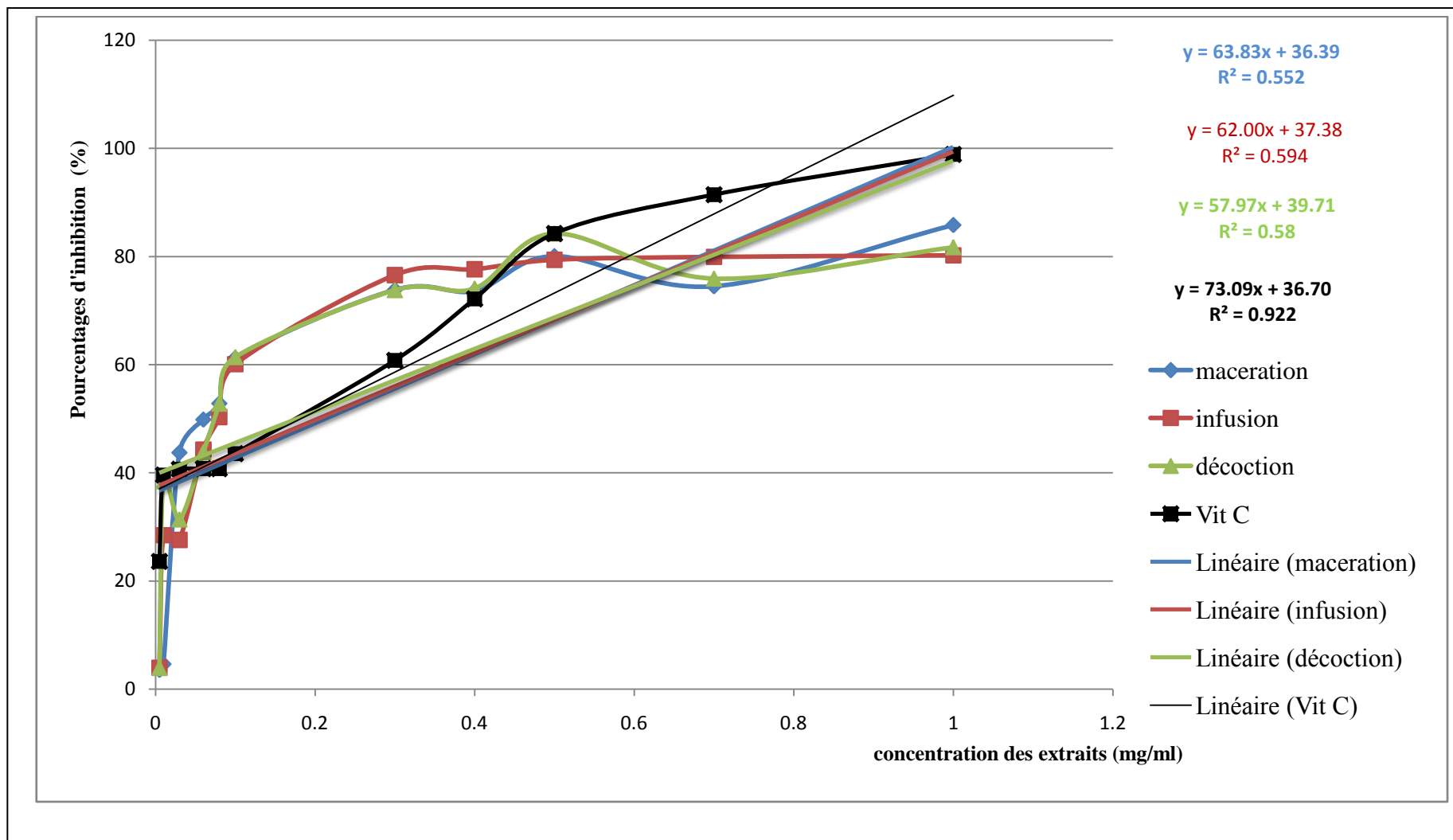


Figure 23: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait de la macération, décoction et infusion.

L'analyse de la variance de pourcentages d'inhibitions représentée dans le tableau a montré des résultats non significatifs entre de différentes méthodes d'extraction

Tableau 16 : Analyse de la variance de pourcentages d'inhibitions des extraits des tiges de la plante *E. alata*

Source	DL	SC	CM	F	p	
Méthodes	2	444.6	222.3	0.36	0.704	NS
Erreur	30	18782.4	626.1			
Total	32	19227.0				

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif. NS non Significatif

1.5.2. Réduction de fer : FRAP

Les résultats de l'activité réductrice des extraits méthanolique d'*Ephedra alata* sont représentés dans la figure 27. Le pouvoir réducteur de fer est calculé à partir d'équation de la régression linéaire $Y = 5,3689 X + 0,1097$ de courbe d'étalonnage du contrôle positif (acide ascorbique) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons (Annexe 6)

Les résultats obtenus montrent que les extraits brut de la tige d'*Ephedra alata* possèdent un pouvoir réducteur de fer. Ces résultats sont exprimés en pourcentage (%). Où on trouve que le pouvoir réducteur de fer le plus élevée est obtenue par la méthode de décoction: 18.14 ± 1.74 EAA/ g MS Suivies par le pouvoir obtenue par la méthode de d'Infusion: 10.62 ± 2.13 EAA/ g MS Tandis que les teneurs faibles obtenue par la méthode macération: 8.7 ± 1.27 EAA/ g MS.

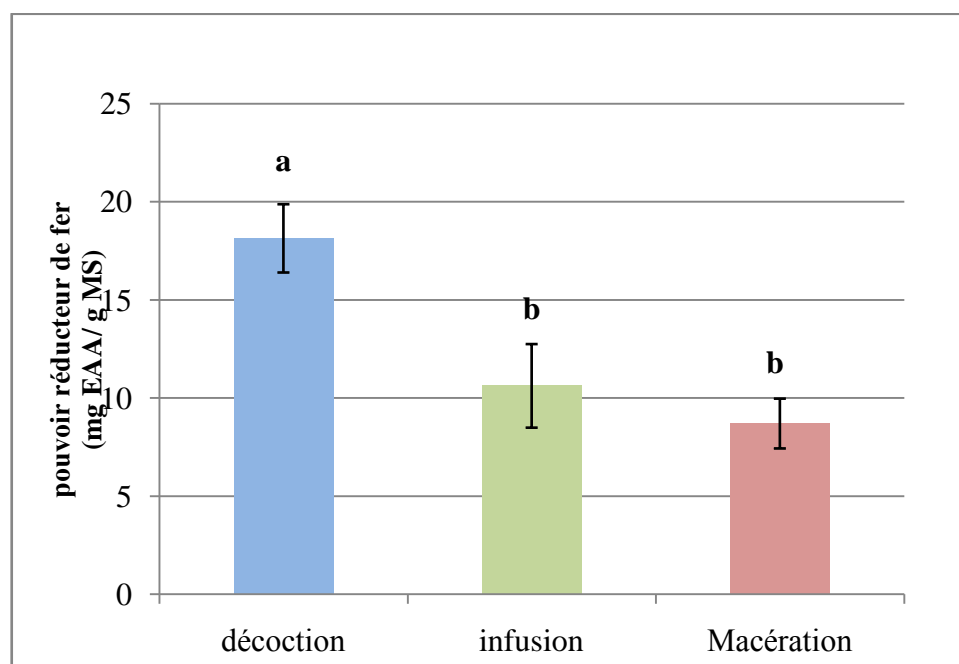


Figure 24: Pouvoir réducteur du fer des extraits méthanoliques bruts de *E. alata*
a, b groupe de comparaison par le test de Tukey

L'analyse de la variance, représentée dans le tableau 17, nous révèle des différences entre les méthodes et qui sont très hautement significatives ($p < 0.001$).

Tableau 17: Analyse de la variance pouvoir réducteur de fer des extraits méthanoliques bruts de *E. alata*

Source	DL	SC	CM	F	p
Méthodes	2	2987319	1493659	48.90	0.000
Erreur	15	458201	30547		
Total	17	3445520			

*** Très hautement significatif. **Hautement significatif. *Significatif.

Les résultats du test de Tukey fait ressortir deux groupes homogènes, le groupe (a) pour la décoction suivie par un 2^{ème} groupe (b) formé par l'infusion et la macération.

2. Discussion Générale et Conclusion

Les analyses phytochimiques des extraits est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants bioactives responsables des vertus thérapeutiques ce qui indique que la plante est parmi les plantes médicinales. (Sofowora, 1993 ; Konkon *et al.*, 2006).

Notre travail a mis en évidence cinq sur onze des principes actifs testés dans les tiges de la plante *Ephedra alata*. Ces résultats sont conformes à ceux de **Kessal et Bouafia (2003)** et **Kabili (2013)** effectués sur l'évolution de quelques activités biologiques des extraits d'*Ephedra alata* de la région d'Ouargla où ils mettent en évidence des polyphénols, des tannins catéchiques et des anthocyanes . Il est de même pour les résultats des travaux de **Bourmita *et al.* (2013)** qui ont mis en évidence la présence des alcaloïdes. La présence d'un grand nombre de principes actifs laisse suggérer que *E.alata* possède des propriétés pharmacologiques non négligeables.

L'essai des cendres totales permet d'informer sur la teneur en minéraux, ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques dont elle est très riche. La teneur en cendres totales a été évaluée à **8.11%**, ce résultat est proche des résultats des travaux de **Chehema *et al.* (2010)** effectués sur les valeurs nutritionnelles de plantes vivaces des parcours sahariens algériens pour dromadaires où ils trouvent une teneur en cendre de **10.2%** chez l'*E. alata*.

Après la confirmation de la présence des principes actifs du groupe des polyphénols dans notre plante, la recherche des meilleurs volumes d'extraction solvant /eau par le calcul des rendements extractibles par l'eau et le méthanol a été faite. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre les rendements d'extraction hydrique et méthanolique, delà un mélange hydro-méthanolique a été effectué avec des volumes basés sur la différence des moyennes obtenues. Notre choix est basé notamment sur certains travaux tels que **Mahmoudi *et al.* (2013)** effectués sur l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) à savoir que l'extraction par l'eau et le méthanol ont donné les meilleurs valeurs.

Une fois le volume d'extraction fixé l'extraction a été faite par macération, décoction et infusion.

Les résultats obtenus pour les rendements après extraction montre une déferance entre les méthodes d'extraction, ces résultats sont confirmés par les travaux de **Lehout et Laib, (2015)** effectués sur *Artemisia herba alba* pour les méthodes d'infusion et de macération où ils trouvent respectivement un rendement de 28.4 % et 13.3%. Nos résultats pour l'infusion et la décoction sont accord avec cette études où on note un rendement de 21 % pour la décoction. Les travaux de **Haoulia, (2015)** effectués sur la partie aérienne d'*Ammoïdes verticillata* montrent un rendement de 14% et de 7% repectivement pour la macération et la décoction.

Il est à noter que la comparaison des rendements avec les résultats de la bibliographie est délicat car le rendement d'un extrait n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Delà, la variation des rendements d'une plante montre une variabilité des teneurs en principes actifs (**Mahmoudi et al.,2013**).

Afin de caractériser quantitativement les extraits préparés à partir des tiges d' *E. alata*, des dosages sont effectués afin de déterminer les teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonoïdes aglycones, des tanins condensés et des anthocyanes.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux indiquent que les trois extraits méthanoliques contiennent des teneurs variées entre 58.3717 et 27.0346 mg EAG/g MS respectivement pour decoction et infusion, ces résultats concordent avec les résultats de **Jarada et al. (2015)** pour l'extrait méthanolique avec l'*E. alata* qui contient 47.62 ± 0.94 mg EAG/g MS par macération, alors que les résultats de **kebili (2016)** montre une teneur plus élevée de 291.45 ± 4.37 mg EAG/g MS aussi par macération dans le solvant hydro-methalique. Nos résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenues par **Uddin et al. (2012)**, effectué sur *Portulaca oleracea* L. qui ont obtenus des concentrations variées entre 1.428 et 3.603 mg EAG/g pour différentes des extraits

L'évaluation quantitative des flavonoïdes indiquent que les trois extraits méthanoliques contiennent des teneurs variées entre 6.24 et 1.85 mg ECAT/g MS en fonction des méthodes d'extraction. Les résultats de **Jarada et al. (2015)** avec l'utilisation d'un contrôle positif qui est la rutine enregistre chez *E. alata* 54.66 ± 0.12 mg ERU/g MS dans un extrait méthanolique.

D'après **Guenzat, (2012)** les résultats du dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux de *Portulaca oleracea* été estimés de 0,14µg EC/mg d'extrait sec, qui est un taux très faible comparé nos résultats.

Nos résultats sont inférieurs à ceux déterminés par **Uddin et al. (2012)** qui ont obtenus des concentrations de 28 mg ER/g MS pour l'extrait aqueux, 41mg ER/g MS pour l'extrait hydroéthanolique et 49 mg ER/g MS pour l'extrait méthanolique.

De fortes teneurs en flavonoïdes impliquent des rôles très importants dans la coloration des végétaux, la protection des plantes contre le stress hydrique et génère une tolérance des plantes aux métaux lourds (**Ribéreau- Gayon et Reynaud, 1968**). Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques. Ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radicaire (**Makhloufi, 2010**).

Les teneurs obtenues en tannin sont comprises entre 0.30 et 0.06 mg EAT/ g MS d'*E. alata* pour respectivement la décoction et la macération .Ces résultats sont inclus dans l'intervalle déterminé par l'étude de **Ricco et al. (2003)** effectuée sur la famille des Ephedraceae où ils notent des teneurs en tanins condensés comprises entre $2,47 \pm 0,41$ et $0,01 \pm 0,0082$ mg EAT/ g MS.

Les tanins sont utilisés pour le traitement des maladies respiratoires et la toux, d'autres vertus leurs sont attribués , ainsi les tanins exercent une activité anti-diarrhéique. Antiseptiques, antibactériennes et antifongiques. Les tanins possèdent une forte activité anti- oxydante, ce sont des très bons pièges à radicaux libres et ils inhibent la formation de radicaux superoxydes (**Badiaga, 2011**). En parallèle, le goût amer d'*Ephedra* expliqué par la présence de tannins dans *E.alata*, la rende impropre à la consommation pour les insectes ou le bétail (**Eberhard et al., 2005**).

L'évaluation quantitative des flavonoïdes aglycone et des anthocyanes indiquent que les extraits méthanoliques des trois méthodes d'extraction contiennent des teneurs variées respectivement de 8.54 ± 1.05 à 6.10 ± 0.69 mg ECAT/g MS et de 1.44 ± 0.02 à 0.33 ± 0.08 mg/g MS . Pour les deux paramètres aucune différence significative entre la décoction et l'infusion qui sont nettement supérieures à la macération; une études réalisée par **N'Guessan et al. (2012)** effectuée sur les teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales en Côte d'Ivoire montrent des teneurs en anthocyanes équivalentes aux notre

avec 1.07 ± 0.03 à 0.5 ± 0.007 mg/g, ce qui montre qu'*E. alata* contient une quantité importante en principes actifs.

Ces composées possèdent un large panel de propriétés médicinales. Certains alcaloïdes sont antimicrobiennes ou/et employés pour traiter certains cancers (**Omulokoli et al., 1997**). Ainsi que la présence des alcaloïdes font d'elle aussi une plante pouvant être toxique.

Le stress environnemental, sécheresse, la pauvreté du sol en nutriments ainsi que le fort ensoleillement, peuvent contribuer à l'augmentation du niveau de production des composés phénoliques chez certaines plantes (**Timmermann et al., 1984 in Kebili, 2016**).

Les teneurs élevées en polyphénols totaux par comparaison aux, flavonoïdes, flavonoïdes Aglycones, anthocyanes et Tanins condensés, sont logiques, ainsi que Les teneurs élevées en flavonoïdes par rapport aux anthocyanes et Tanins condensés étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (**Boussahel, 2011**).

Les résultats des teneurs obtenues par les méthodes de macération et décoction sont confirmées par les résultats obtenues par **Harrar (2012)** effectuées sur les extraits de *Rhamnus alaternus* L. où il a conclu que le solvant chaud est le solvant qui permet d'avoir le plus de teneurs en différents composés phénoliques en comparaison au solvant froid, ce qui peut être expliqué par la lyse des cellules dans l'eau chaude et la libération d'un maximum de molécules poly-phénoliques.

Selon **Vuong et al. (2013)** cette variation de la quantité des polyphénols est due à la température et le temps d'extraction de l'échantillon.

Nos résultats sont en accord aussi avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux de **Jokić et al. (2010)** effectués sur Soja pour les teneurs des polyphénols, flavonoïdes, tanins et anthocyanes obtenues par les méthodes de décoction et d'infusion où ils trouvent que l'augmentation de la température favorise la diffusion et la solubilité des substances extraites.

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Jovanovic et al., 1994**)

La valeur de l'IC50 de l'acide ascorbique que nous avons trouvé (0.14 mg/ml) est proche de celle trouvée par **Talbi et al., (2015)** qui est de l'ordre de 0,13879 mg/ml. Les IC50 des différents extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction sont de l'ordre de 0.18 à 0.21 mg/ml ils sont en accord avec plusieurs travaux. **Khadri et al. (2010)** ont démontré sur différents extraits de *Cymbopogon schoenanthus* (une plante saharien) en Tunisie, une forte activité antioxydante avec un IC50 de 0.17 mg/ml. Il est de même pour **Jarada et al. (2015)** dont l'activité antioxydante d'*E. alata* est de l'ordre de 0.16 mg/ml pour un extrait méthanolique obtenu par une extraction au soxhlet.

Les extraits des tiges d'*E. alata* présentant un pouvoir antioxydant au DPPH ont été aussi estimé par un deuxième test d'activité antioxydante qui est le test FRAP. L'extrait obtenu par la décoction présente le meilleur pouvoir réducteur de fer par rapport à l'acide ascorbique. La comparaison des deux tests de l'activité anti oxydante sont concordants.

Selon Parsaeimehr *et al.* (2010), l'activité antioxydante des extraits méthanoliques (90%) des parties aériennes obtenus de 3 espèces d'*Ephedra* iranienne : *E. procera*, *E. pachyclada* et *E. strobilacea* testées par la méthode de FRAP étaient de 464.43, 452.82 et 467.33 mg EQ/ g d'extrait respectivement. Ainsi que l'étude de Kebili (2016), a montrée un pouvoir reducteur de fer de 419.12 ± 6.02 au niveau des tiges.

En conclusion à ce travail, il s'avère que pour la quasi-totalité des paramètres étudiés la décoction est le meilleur moyen d'extraire des teneurs élevées en comparaison avec la macération qui restera le dernier recours pour une extraction. L'infusion est partagé entre la décoction et la macération selon le composé phénolique à extraire. L'extraction à chaud est le meilleur résultat obtenu d'après les teneurs obtenues des composés phénoliques à partir des tiges d'*E. alata*.

Les composés phénoliques, flavonoïdes et tanins contenus dans *E. alata* peuvent être responsables de son activité de piégeage des radicaux libres. Donc, pourraient servir de source potentielle de médicaments à base de cette plante.

Ce travail est une contribution qui ajoute un peu pour faire un tout autour de *Ephedra alata* pour le choix des solvants et des méthodes d'extraction qui restent à explorer et à exploiter.

Notre travail reste une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies:

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Un fractionnement des extraits et identification des molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques d'identification plus performantes.
- Evaluation de l'autre activité biologique éventuelle telle que l'activité antibactérienne, antifongique...
- De faire des tests in vivo afin de vérifier les propriétés biologiques des différents composants de la plante étudiée.
- Utilisation d'autres méthodes d'extraction

Références bibliographiques

A

- **Abourashed, E. A., El-Alfy, A. T., Khan, I. A., & Walker, L. (2003).** *Ephedra* in perspective—a current review. *Phytotherapy Research*, 17(7), 703-712.
- **Afnas'eva, I. B., Ostrakhovitch, E. A., Mikhal'chik, E. V., Ibragimova, G. A., & Korkina, L. G. (2001).** Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical pharmacology*, 61(6), 677-684.
- **Alilou, H. (2012).** Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc: *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC.
- **AL-Qarawi A.A., Abd_Allah E.F. et Abeer H., (2011).** *Ephedra alata* as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, N°16, pp. 2297-2303
- **Al-Qarawi, A. A., Abd Allah, E. F., & Hashem, A. (2012).** Effect of *Ephedra alata* on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus*. *Pakistan Journal Of Botany*, 44(1), 425-428.
- **Aurousseau, B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *Productions animales*, 15(1), 67-82.
- **Avissar, N., Whitin, J. C., Allen, P. Z., Wagner, D. D., Liegey, P., & Cohen, H. J. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 264(27), 15850-15855.

B

- **Badiaga, M. (2011).** *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II). p 10.

- **Bellakhdar, J. (1997).** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires-Saint-Etienne, Edit. Ibis, 177.
- **Benayache, F. (2005).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*,
- **Benhammou, N. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Doctoral dissertation). 113p.
- **Benzidan, D. (2011).** *Effet d'une supplémentation de l'aliment avec de l'antioxydant (Buthylhydroxytoluène, vitamine E et C) sur le stress oxydatif chez le tilapia du Nil (Oreochromis niloticus)* (Doctoral dissertation, Université Ahmed Ben Bella d'Oran1 Es Senia). Pp: 57.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79-82.
- **Boozer, C. N., Nasser, J. A., Heymsfield, S. B., Wang, V., Chen, G., & Solomon, J. L. (2001).** An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *International journal of obesity*, 25(3), 316.
- **Bouheroum, M., (2007).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes: *Rhantherium adpressum et Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE
- **Bourmita, Y., Cheriti, A., Ould El Hadj, M. D., Mahmoudi, K., & Belboukhari, N. (2013).** Anti-termitic Activity of Aqueous Extracts from Saharan Toxic Plants Against *Anacanthotermes ochraceus*". *Journal of Entomology*, 10, 207-213.
- **Bourzeix, M., Weyland, D., & Heredia, N. (1986).** A study of catechins and procyanidins of grape clusters, of wine and other by-products of wine. 1. Physiological interest, chemical nature of catechins and procyanidins; 2. Research works, [high performance liquid chromatography; grape jelly]. *Bulletin de l'OIV (France)*.
- **Boussahel, S., (2011).** Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Thèse de Magister en Biologie et Physiologie végétale. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 86 P.

- **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris.
- **Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E., & Crozier, A. (2002).** Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3337-3340.
- **Bahorun, T. (1998, March).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (p. 83).

C

- **Caveney, S., Charlet, D. A., Freitag, H., Maier-Stolte, M., & Starratt, A. N. (2001).** New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). *American journal of botany*, 88(7), 1199-1208.
- **Chaieb, M., Delaigue, M., Guittonneau, G., Arousseau, R.P. (2008).** Voyage botanique en Tunisie méridionale, faculté des sciences de Sfax.
- **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*, Vol. 6, N°3, pp. 27-30
- **Chehma, A., & Abdelhamid, H. (2012).** Equations de prévision du poids des principales plantes spontanées vivaces des parcours sahariens.
- **Chehma, A., Faye, B., & Bastianelli, D. (2010).** Valeurs nutritionnelles de plantes vivaces des parcours sahariens algériens pour dromadaires. *Fourrages*, (204), 263-268.
- **Chen, W. L., Tsai, T. H., Yang, C. C., & Kuo, T. B. (2010).** Effects of ephedra on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *Journal of ethnopharmacology*, 130(3), 563-568.
- **Chopra C., Abrol B. K. et Handa K. L., (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérées sur tout du point de vue botanique: lièrèpartie. Recherche sur les zones

arides XIII. Ed. UNESCO, Rome, 97 p.

- **Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Cristina, P., Ilonka, S., et Bartek, T. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4. 25-39.
- **Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2008).** *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- **Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2001).** Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2459-2464.
- **Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2016).** *Natural products from plants*. CRC press.

D

- **Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005).** A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.
- **Derbel, S., Touzard, B., Triki, M. A., & Chaieb, M. (2010).** Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(7), 471-474.
- **Diallo, A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtaceae). Thèse de doctorat. Bamako, 99p.
- **Dibert, K. (1989).** *Contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert* (Doctoral dissertation, Lyon 1).
- **Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.

E

- **Eberhard, T., Robert, A., & Annelise, L. (2005).** Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.*
- **Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., ... & Messina, M. (2007).** Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, 137(3), 718S-737S.
- **Erdman, J. W., Bierer, T. L., & Gugger, E. T. (1993).** Absorption and transport of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691(1), 76-85.
- **Evans, W. C. (2009).** *Trease and Evans' pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences.

F

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- **Fang, F., Li, J. M., Pan, Q. H., & Huang, W. D. (2007).** Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101(1), 428-433.
- **Fraga, C. G. (Ed.). (2009).** *Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology* (Vol. 1). John Wiley & Sons.

G

- **Ganther, H. E. (1999).** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20 (9), 1657-1666.
- **Gao, L., & Mazza, G. (1996).** Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science*, 61(3), 600-603.
- **Garait, B. (2006).** *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I). pp: 195
- **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.

- **Gauche, É., & Hausswirth, C. (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Movement & Sport Sciences*, (2), 43-66.
- **Ghanem, S., & El-Magly, U. I. (2008).** Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from the medicinal Ephedra alata male plant. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 3(1), 7-15.
- **Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., & Orecchioni, A. M. (2001).** Le préparateur en pharmacie. *Dossier*, 2, 272.
- **Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A. (2013).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *JAPS*, 17(1), 2388-2411.
- **Gilbert, B. L., & Norris, D. M. (1968).** A chemical basis for bark beetle (Scolytus) distinction between host and non-host trees. *Journal of Insect Physiology*, 14(8), 1063-1068.
- **GOMEZ, C. (2009).** Etude de mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes (Doctoral dissertation, John Innes Centre).
- **Gorham, J. (1977).** Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and Hydrangea. *Phytochemistry*, 16(2), 249-253.
- **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- **Gross, G. G. (1992).** Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins. In *Plant polyphenols* (pp. 43-60). Springer US.
- **Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C. (2007).** Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, 101(4), 1558-1564.

H

- **Hadj Salem, J. (2009).** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique (Doctoral dissertation, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).

- **Haoulia A., (2015).** Tests phytochimiques, dosage et recherche d'effet hémolytique des polyphénols totaux extraits de la partie aérienne d'*Ammoïdes verticillata*. Mémoire de Master en biologie. Université Abou Bekr Belkaid. Algérie. Pp 30.
 - **Harrar, A.E.N., (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 73 p.
 - **Haslam, E. (1998).** *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge University Press.
 - **Haslam, E., & Cai, Y. (1994).** Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 11, 41-66.
 - **Hegazi, G. A. E. M., & 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.
 - **Heller, R., Esnault, R., et Delance, C. (1998).** physiologie végétale 1-nutrition 6ème édition. Dunod. Paris, Pp 289-288.
 - **Heller, W., Forkmann, G., & Harborne, J. B. (1994).** The Flavonoids: advances in research since 1986. *Secondary plant products. Encyclopedia of plant physiology*, 399.
 - **Hikino, H., Takahashi, M., & Konno, C. (1982).** Structure of ephedrannin A, a hypotensive principle of *Ephedra* roots. *Tetrahedron Letters*, 23(6), 673-676.
 - **Hong, J. H., Kim, M. J., Park, M. R., Kwag, O. G., Lee, I. S., Byun, B. H., ... & Rhee, S. J. (2004).** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica chimica acta*, 340(1), 107-115.
 - **Hoult, J. R. S., & Paya, M. (1996).** Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 713-722.
 - **Hulbert, A. J. (2005).** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of theoretical biology*, 234(2), 277-288.
- J**
- **Jarrige, R. (1988).** Alimentation des bovins, ovins et caprins ; Ed. INRA, PARIS, 471p.

- **Jacques, B., et André, R., (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219.
- **Jaradat, N., Hussen, F., & Al Ali, A. (2015).** Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of *Ephedra alata* Decne. *J Mater Environ Sci*, 6(6), 1771-8.
- **Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bučić-koJić, A., PIANiNić, M., & ToMAS, S. (2010).** Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech journal of food sciences*, 28(3), 206-212.
- **Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846-4851.

K

- **Kamra, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. (2006).** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In *International Congress Series* (Vol. 1293, pp. 156-163). Elsevier.
- **Karmakar, I., Dolai, N., Saha, P., Sarkar, N., Bala, A., & Haldar, P. K. (2011).** Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 11(4), 221-228.
- **Kebili, Z., (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de la région d'Ouargla. UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA. Mémoire de MAGISTER en Biologie. Pp 53.
- **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.
- **Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Falé, P., Lino, A. R. L., Serralheiro, M. L. M., & Araújo, M. E. M. (2010).** Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 331-336.
- **Khanbabae, K., & van Ree, T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.

- **Khenaka, K.,(2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine. Algérie.81p.
- **Konkon, N. G., Simaga, D., Adjoungova, A. L., KE, N. G., ZIRIHI, C., & Kone, B. D. (2006).** Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 14, 73-80.
- **Konno, C., Mizuno, T., & Hikino, H. (1985).** Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A, B, C, D and E, glycans of *Ephedra distachya* Herbs1. *Planta medica*, 51(02), 162-163.
- **Konno, C., Taguchi, T., Tamada, M., & Hikino, H. (1979).** Ephedroxane, anti-inflammatory principle of *Ephedra* herbs. *Phytochemistry*, 18(4), 697-698.
- **Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2007).** Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 21(7), 615-621.

L

- **Lamamra, M., (2010).** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Mémoire de Magistère en Biologie et Physiologie Végétale . Université. Ferhat Abbes. Sétif. pp: 72.
- **Landbo, A. K. R., & Meyer, A. B. S. (2001).** Enzymatic enhancement and antioxidant activities of anthocyanins and other phenolic compounds in black currant juice.
- **Lashermes, G., Nicolardot, B., Parnaudeau, V., Thuriès, L., Chaussod, R., Guillotin, M. L., ... & Tricaud, A. (2009).** Indicator of potential residual carbon in soils after exogenous organic matter application. *European Journal of Soil Science*, 60(2), 297-310.
- **Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin, J., & Houlst, S. (1989).** Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical pharmacology*, 38(17), 2859-2865.
- **Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., & Bouchez, M. P. (1967).** Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. Anal. Fr*, 49(7), 375-383.

- **Lefébure, C. (1999).** *La France des pharmacies anciennes*. Privat.
- **Lehout, R. et Laib, M., (2015).** Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba* Asso. Mémoire de Master en Biochimie moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. Pp 40.
- **Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 30(21), 1076-1081.
- **Leinmüller, E., Steingass, H., & Menke, K. H. (1991).** Tannins in feeds for ruminants. *II Effects on rumen metabolism in vitro. Übersichten zur Tierernährung*, 19, 45-70.
- **Levine, R. L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease 2, 3. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790-796.
- **LEYBROS, J., & FREMEAUX, P. (1990).** Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2, J2780-1.
- **Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.
- **Limberger, R. P., Jacques, A. L. B., Schmitt, G. C., & Arbo, M. D. (2013).** Pharmacological effects of ephedrine. In *Natural Products* (pp. 1217-1237). Springer Berlin Heidelberg.
- **Ling, M., Piddlesden, S. J., & Morgan, B. P. (1995).** A component of the medicinal herb Ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. *Clinical & Experimental Immunology*, 102(3), 582-588.

M

- **Ma, G., Bavadekar, S. A., Davis, Y. M., Lalchandani, S. G., Nagmani, R., Schaneberg, B. T., ... & Feller, D. R. (2007).** Pharmacological effects of ephedrine alkaloids on human α 1- and α 2-adrenergic receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 214-221.

- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* PPUR Presses polytechniques.
- **Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- **Makhloufi, A. (2010).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre. Thèse de doctorat d'état en biologie, université aboubaker belkaid, Tlemcen. Algérie. 136 p.
- **Makkar, H. P. S. (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, 49(3), 241-256.
- **Mangan, J. L. (1988).** Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition research reviews*, 1(01), 209-231.
- **Mazza, G., & Gao, L. (2005).** Blue and purple grains. *Specialty Grains for Food and Feed*, 45-67.
- **McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., & Krause, D. O. (2001).** Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 83-93.
- **Medareg Narou, B., & Farhi, A. (2009).** Le rôle des services et des investissements dans l'hypertrophie de la ville d'El Oued au bas Sahara algérien. *Environnement Urbain/Urban Environment*, 3, c-1.
- **Mendiola, J. A., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2007).** Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152(1), 234-246.
- **Milane, H. (2004).** *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques* (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg)).

- **Mohammedi, Z. (2013).** *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation). pp: 113
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- **Murray, R. D. H., Méndez, J., & Brown, S. A. (1982).** *The natural coumarins* (pp. 803-4). John Wiley, Chichester.

N

- **N'Guessan, A. H. O., Déliko, C. E. D., Mamyrbékova-Békro, J. A., & Békro, Y. A. (2012).** Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire.
- **Nagarani, G., Abirami, A., Nikitha, P., & Siddhuraju, P. (2014).** Effect of hydrothermal processing on total polyphenolics and antioxidant potential of underutilized leafy vegetables, *Boerhaavia diffusa* and *Portulaca oleracea*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S468-S477.
- **Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- **Nawwar, M. A., El-Sissi, H. I., & Barakat, H. H. (1984).** Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, 23(12), 2937-2939.
- **Nshimiimana, D. S., & He, Q. (2010).** Radical scavenging capacity of Rwandan CTC tea polyphenols extracted using microwave assisted extraction. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(6), 589-593.

O

- **Omulokoli, E., Khan, B., & Chhabra, S. C. (1997).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 56(2), 133-137.
- **Ould El Hadj, M., Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2013).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). n°3, pp.47-51
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr*, 44(6).

- **Ozenda, P. (1991).** *Flora and vegetation of the Sahara*. CNRS. Paris (3^{ème} Ed.). 662 p

P

- **Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- **Paris, M. et Hurabielle, M. (1981).** “Abrégé de Matière Médicale-Pharmacognosie”, tomo 1, y tomo 2. Ed.
- **Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A. (2006).** Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.
- **Perret, C. (2001).** *Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par Botrytis cinerea Pers.: Fr* (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).
- **Peters, C. M., O'Neill, J. O., Young, J. B., & Bott-Silverman, C. (2005).** Is there an association between ephedra and heart failure? a case series. *Journal of cardiac failure*, 11(1), 9-11.
- **Phinney, K. W., Ihara, T., & Sander, L. C. (2005).** Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1077(1), 90-97.
- **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(5), 12-23.
- **Portet, B. (2007).** *Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise: Piper hostmannianum var. herbicense* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214-1218.
- **Privas, E. (2013).** *Matériaux ligno-cellulosiques: "Élaboration et caractérisation* (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris).

R

- **Ratiba, M. (2016).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèces du genre *Genista* (Fabaceae).
- **Ribéreau-Gayon, P., & Gautheret, R. J. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris: Dunod, Paris. France. 254 p.
- **Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965).** Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de la Societe chimique de France*, 9, 2649-2652.
- **Ricco, R. A., Vai, V. M., Sena, G. A., Wagner, M. I., & Gurni, A. A. (2003).** Taninos condensados de *Ephedra ochreatea* miers (Ephedraceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(1), 33-38.
- **Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie.
- **Rira, M. (2006).** Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. *Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, Algérie*.

S

- **Scalbert, A., & Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- **Sebei, K., Boukhchina, S., & Kallel, H. (2007).** Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassica napus* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 330(1), 55-61.
- **Shabana, M. M., Mirhom, Y. W., Genenah, A. A., Aboutabl, E. A., & Amer, H. A. (1989).** Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Archiv fur experimentelle Veterinarmedizin*, 44(3), 389-394.
- **Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- **Soares, A. F. (2005).** *Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: adiponectine et prostaglandines* (Doctoral dissertation, Villeurbanne, INSA).
- **Sofowora, A., (1993).** *Medicinal Plants And traditional Medicine In Africa*. 2e Edition. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria.pp 320.
- **Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 575-586.
- **Soltan, M. M., & Zaki, A. K. (2009).** Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 126(1), 102-107.
- **Soni, M. G., Carabin, I. G., Griffiths, J. C., & Burdock, G. A. (2004).** Safety of Ephedra: lessons learned. *Toxicology letters*, 150(1), 97-110.
- **Spurgeon, S. L., & Porter, J. W. (Eds.). (1981).** *Biosynthesis of isoprenoid compounds*. Wiley.
- **Stahl, W., & Sies, H. (1997).** Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 46(Supplement 2), S14-S18.
- **Strack, D. (1997).** 10 Phenolic Metabolism. *Plant biochemistry*, 387.

T

- **Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., & Sakata, K. (1994).** A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1780-1783
- **Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., Hilali, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4), 1111-1117
- **Tamada, M., Endo, K., Hikino, H., & Kabuto, C. (1979).** Structure of ephedradine A, a hypotensive principle of Ephedra roots. *Tetrahedron Letters*, 20(10), 873-876.

- **Tang, S. Y., & Halliwell, B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(1), 1-5.
- **Torck, M., & Pinkas, M. (1992).** Les flavonoïdes du genre *Vicia*. *Biochemical systematics and ecology*, 20(5), 453-457.

U V

- **Uddin, M. K., Juraimi, A. S., Ali, M. E., & Ismail, M. R. (2012).** Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10257-10267.
- **Van Helden, Y. G., Keijer, J., Knaapen, A. M., Heil, S. G., Briedé, J. J., Van Schooten, F. J., & Godschalk, R. W. (2009).** β -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2), 299-304.
- **Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004).** The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.
- **Vignerot, M. (1954).** Fractionnements par solvants, extraction solide-liquide, extraction liquide-liquide, fractionnements par chromatographie d'adsorption et de répartition, échanges d'ions. Vigot frères.
- **Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997).** The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 135-139.
- **Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013).** Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111.

W Y

- **Weisburger, J. H. (1997).** Tea and health: a historical perspective. *Cancer letters*, 114(1-2), 315-317.

- **Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004).** Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59(3), 113-122.
- **Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4083-4089.

Z

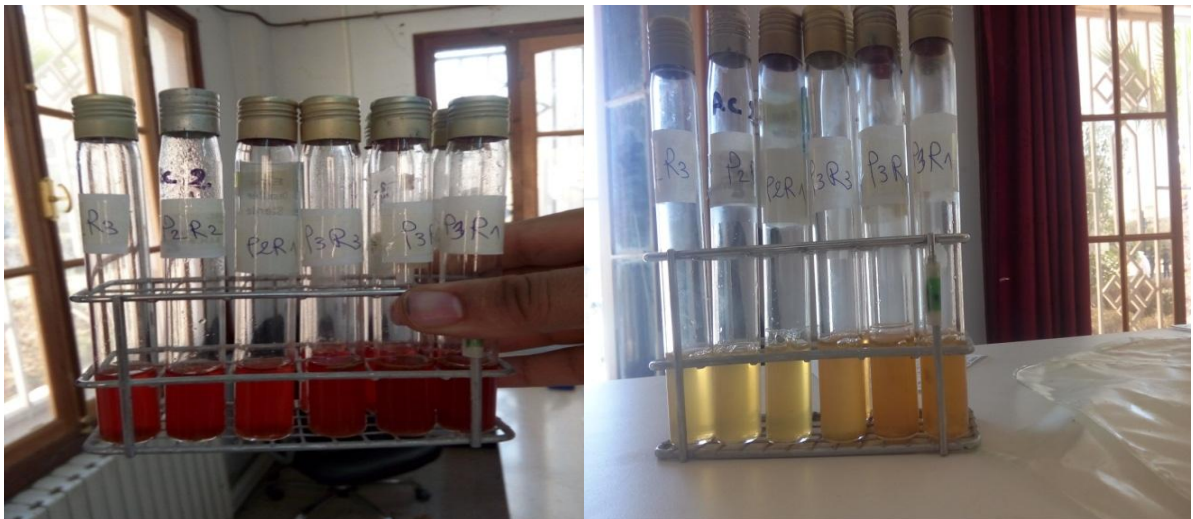
- **Zhishen, J., Mengcheng, T., et Jianming, W. (1999).** Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem*, 64, 555-559.

Annexes

Annexe 01: screening phytochimiques



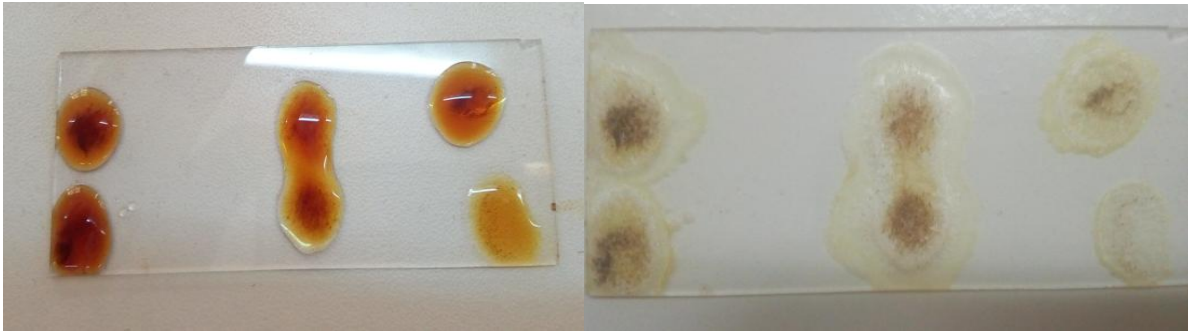
a. Détection chimique des flavonoïdes



b. Détection chimique des leucoanthocyanes



c. Détection chimique des anthocyanes



d. Détection chimique des alcaloïdes



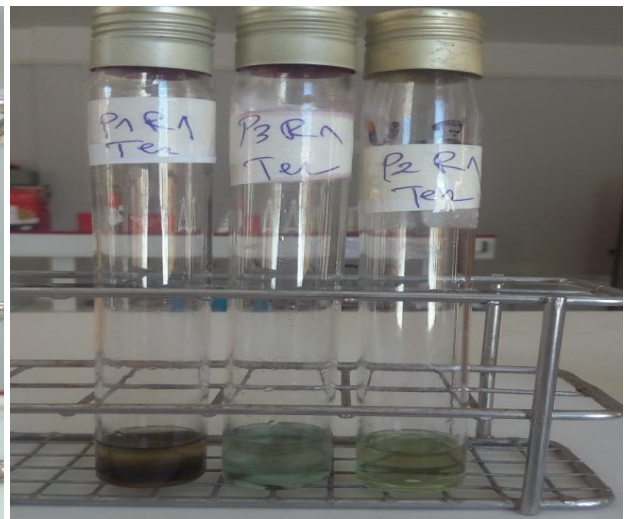
e. Détection chimique des quininés.



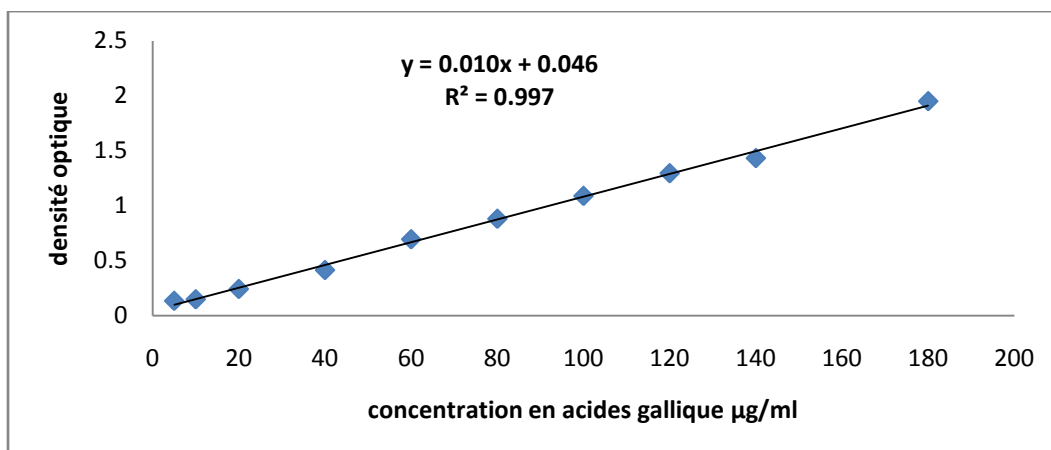
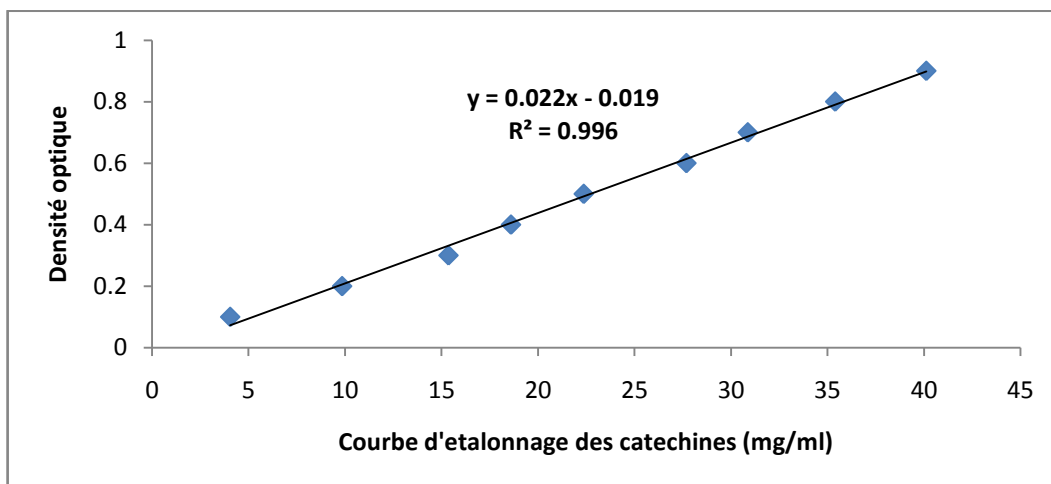
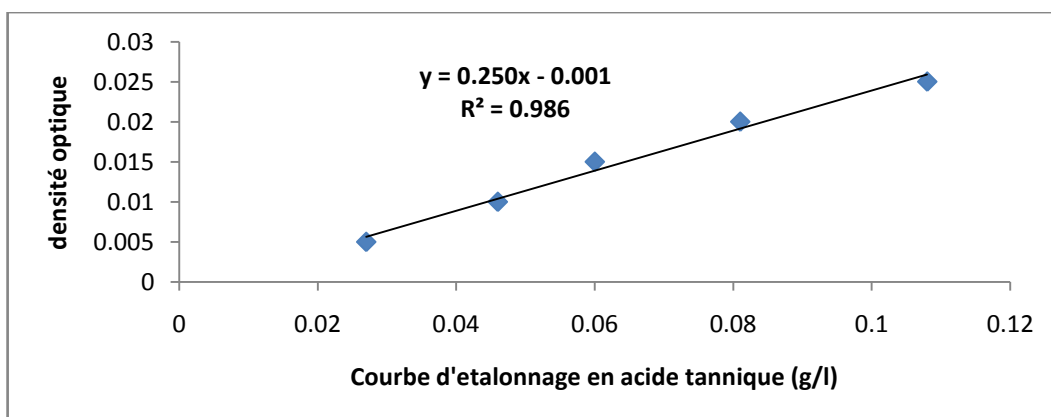
f. Détection chimique des tanins.



g. Détection chimique des stéroïdes



h. Détection chimique des stéroïdes et des terpénoïdes

Annexe 02: courbe d'étalonnage en acide gallique**Annexe 03:** courbe d'étalonnage en catechines**Annexe 04:** d'étalonnage en acide tannique

Annexe 04: Pourcentage d'inhibition en DPPH en fonction de l'acide ascorbique